

UCH-FC
MAG-B
P 127
C.1

Una nueva raza del complejo *Liolaemus monticola* (Reptilia: Tropiduridae) en el límite septentrional de su distribución en Chile: un enfoque evolutivo a nivel cromosómico, morfológico, y molecular.

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Eduardo Nicolás Páez Zúñiga

Marzo, 2017

**Director de Tesis Prof: Madeleine Lamborot
Co-director Dr: David Véliz**

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Eduardo Nicolás Páez Zúñiga

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 12 de Abril de 2016.

Director de Tesis:
Prof. Madeleine Lamborot



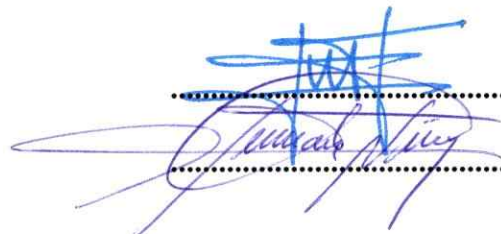
Co-Director de Tesis:
Dr. David Véliz



Comisión de Evaluación de la Tesis

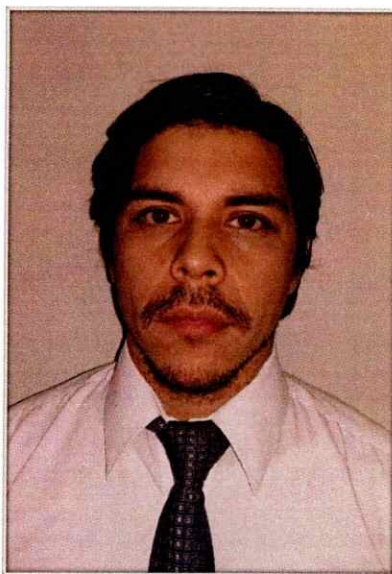
Dr. Marco Méndez

Dr. Herman Núñez



“Y al final el amor que recibes es igual al amor que das”

BIOGRAFÍA



Nací un 15 de Noviembre de 1982. Mi interés en las Ciencias se inicia en el periodo escolar, instancia donde también me sentí llamado en la vocación de enseñar. Después al ingresar a la Carrera de Licenciatura en Educación y Pedagogía en Ciencias Naturales en la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, me desarrollé en el ámbito científico con énfasis en las Ciencias Básicas. Con el fin de indagar en nuevos conocimientos y fortalecer el trabajo realizado en Laboratorio, fue que me incorporé al equipo del Laboratorio de Citogenética Evolutiva de la Universidad de Chile dirigido por Madeleine Lamborot, quién me extendió su invitación en el marco de la investigación y divulgación científica, primero realizando una Memoria de Título y luego una tesis de Magíster en el complejo *Liolaemus monticola*.

Mis intereses a futuro son seguir colaborando en temáticas cromosómico-evolutivas en especies modelo en ámbitos citogenéticos y moleculares, como también la enseñanza de las ciencias a nivel de educación superior.

Agradecimientos

Luego de un largo proceso de trabajo que incluyó momentos gratos, momentos difíciles, y sacrificios, tanto a nivel emocional como económico, finaliza una etapa importante de mi vida académica.

Quiero agradecer en primer lugar la oportunidad brindada por la Profesora Madeleine Lambrot a nivel profesional, por su dedicación, compromiso, orientaciones y consejos recibidos durante una colaboración mutua de ocho años en el Laboratorio de Citogenética Evolutiva. Profesora, le deseo lo mejor en el futuro a nivel personal y en el quehacer del laboratorio. Muchísimas gracias por todo.

A mi co-tutor el Dr. David Véliz, que confió en mí y siempre estuvo dispuesto a ayudarme, incluso cuando aparecieron las dificultades. Muchas gracias David por la calidad de tu persona, por tu valiosa ayuda y consejos.

A Sandra Brito, por años de amistad, respeto mutuo e invaluable ayuda técnica. Ha sido un agrado poder trabajar contigo conocer tu compromiso y entrega.

Agradezco la ayuda entregada por Jaiber Solano de la Universidad Austral y el Dr. Marco Méndez en la filogenia molecular realizada en esta investigación.

Gracias a: Dony Sepúlveda, Nicole Manzur, Sergio Scott, Javiera Benavente y Tania Ramírez, que aportaron en distintos ámbitos de esta tesis con una gran disposición y de manera desinteresada.

A todos los profesores que me formaron durante el programa de magíster y que me entregaron conocimientos sólidos y muy útiles en el desarrollo de este estudio.

A mi pareja Margarita Leal por su ayuda incondicional en momentos muy complejos de esta etapa, por su motivación y su sabiduría, la que me fue útil para abordar dificultades desde otro punto de vista. Te lo agradezco mucho mi amor.

Finalmente agradezco a mis padres y hermanos por su cariño, apoyo, confianza y comprensión durante estos años de estudio.

INDICE

Portada	i
Informe de aprobación	ii
Índice de materias	iii
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
Resumen	vi
Summary	vii
1. Introducción	1
1.1 Mutaciones Cromosómicas y Especiación	2
1.2 Hibridación e Introgresión Cromosómica	3
1.3 Raza Cromosómica	4
1.4 Marcadores independientes: cromosómicos, genético-moleculares y morfológicos	5
1.5 Antecedentes del complejo <i>Liolaemus monticola</i>	7
1.6 Hipótesis de trabajo	10
1.7 Objetivos	11
1.7.1 Objetivo general	11
1.7.2 Objetivos específicos	11
2. Materiales y métodos	12
2.1 Obtención del Material Biológico	12
2.1.2 Obtención de Cromosomas	14
2.1.3 Clasificación de Cromosomas, Idiogramas y Cario-idiograma racial	15
2.1.4 Estructura cromosómica poblacional	17
2.2 Análisis Morfológico	18
2.3 Extracción de ADN	19
2.4 Secuenciación del gen mitocondrial del citocromo b	19
2.5 Obtención de patrones aloenzimáticos	21
3 Resultados	23
3.1 Citogenéticos	23
3.1.1 Nueva Raza Norte Modificada 2	23
3.1.2 Razas Múltiples Fisiones 1 y 2	25
3.1.3 Raza Norte Modificada 1	25
3.1.4 Raza Norte	26
3.1.5 Raza Sur	26
3.2 Morfometría y Clasificación Cromosómica	28
3.3 Idiogramas por raza y Cario-idiograma	28
3.4 Componentes Principales y Análisis Discriminante Lineal de Medidas Cromosómicas	32
3.5 Estructura Poblacional inferida con datos cromosómicos	34
3.6 Variación Morfológica	36
3.7 Secuenciación del Citocromo b	38
3.7.1 Neutralidad e Índice de Rageddness	39
3.7.2 Red de Haplotipos	40
3.7.3 Filogenia del gen Cyt b	41
3.8 Patrones Aloenzimáticos	45
4. Discusión	47
5. Conclusiones	55
6. Referencias	56
ANEXOS	68

INDICE DE FIGURAS

1. Mapa de Chile Central esquematizando la distribución geográfica de las razas cromosómicas de <i>L. monticola</i> .	9
2. Mapa de Chile Central representando las localidades y razas cromosómicas de <i>Liolaemus monticola</i> centrales en este estudio.	13
3. Cariotipo representativo de un individuo de la raza Norte modificada 2 con un $2n = 36$	23
4. a,b: Ejemplos de díquinesis meiótica en machos: a) L821 Salamanca b) L818 Salamanca.	24
5. Cariotipos representativos de los primeros nueve pares de cromosomas de las razas cromosómicas descritas y comparadas con la Raza Norte Mod 2.	27
6. Idiogramas representativos de las seis razas cromosómicas analizadas de <i>L. monticola</i> .	29
7. Cario-idiograma obtenido para las seis razas cromosómicas de <i>L. monticola</i> .	31
8. Gráfico de los primeros dos Componentes Principales utilizando la morfometría cromosómica de las seis razas de <i>L. monticola</i> .	33
9. Análisis Discriminante Lineal (ADL) de las variables morfométricas de las seis razas de <i>L. monticola</i> .	34
10. Gráfico de los primeros dos Componentes Principales utilizando los caracteres morfológicos de las seis razas de <i>L. monticola</i> .	37
11. Análisis Discriminante Lineal (ADL) de las variables morfológicas de las seis razas de <i>L. monticola</i> .	38
12. Red de haplotipos para las secuencias de citocromo b de las seis razas de <i>L. monticola</i> .	40
13. Árbol de Máxima Parsimonia para el gen mitocondrial citocromo b, usando seis razas cromosómicas de <i>L. monticola</i> .	42
14. Árbol de Máxima Verosimilitud para el gen mitocondrial citocromo b, usando seis razas cromosómicas de <i>L. monticola</i> .	43
15. Reconstrucción filogenética para el gen mitocondrial citocromo b, obtenido mediante Inferencia Bayesiana para las seis razas cromosómicas de <i>L. monticola</i> .	44

INDICE DE TABLAS

1. Razas, localidades, rango, posición geográfica y altitud de las poblaciones analizadas de <i>L. monticola</i>	14
2. Lista de variables de la morfometría cromosómica para los nueve primeros pares de cromosomas en las seis razas de <i>L. monticola</i> y utilizadas para Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis discriminante Lineal (ADL).	16
3. Heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) para las diferentes razas, valor p HWE, número de alelos por par cromosómico o locus (A) y valores de FIS.	35
4. Valores de F_{ST} para la codificación alélica de los siete primeros pares cromosómicos de las seis razas de <i>L. monticola</i> .	36
5. Índices de diversidad nucleotídica, estadísticos de neutralidad y parámetros de distribución mismatch de genes del citocromo b en las seis razas de <i>L. monticola</i> .	38
6. Heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) para las diferentes razas, valor p HWE, número de alelos por locus (A) y valores de FIS.	45
7. Valores de F_{st} obtenidos para los alelos aloenzimáticos de las seis razas de <i>L. monticola</i> .	46

Resumen

El complejo *Liolaemus monticola*, (von Müller y Helmich, 1932), endémico de Chile, presenta una alta variación cariotípica ($2n=32$ a $2n=44$) y numerosas razas cromosómicas distinguibles por mutaciones como translocaciones complejas, incremento de microcromosomas y de macrocromosomas, entre otras. Este grupo posee altos niveles de polimorfismo cromosómico, zonas de hibridación interracial y un gradiente citogenético clinal de complejidad creciente de sur a norte. A la fecha, no se ha realizado una caracterización y comparación citogenética de una nueva raza de *L. monticola*, en el extremo norte de su distribución geográfica.

Con esta finalidad se analizó un total de 64 individuos pertenecientes a 9 localidades al norte del Río Petorca. Se utilizó una aproximación que consideró el uso de polimorfismos cromosómicos, y marcadores independientes como: caracteres morfológicos, y genéticos-moleculares (ADNmt y loci aloenzimáticos), comparados con individuos representativos de cinco razas restantes.

Los análisis a nivel cromosómico muestran una clara diferenciación de esta raza dada por rearrreglos cromosómicos diferentes a los documentados en este complejo, junto con una disminución del número cromosómico diploide, interrumpiendo el patrón creciente de cambios cromosómicos ya descrito para las otras poblaciones. Se confirma que el Río Petorca constituye una barrera efectiva al flujo cromosómico interracial. Se discute el posible origen cromosómico de esta raza considerando los distintos tipos de variación a nivel de los análisis estadísticos de morfología, secuenciación de *cyt b*, y aloenzimáticos, los que en conjunto, revelan patrones de similitud con las razas geográficamente próximas.

Summary

Liolaemus monticola (von Müller and Helmich, 1932), is a Chilean endemic, complex, that shown high karyotypic variation ($2n = 32$ to $2n = 44$) and numerous mutations distinguishable by chromosomal races as complex translocations, increased microchromosomes and of macrochromosomes, among others. This group has high level of chromosomal polymorphisms, areas of interracial hybridization and cytogenetic cline of increasing complexity gradient from south to north. However, there is not a cytogenetic characterization and comparison of a new race of *L. monticola*, northern end of its range.

For this purpose we used 64 individuals from 9 locations north of the Petorca River. Morphological, and genetic-molecular (mtDNA and allozyme loci) compared with individuals representing five remaining races: an approach that considered the use of chromosomal polymorphisms, and was used as independent markers.

The analysis at the chromosomal level show a high differentiation given by chromosomal rearrangements race ever reported in this complex, along with a decrease diploid chromosome number, interrupting the growing pattern of chromosomal changes already described. It is confirmed that the Petorca River is an effective barrier to interracial chromosomal flow. The possible chromosomal origin of this race is discussed considering the different types of variation in terms of the statistical analysis of morphology, sequences of cytochrome b, and allozymes, that revealed patterns of similarity with geographically close races.

1. *Introducción.*

Uno de los objetivos fundamentales de la investigación biológica en las últimas décadas, es avanzar en la comprensión de los procesos evolutivos y elementos genéticos subyacentes a la especiación. El proceso histórico de la especiación implica la formación de nuevas especies e incremento en la biodiversidad. Aunque el concepto de especie es clave en Biología, no existe un acuerdo conceptual, y numerosas son las definiciones propuestas por especialistas de diversos campos como la: genética, citogenética, zoología, paleontología, ecología, biogeografía, entre otros. Las especies son unidades fundamentales de la biología, sin embargo los diferentes conceptos existentes no son completamente compatibles entre sí (de Queiroz, 2005). Por otro lado, no hay cuestionamiento en el hecho de que las especies son entidades reales y representan distintos grupos o linajes evolutivos (Marshall et al. 2006).

Numerosos modelos de especiación, en general los basados en el concepto biológico de especie, se clasifican sobre la base de la distribución geográfica actual de las poblaciones, por ejemplo: alopátrica, parapátrica, simpátrica, estasisipátrica, y otras. En la práctica esto no es simple, pues las relaciones geográficas suelen cambiar durante la evolución hacia nuevos equilibrios (Endler, 1977).

Entre los numerosos intentos de definición de especie, está el concepto biológico de especie (CBE) el cual se refiere a "un grupo o población natural de individuos que pueden cruzarse entre sí, dando progenie fértil, pero que están aislados reproductivamente de otros grupos afines (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942, 1963). Además las especies son sistemas de poblaciones donde el intercambio de genes es limitado o impedido en la naturaleza por un mecanismo de aislamiento reproductivo, o tal vez por una combinación de estos (Dobzhansky, 1970).

Por último, una especie es considerada también una unidad genética y una reserva genética, mientras que el individuo es un recipiente temporal que lleva consigo una parte de esta reserva genética por un corto tiempo (Mayr, 1963).

1.1 Mutaciones Cromosómicas y Especiación

Los cromosomas de un organismo, o cariotipo, ya sea mitótico o meiótico, son considerados en su conjunto caracteres de alta determinación genética, heredables de generación en generación y en general considerados especie-específicos (White, 1978). Ha sido ampliamente reconocido que varias especies relacionadas entre sí, entre ellos los Iguánidos, (Hall 1973, 2010; Paull et al. 1976) pueden diferir en las características cariológicas hasta grados extremos (Bush et al. 1977, White, 1978). Estas diferencias tienen implicancia en la reproducción, fertilidad y evolución (Dobzhansky 1935, Baverstock et al. 1983, Marshall y Sites 2001, Claumann et al. 2004). Las mutaciones cromosómicas, ya sean numéricas o estructurales como las duplicaciones, deleciones, inversiones, translocaciones simples y/o complejas (fisiones y fusiones céntricas), pueden afectar la fertilidad de los híbridos cromosómicos, promoviendo la diferenciación de individuos de una población, estableciendo diversos grados de barreras al flujo génico y eventualmente originando una nueva especie (King, 1993, Lamborot, 2008). Así, los cambios citogenéticos pueden jugar un importante papel en la especiación, existiendo varios modelos cromosómicos que podrían explicar esta relación en términos de especiación (Hall, 1973; White, 1978; King, 1993).

Es importante considerar que una mutación cromosómica originada en la línea germinal, deberá superar las barreras meióticas conducentes a gametos viables, desaparecer o establecerse y perpetuarse ya sea en heterocigosis u homocigosis, para luego expandirse geográficamente (King, 1993). El grado de anomalías meióticas, como las aneuploidías entregan una estimación

de las diferencias genéticas y cromosómicas estructurales y/o numéricas entre individuos (Lambrot, 1993, 2008). Para evidenciar la evolución cromosómica como posible contribuyente a la especiación, es necesario ampliar el conjunto de datos, utilizando marcadores independientes (citogenéticos, morfológicos, genético-moleculares), y considerar aspectos poblacionales de: estructura, tamaño, dinámica, variabilidad cromosómica y genética, flujo cromosómico y génico, etc.

1.2 Hibridación e Introgresión Cromosómica

El proceso de hibridación natural ha llamado la atención de botánicos, zoólogos y genetistas. Ha sido estudiado a nivel taxonómico y sistemático utilizando variados marcadores, como por ejemplo los cromosomas. Se acepta que su detección entre poblaciones geográficas divergentes es un medio útil, tanto para determinar el estatus taxonómico, como para deducir modos de especiación (Mayr, 1963; Hewitt, 1988, 1989; Lambrot, 1993). Actualmente, la hibridación se considera como un fenómeno común en la naturaleza (Arnold, 1997), y que provee una oportunidad para la investigación de la arquitectura genética y cromosómica de las especies. Las zonas de hibridación pueden ser primarias dado por un origen incipiente de organismos diferenciados entre sí, en un mismo territorio (simpatría, parapatría) y secundarias cuando existe contacto entre las formas diferenciadas luego de su divergencia en alopatría (Harrison, 1990). La hibridación y la introgresión se traducen en un traspaso de genes y cromosomas entre organismos genéticamente diferenciados que incrementan la diversificación genética al producir una amplia variedad de genotipos resultantes de cientos e incluso miles de generaciones de recombinación. Más aún, las zonas de hibridación pueden ser fuente de incremento de las tasas de mutaciones al representar barreras semi-permeables al intercambio de genes (Naviera y Fontdevila, 1985; Harrison, 1990; Vásquez et al. 2007).

1.3 Raza Cromosómica

Una raza corresponde a una o más poblaciones de organismos que, a pesar de pertenecer a la misma especie, difieren entre sí con respecto a las frecuencias de alelos alternativos para un número de loci. (Mayr, 2002). Estas diferencias pueden determinar que las poblaciones se encuentren parcialmente aisladas unas de otras y durante un tiempo suficiente para que se desarrolle una diferenciación genética y eventual especiación. (Searle 1984; Lamborot, 2008).

En los casos donde existe evidencia de hibridación cromosómica resulta efectivo utilizar el concepto de raza cromosómica propuesto hace varias décadas, incluso usado a menudo como sinónimo de subespecie en distintos organismos. A nivel de la citogenética, una raza cromosómica o cariotípica se puede definir como: cualquier forma homocigota o heterocigota que tiene distribución alopátrica, parapátrica o simpátrica en relación a otras formas y que posee un cariotipo característico en un área geográfica particular (Searle, 1984; Searle et al. 2010). Los avances obtenidos en las técnicas genético-moleculares como la secuenciación de genes ha permitido un amplio desarrollo en la resolución de aspectos genéticos de la especiación, no solamente en estudios de laboratorio, sino que también han sido abordados en poblaciones naturales de diferentes organismos; en el caso de los iguanianos destacan en América los géneros *Sceloporus*, *Anolis* y *Liolaemus* (Hall, 1973; Webster et al. 1972; Lamborot, 2008), con un gran número de especies que concentran la mayor variedad cromosómica de esta Familia.

1.4 Marcadores independientes: cromosómicos, genético-moleculares y morfológicos

Los diferentes tipos de marcadores genéticos independientes como: los cromosomas, los genéticos-moleculares tanto de origen nuclear (Aloenzimas, Microsatélites, AFLPs, etc.), como citoplasmáticos (Citocromo b, Región D-loop, Citocromo Oxidasa I, etc.) y los morfológicos, constituyen valiosas herramientas para estudiar procesos de hibridación o separación de razas, cepas, especies o grupos taxonómicos mayores. En general, estos marcadores, permiten evidenciar la presencia de variantes o polimorfismos a nivel de ADN, cromosomas, y morfología producidos por algún tipo de mutación y/o recombinación en las poblaciones a través del tiempo evolutivo.

Los cromosomas son estructuras complejas compuestas principalmente por ADN, ARN y nucleoproteínas. Presentan variaciones de subestructuras especializadas como el centrómero, constricciones secundarias, regiones organizadoras del nucléolo (NORs), entre otras. Se han utilizado en estudios comparados de cariotipos, en análisis de diferencias y semejanzas entre especies filogenéticamente relacionadas, estimación de tasas mutacionales y diagnóstico clínico. El estudio detallado de los cromosomas con técnicas clásicas y de: bandeo, fluorescencia, hibridación *in situ*, inmunocitoquímica, etc., ha permitido la asignación y posición de genes en determinados cromosomas, con el fin de comprender el mecanismo de las mutaciones cromosómicas, complementando los estudios de cariología comparada.

Diversos estudios filogeográficos se basan en la secuenciación de regiones o genes mitocondriales, uno de ellos es el Citocromo b (Cyt b), con recombinación prácticamente nula y herencia estrictamente materna, salvo excepciones. La filogenia a partir de los haplotipos del Cyt b, y la demografía poblacional están íntimamente relacionadas, siendo las variables

demográficas factores decisivos que gobiernan la forma, la profundidad y los patrones demográficos de los genes (Avice, 2000; Torres-Pérez et al 2007).

Las aloenzimas son proteínas con actividad enzimática que pueden presentar formas alélicas alternativas entre individuos expresándose de forma codominante. En genética, ha sido por décadas una técnica útil para resolver aspectos sistemáticos y evolutivos de diferentes organismos, entregando datos cualitativos y cuantitativos aplicables a distintos niveles taxonómicos, permitiendo inferir relaciones filogenéticas entre poblaciones conespecíficas y entre especies diferentes (Wiens y Servedio, 2000). En particular, puede dar cuenta de alelos nuevos o mutaciones, llamados "hibridizimas" (Woodruff, 1989; Vásquez et al. 2007). Los patrones aloenzimáticos se han aplicado en estudios de variados organismos por ejemplo: crustáceos (Espinosa et al. 2003), reptiles (Hall y Selander 1973, Vásquez et al. 2007; Páez, 2010), insectos (Acosta et al. 2001), entre otros.

Los métodos de análisis de caracteres morfológicos (morfométricos y merísticos), ampliamente utilizados en sistemática, están basados en diferencias fenotípicas observables y ofrecen varias ventajas sobre los métodos moleculares, en particular cuando estos no pueden aplicarse. Son considerados un enfoque de aproximación barato y sin uso obligado de material fresco, además permite un muestreo taxonómico cuidadoso, evaluando la posible evolución de caracteres con alto valor filogenético. En sistemática, permiten comparar las distribuciones de caracteres entre muestras geográficas y delimitar las diferencias diagnósticas a nivel de individuos entre las poblaciones (Wiens y Servedio, 2000). En algunos casos, estas diferencias pueden indicar una ausencia del flujo génico entre taxones, zonas de hibridación, y la presencia de dos o más especies.

1.5 Antecedentes del complejo *Liolaemus monticola*

Liolaemus, es un género con más de 225 especies (Lobo et al. 2010), que se encuentra distribuido en el cono sur de Sudamérica, desde Ecuador a Tierra del Fuego (Cei y Videla, 2002). Este género es morfológicamente variable y muestra una gran versatilidad ecológica (Donoso-Barros, 1966). En Chile se distribuye desde Arica (18°20'S) a Magallanes (56° S), habitando variados ambientes climáticos y distintas altitudes. Cuenta con unos 85 taxa, entre especies y subespecies, con más de un 63% de endemismo (Veloso y Navarro, 1988; Pincheira-Donoso y Núñez, 2005). La geografía física de Chile ha contribuido en el aislamiento de las especies de *Liolaemus* de sus congéneros de Sudamérica, más aún y en un tiempo geológico, varias zonas dejan ambientes que facilitan la colonización de la herpetofauna, que en Chile ha alcanzado un notable predominio tanto en abundancia como en variabilidad (Lambrot 2008). La radiación adaptativa de *Liolaemus* ha generado variados patrones morfológicos (Harmon et al. 2003, Schulte et al. 2004, Vidal 2005, Pincheira-Donoso y Núñez, 2005), cromosómicos (Lambrot, 1993, 2008), genéticos (Morando et al. 2004; Vásquez et al. 2007) y de evolución molecular (Schulte et al. 2000; Torres-Pérez y Lambrot, 2008). *Liolaemus*, pertenece al Infraorden Iguania, y desde el punto de vista cromosómico, tal como sucede en aves y reptiles en general, presenta macrocromosomas (M) y microcromosomas (m), y dotaciones diploides de $2n=36$ (12 M + 24 m) esta fórmula cromosómica es considerada primitiva en reptiles (Olmo 2005, Olmo et al 2002). Esta fórmula varía en *Liolaemus* a $2n=32$ (12 M + 20 m) ó $2n=34$ (12 M + 22 m) debido a una o dos fusiones céntricas entre dos o cuatro pares de microcromosomas (Espinoza y Formas, 1976; Lambrot et al.1979).

Liolaemus monticola (von Müller y Hellmich, 1932), es una especie endémica montañosa y saxícola de Chile, de amplia distribución geográfica (30° S y 40° Lat. S), y altitudinal desde 400 hasta 2000 msnm (Donoso-Barros, 1966; Lamborot et al. 2003; Torres-Pérez, 2004). Habita la Cordillera de los Andes (Donoso-Barros, 1966; Lamborot et al. 1981), Cordillera de la Costa y la Cordillera Transversal (Lamborot y Álvarez-Sarret, 1993). Forma comunidades relativamente numerosas y tiene hábitos alimentarios insectívoros (Donoso-Barros, 1966). A nivel citogenético es altamente polimórfica presentando características interesantes, como: i) un gradiente latitudinal de diversidad cariotípica de complejidad creciente de sur a norte, ii) existencia de varias razas cromosómicas, iii) mutaciones cromosómicas intra e inter raciales como fisiones céntricas, inversiones pericéntricas, translocaciones, aumento de tamaño de los macrocromosomas y/o de los pares de microcromosomas, iv) alta tasa de polimorfismos cromosómicos y v) varias zonas de hibridación parapátricas (Lamborot, 2008). Todos estos aspectos la convierten en un organismo único y modelo en el género (Lamborot, 1993).

A la fecha, se han mencionado siete razas cromosómicas para el complejo *L. monticola* (Fig.1): “Raza Primitiva, $2n= 32$ ” (Lamborot, 1991, 2008); de cariotipo conservativo para *Liolaemus*, “Raza Sur, $2n=34$ ” (Lamborot, 1991; Lamborot y Álvarez-Sarret 1993), “Raza Norte, $2n= 38$ a 40 ” (Lamborot y Álvarez-Sarret 1993; Lamborot 2001), “Raza Norte modificada 1 $2n=38$ a 40 ”, (Lamborot et al. 2012), “Raza Múltiples Fisiones 1 $2n= 41$ a 44 ” (Lamborot et al. en preparación), “Raza Múltiples Fisiones 2 $2n= 41$ a 44 ” (Lamborot 1998; Lamborot et al. en preparación). Los números de microcromosomas varían entre 20 y 24. Una nueva raza llamada “Norte Modificada 2”, es mencionada someramente a partir de evidencia mitótica y meiótica (Lamborot 2008) y debe ser estudiada en detalle.

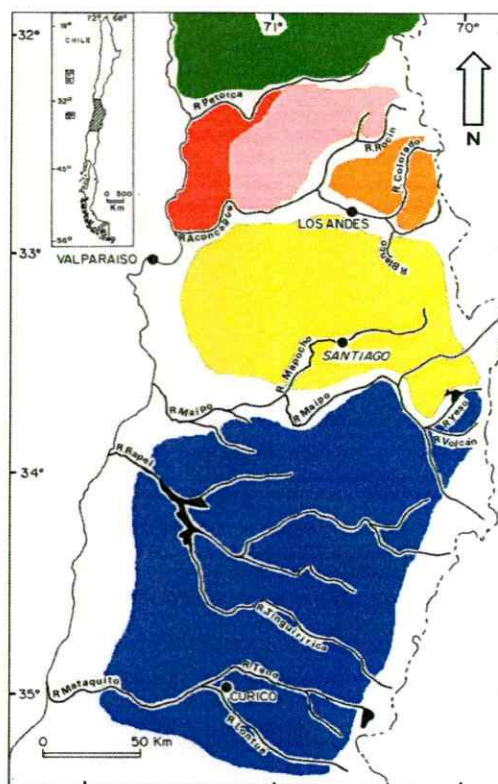


Figura 1. Mapa de Chile Central esquematizando la distribución geográfica de las razas cromosómicas de *L. monticola*. Se indican los principales ríos que separan a estas razas. En Azul: Raza Sur $2n=34$, Amarillo: Raza Norte $2n=38-40$, Naranja: Raza Norte Modificada 1 $2n=38-40$, Púrpura: Raza Múltiple Fisiones 1 $2n=41-44$, Rojo: Raza Múltiple Fisiones 2 $2n=41-44$, Verde: Nueva Raza Norte Modificada 2.

Los diversos estudios citogenéticos (Lambrot 1991, 1993, 1998, 2001; Lambrot y Álvarez-Sarret, 1993, Astete 2011), morfológicos (Lambrot y Eaton, 1992, 1997; Lambrot et al 2003), biogeográficos, genéticos (Vásquez et al. 2007; Páez 2010; Aravena 2013) y filogeográficos (Torres-Pérez et al. 2007), avalan la hipótesis de que las razas derivadas trazarian su evolución de sur a norte, y que esta colonización, iniciada por la raza sur, posiblemente originó a las razas derivadas siguiendo un proceso en cascada, que incluye colonización, hibridación y reemplazo (Lambrot, 2008). Estos estudios han permitido mapear la distribución geográfica de las razas cromosómica, detectar la existencia de ríos como barrera y de varias

zoñas de hibridación interracial, que actuarían como barreras semipermeables al flujo de genes.

Las características anteriormente expuestas para esta especie proporcionan un escenario ideal de experimentos naturales para apoyar estudios comparativos y analíticos del papel que juega la variación cromosómica en su ámbito distribucional, la presencia de zonas híbridas y los modos de especiación en la filogénesis y el éxito evolutivo del complejo *Liolaemus monticola*. Los aspectos más importantes de este estudio son: i) caracterizar cromosómicamente a los individuos y localidades ubicadas al norte del Río Petorca, ii) determinar su delimitación geográfica, iii) proponer una nueva raza para esta especie, iv) establecer las relaciones cromosómicas evolutivas que tiene con las razas ya descritas al sur del Río Petorca, v) la utilización de marcadores independientes para caracterizar y comparar a este grupo de individuos y/o razas vi) la posibilidad de continuar completando décadas de estudios en este importante complejo de evolución cromosómica.

1.6 Hipótesis de trabajo

Los cromosomas de los individuos de la región del límite septentrional de la distribución de *Liolaemus monticola* exhiben un patrón de complejidad creciente y acumulativo, de Sur a Norte. Esta continuidad citogenética concordaría con la diferenciación morfológica y molecular de las razas descritas y geográficamente próximas.

1.7 Objetivos

Dada la alta variabilidad cariotípica del complejo *L. monticola* ($2n= 32-44$), se ha sugerido que la evolución cromosómica es un proceso recurrente en este grupo, siendo posible evaluar su rol en los procesos de diferenciación y/o especiación. De acuerdo con esto se plantean los siguientes objetivos:

1.7.1 Objetivo general

Caracterizar la variación cromosómica intra e inter poblacional para los individuos del límite de distribución septentrional del complejo *L. monticola*.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Determinar el grado de diferenciación cromosómica poblacional de los individuos de las localidades al Norte del Río Petorca.
2. Comparar cromosómicamente estos individuos con las restantes razas cromosómicas descritas.
3. Interpretar la posible congruencia entre la diferenciación cromosómica de estos individuos, con la diferenciación de marcadores morfológicos y genético-moleculares utilizados a nivel racial.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención del Material Biológico

Los individuos de *L. monticola* analizados en esta tesis provienen de 19 localidades de Chile central (Tabla 1) representando cuatro razas cromosómicas, dos de ellas ya descritas. Durante el desarrollo de esta tesis fue necesario incorporar además la información ya publicada de las razas Sur $2n= 34$ y Norte $2n= 38-40$ para fines comparativos. El procesamiento de cada ejemplar se llevó a cabo en el Laboratorio de Citogenética Evolutiva de la Facultad de Ciencias de Universidad de Chile. La zona estudiada corresponde al límite de la distribución septentrional de este complejo (Figura 2), en la Región de Coquimbo comprendida entre los 31° ' y $32^{\circ} 53$ 'S, y los $70^{\circ} 26'$ y $71^{\circ}13'O$. En el sur estaría delimitada principalmente por el Río Petorca (Lamborot et al., en preparación).

La mayoría de las muestras utilizadas de *L. monticola* corresponden a material preservado durante las últimas tres décadas, ya sea fijadas en preparaciones citogenéticas, individuos conservados en formalina y/o alcohol, y tejidos conservados a $-80^{\circ}C$. Los individuos recolectados fueron trasladados en condiciones apropiadas desde su lugar natural a terrarios bajo condiciones adecuadas (luz, temperatura, agua, etc.) hasta su sacrificio con una inyección de uretano en el ojo pineal, previa inyección de colchicina dos horas antes de su procesamiento. Se procedió así a la disección del animal bajo lupa, y a la extracción de muestras de tejidos para análisis de cromosomas, proteínas y ADN. El resto del ejemplar fue etiquetado y conservado para estudios morfológicos. Los ejemplares se encuentran en la Colección Herpetológica, Laboratorio de Citogenética Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

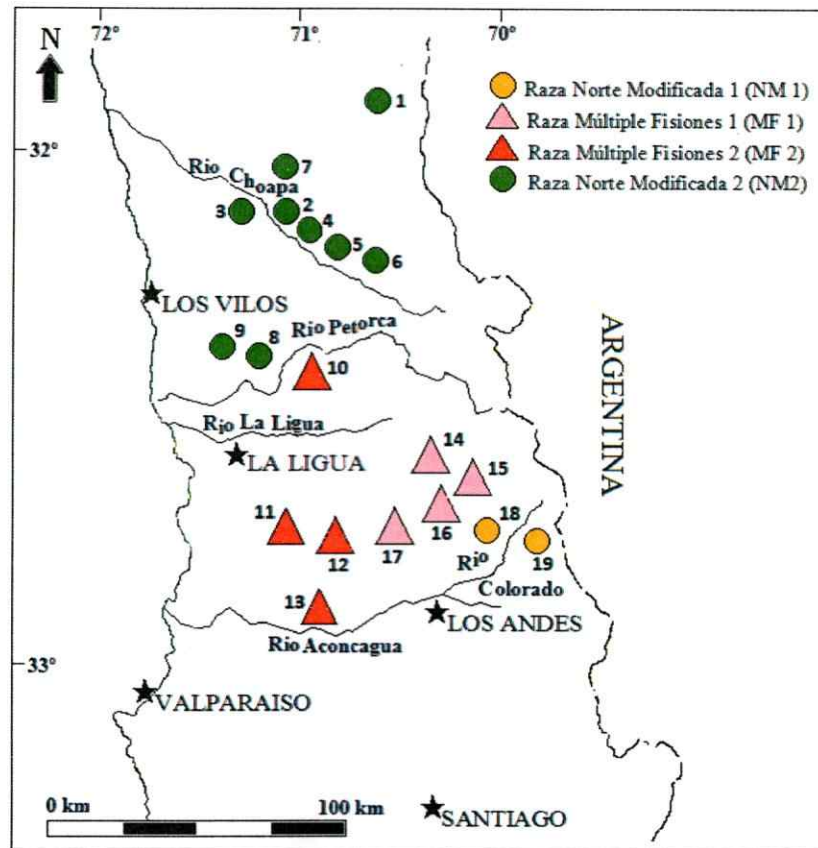


Figura 2. Mapa de Chile Central representando las localidades y razas cromosómicas de *Liolaemus monticola* centrales en este estudio: a) Al Norte del Río Petorca: 1. Santa Virginia, 2. Salamanca Norte Choapa, 3. Salamanca Sur Choapa, 4. Chillepin, 5. Quebrada Chínche, 6. Tranquilla, 7. Illapel, 8. Tilama, 9. Culimó, b) Al Sur del Río Petorca: 10. Hierro Viejo, 11. El Soldado, 12. Cerrillos, 13. Cabrería, 14. Los Patos, 15. Chalaco, 16. Río Rocín, 17. Lo Vicuña, c) Al Sur del Río Aconcagua: 18. Río Colorado Norte, 19. Río Colorado Sur.

Tabla 1. Razas, localidades, rango, posición geográfica y altitud de las poblaciones analizadas de *L. monticola*

RAZA CROMOSÓMICA	N° MAPA	LOCALIDAD	RANGO	POSICION GEOGRAFICA	ALTITUD
NM 2	1	Santa Virginia	Andino	31° 28' 19"S, 70° 46' 70"O	1447
NM 2	2	Salamanca Norte Choapa	Costero	31° 47' 22"S, 70° 58' 15"O	530
NM 2	3	Salamanca Sur Choapa	Costero	31° 47' 20"S, 70° 58' 16"O	528
NM 2	4	Chillepín	Costero	31° 49' 28"S, 70° 51' 37"O	788
NM 2	5	Quebrada Chinche	Andino	31° 53' 02"S, 70° 38' 07"O	1163
NM 2	6	Tranquilla	Andino	31° 57' 06"S, 70° 36' 26"O	1172
NM 2	7	Illapel	Costero	31° 57' 07"S, 70° 36' 26"O	1179
NM 2	8	Tilama	Costero	32° 04' 22"S, 71° 13' 05"O	430
NM 2	9	Culimó	Costero	32° 04' 09"S, 71° 13' 43"O	407
MF 2	10	Hierro Viejo	Costero	32° 16' 75"S, 71° 00' 74"O	550
MF 2	11	El Soldado	Costero	32° 38' 32"S, 71° 06' 37"O	1030
MF 2	12	Mina Cerrillos	Costero	32° 37' 42"S, 70° 56' 25"O	1310
MF 2	13	Cabrería	Costero	32° 49' 25"S, 71° 00' 17"O	405
MF 1	14	Los Patos	Andino	32° 30' 29"S, 70° 34' 30"O	870
MF 1	15	Chalaco	Andino	32° 30' 04"S, 70° 34' 58"O	1190
MF 1	16	Río Rocín	Andino	32° 30' 49"S, 70° 30' 13"O	1200
MF 1	17	Lo Vicuña	Andino	32° 35' 42"S, 70° 44' 26"O	1300
NM 1	18	Río Colorado Norte	Andino	32° 52' 16"S, 70° 22' 40"O	1550
NM 1	19	Río Colorado Sur	Andino	32° 53' 61"S, 70° 20' 08"O	1550

2.1.2 Obtención de Cromosomas: Técnica descrita por Lambrot y Vásquez (1998)

Las placas cromosómicas fueron obtenidas a partir de muestras frescas de testículo, médula ósea, hígado y bazo, disgregadas en placas de Petri con una solución isotónica (Ringer para reptiles). La suspensión celular resultante se centrifugó a 800 rpm. por 8 minutos; se eliminó el sobrenadante y se reemplazó por una solución hipotónica (Citrato de sodio al 0,8%), dejándose reposar por 20 minutos aprox. Se procedió a centrifugar por segunda vez por 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y se reemplazó por fijador metanol acético 3:1, se centrifugó nuevamente por 8 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el último paso con nuevo fijador y se dejó caer una gota de esta suspensión en un portaobjetos limpio secándose luego en una plancheta termoeléctrica a 35 °C. Parte de estas preparaciones se tiñeron por espacio de 25 minutos con solución Giemsa al 4% y Ph 7,2. Luego se observó en un microscopio óptico Nikon Optiphot FX 35 A con cámara fotográfica incorporada. Las placas mitóticas y meióticas seleccionadas fueron registradas y microfotografiadas para análisis de quiasmas y confección de

cariotipos, y se conservaron en medio de montaje DEPEX. Se utilizó en este estudio el archivo de los montajes cromosómicos diploides (cariotipos) confeccionados a partir de fotos ampliadas.

2.1.3 *Clasificación de Cromosomas, Idiogramas y Cario-idiograma racial*

Las medidas de longitud para cada cromosoma obtenidas con compás de doble punta de acero y un pie de metro, tanto del brazo corto (p), como del brazo largo (q) se expresaron en cm, y proporcionando la siguiente información: razón de longitud p sobre q (p/q), longitud total de cada cromosoma (p + q), longitud promedio de cada par, número total de cromosomas o número diploide (2n), posición y longitud de constricciones secundarias y de satélite, e índice centromérico (IC), calculado como:

$$\frac{\text{longitud brazo corto (p)}}{\text{longitud total (p + q)}} \times 100$$

El IC determina la posición del centrómero, y la correspondiente nomenclatura cromosómica según la clasificación de Levan et al. (1964), estableciendo los siguientes rangos de valores para este índice de la siguiente manera: para cromosomas con centrómero de localización terminal, la denominación es **telocéntrico (t)** con valores de IC de 1 a 12.5, cuando la localización es sub-terminal, se clasifica como **subtelocéntrico (st)** con IC de 12.5 a 25, para centrómeros en ubicación submedial o **submetacéntrico (sm)** el IC va de 25 a 37.5, y en el caso de localización medial el cromosoma se **denomina metacéntrico (m)** con IC de 37.5 a 50.

A partir de lo anterior se agrupó cada par cromosómico por forma y tamaño, estableciendo diferencias y semejanzas entre pares de macrocromosomas y los primeros pares de microcromosomas. Se logró así llevar a cabo una cariología descriptiva y luego una cariología comparada entre las razas.

Aunque se midieron todos los macro y microcromosomas, se consideró la información de longitud relativa e índice centromérico hasta el par 9, ya que los siguientes no permiten determinar las medidas de longitud ni la posición del centrómero en forma precisa. Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA), y luego un Análisis Discriminante Lineal (ADL), a partir de la información de longitud relativa e índice centromérico de cada cariotipo y de cada individuo por raza, se confeccionó una matriz con 65 variables cromosómicas (Tabla 2) y se analizaron con el Software R (<http://www.r-project.org/>) versión 2.13.1 para así determinar el peso de cada variable en la varianza total sin considerar la procedencia de las muestras y obtener las variables realmente importantes en la segregación de los individuos en los nuevos componentes formados.

Tabla 2. Lista de variables de la morfometría cromosómica para los nueve primeros pares de cromosomas en las seis razas de *L. monticola* y utilizadas para Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis Discriminante Lineal (ADL).

SIGLA	VARIABLE CROMOSOMICA	SIGLA	VARIABLE CROMOSOMICA
C1	Longitud Relativa Cromosoma 1	C4'	Longitud Relativa Cromosoma 4 (homólogo)
C1'	Longitud Relativa Cromosoma 1 (homólogo)	IC4	Índice Centromérico Cromosoma 4
IC1	Índice Centromérico Cromosoma 1	C4fa	Longitud Relativa Cromosoma 4 Fisión a
C1fa	Longitud Relativa Cromosoma 1 Fisión a	C4fa'	Longitud Relativa Cromosoma 4 Fisión a (homólogo)
C1fa'	Longitud Relativa Cromosoma 1 Fisión a (homólogo)	IC4fa	Índice Centromérico Cromosoma 4 Fisión a
IC1fa	Índice Centromérico Cromosoma 1 Fisión a	C4fb	Longitud Relativa Cromosoma 4 Fisión b
C1fb	Longitud Relativa Cromosoma 1 Fisión b	C4fb'	Longitud Relativa Cromosoma 4 Fisión b (homólogo)
C1fb'	Longitud Relativa Cromosoma 1 Fisión b (homólogo)	IC4fb	Índice Centromérico Cromosoma 4 Fisión b
IC1fb	Índice Centromérico Cromosoma 1 Fisión b	C4fa*	Longitud Relativa Cromosoma 4 Fisión a (variante)
C2	Longitud Relativa Cromosoma 2	IC4fa*	Índice Centromérico Cromosoma 4 Fisión a (variante)
C2'	Longitud Relativa Cromosoma 2 (homólogo)	C4fb*	Longitud Relativa Cromosoma 4 Fisión b (variante)
IC2	Índice Centromérico Cromosoma 2	IC4fb*	Índice Centromérico Cromosoma 4 Fisión b (variante)
C2fa	Longitud Relativa Cromosoma 2 Fisión a	C5	Longitud Relativa Cromosoma 5
C2fa'	Longitud Relativa Cromosoma 2 Fisión a (homólogo)	C5'	Longitud Relativa Cromosoma 5 (homólogo)
IC2fa	Índice Centromérico Cromosoma 2 Fisión a	IC5	Índice Centromérico Cromosoma 5
C2fb	Longitud Relativa Cromosoma 2 Fisión b	C6	Longitud Relativa Cromosoma 6
C2fb'	Longitud Relativa Cromosoma 2 Fisión b (homólogo)	C6'	Longitud Relativa Cromosoma 6 (homólogo)
IC2fb	Índice Centromérico Cromosoma 2 Fisión b	IC6	Índice Centromérico Cromosoma 6
C2fb*	Longitud Relativa Cromosoma 2 Fisión b (variante)	C6al	Longitud Relativa Cromosoma 6 alargado
C2fb**	Longitud Relativa Cromosoma 2 Fisión b (variante homólogo)	IC6al	Índice Centromérico Cromosoma 6 alargado
IC2fb*	Índice Centromérico Cromosoma 2 Fisión b (variante)	C7	Longitud Relativa Cromosoma 7
C3	Longitud Relativa Cromosoma 3	C7'	Longitud Relativa Cromosoma 7 (homólogo)
C3'	Longitud Relativa Cromosoma 3 (homólogo)	IC7	Índice Centromérico Cromosoma 7
IC3	Índice Centromérico Cromosoma 3	C7st	Longitud Relativa Cromosoma 7 subtelocéntrico
C3fa	Longitud Relativa Cromosoma 3 Fisión a	C7st'	Longitud Relativa Cromosoma 7 subtelocéntrico (homólogo)
C3fa'	Longitud Relativa Cromosoma 3 Fisión a (homólogo)	IC7st	Índice Centromérico Cromosoma 7 subtelocéntrico
IC3fa	Índice Centromérico Cromosoma 3 Fisión a	C8	Longitud Relativa Cromosoma 8
C3fb	Longitud Relativa Cromosoma 3 Fisión b	C8'	Longitud Relativa Cromosoma 8 (homólogo)
C3fb'	Longitud Relativa Cromosoma 3 Fisión b (homólogo)	IC8	Índice Centromérico Cromosoma 8
IC3fb	Índice Centromérico Cromosoma 3 Fisión b	C9	Longitud Relativa Cromosoma 9
C3fa*	Longitud Relativa Cromosoma 3 Fisión a (variante)	C9'	Longitud Relativa Cromosoma 9 (homólogo)
IC3fa*	Índice Centromérico Cromosoma 3 Fisión a (variante)	IC9	Índice Centromérico Cromosoma 9
C4	Longitud Relativa Cromosoma 4		

El idiograma es un método de representación de la forma, tamaño y número de cromosomas de varios cariotipos procedentes de diferentes individuos de una población, raza o especie, expresando la longitud de cada cromosoma como un porcentaje del set cromosómico completo. Los cariotipos analizados fueron medidos por cromosoma, estableciendo los promedios y luego los porcentajes de los nueve primeros pares cromosómicos. Se estableció un criterio de medición de longitud relativa al 200% (según Lamborot 1981, 1991) debido a la necesidad de representar los polimorfismos o heterocigotos cromosómicos existentes en algunos pares dentro y entre estas razas. Las mediciones porcentuales de las longitudes cromosómicas se expresaron gráficamente en un idiograma según el protocolo descrito por Lamborot (1981).

Finalmente, las variables obtenidas para cada raza cromosómica (longitud relativa e índice centromérico) fueron representadas gráficamente en un Cario-idiograma (Patau 1960; Spotorno et al. 1979). Esta relación permitió revelar las características morfométricas de cada cromosoma en un único punto, y así clasificar también dentro de grupos a los cromosomas entre y dentro de las razas, y distinguir entre cromosomas conservativos y derivados.

2.1.4 Estructura cromosómica poblacional

Los cromosomas fueron codificados como "alelos" para los primeros seis macrocromosomas y el primer par de microcromosomas sigue la nomenclatura propuesta por Lamborot (1998) y Lamborot et al. (2012) que identifican cada rearrreglo cromosómico. Así el cromosoma de tendencia metacéntrica o submetacéntrica fue codificado como "A", y todos los que presentan fisión céntrica como "B". Las inversiones cromosómicas se codificaron como "C" y las inversiones que afectaron a los productos de fisiones céntricas en el par cromosómico 2 se codificaron como "D". El cromosoma alargado se codificó con el alelo "E".

Con esta información se estimó la variabilidad cromosómica, heterocigocidades, y posibles desviaciones al Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) el cual se probó estadísticamente utilizando un test de permutaciones implementado en el software Genetix 4.03 (Belkhir et al., 2004).

2.2. Análisis Morfológico

La lista de caracteres escogidos, y los tipos de análisis para describir y cuantificar la diferenciación morfológica entre distintas razas de *L. monticola* se basó en los estudios anteriores de Lamborot y Eaton, (1992, 1997), Lamborot et al. (2003) y Aravena (2013). La cuantificación y caracterización de las escamas se realizó bajo lupa binocular (Nikon Stereo Photo SMZ-10). Se utilizó 37 caracteres merísticos: COR A: circunorbitales; COR B: circunorbitales más superciliares y supraorbitales; SOR: dentro del semicírculo del circunorbital; SCI: superciliares; SOC: suboculares; TEM: temporales, ente el margen posterior del ojo y la mitad del oído; CATEM: cantus temporal; SAP: bordean el parietal; POSPA: post parietales; FRON: frontales; SAF: bordean a la frontal; POPR: post frontales; LOR A: loreales, entre cantales, supralabial y subocular; LASUP 1B: supralabial, mitad del diámetro longitudinal del ojo (altura de palpebrales) hasta final de comisura labial, LASUP 2A: lorilabial A, desde rostral hasta primera mitad del ojo (en contacto con SOC); LASUP 2B: lorilabial B, mitad del diámetro longitudinal del ojo hasta final de comisura labial; LAINF A: infralabial A, desde mental hasta primera mitad del ojo (en contacto con LASUP 1) LAINF B: infralabial B, desde mental hasta el final de comisura labial; AURS: auriculares; TIPS: timpánicas; SARO: rodean escama rostral; SAME: rodean escama mental; INA: internasales; SANA: rodean escama nasal; SBRF: ente frontal y rostral; INCA: intercantales; GUS: gulares; DOS: dorsales; VES: ventrales; SAB: alrededor del cuerpo; FEM: femorales, desde rodilla hasta el torso (siguiendo escamas grandes); DORCA: dorsal largo de la cabeza; AVCO: alrededor del 15° verticilo cola, desde el

nivel de la cresta genital; LAMA: lamelas subdigitales del cuarto dedo de la mano derecha; LAPA: lamelas subdigitales del cuarto dedo del pie; LARCAB: largo de la cabeza (cm); LARESCA: cociente entre LARCAB Y DORCA. Para estas variables se efectuó un análisis de componentes principales (PCA), permitiendo determinar el peso de cada variable en los nuevos componentes del análisis. Después de reducir el número de variables redundantes, se realizó un análisis de discriminante lineal (ADL) para encontrar la mayor diferencia entre los grupos de individuos preestablecidos por raza. Ambos procedimientos se llevaron a cabo usando el Software R (<http://www.r-project.org/>) versión 2.13.1.

2.3. Extracción de ADN

La obtención de ADN genómico total fue efectuada utilizando una pequeña sección de tejido conservado en alcohol 70% (de preferencia corazón e hígado), para luego llevar a cabo el protocolo de extracción salina descrito por Aljanabi y Martínez (1997). La concentración de cada extracción individual fue cuantificada utilizando usando un volumen de 1µl en un espectrofotómetro Nanodrop ND – 1000.

2.4. Secuenciación del gen mitocondrial Cyt b

La amplificación parcial del gen mitocondrial Cyt b se realizó en una reacción de 25 µl de solución final formada por: 2,5 µl de Buffer Taq 10X, 0,5 µl de DNTps (10 mM), 1µl de MgCl₂, más los primers: GLUD (5'-TGACTTGAARAACCA YCGTTG-3') y CB3 (5'-GGCAAATAGGAARTATCATTC-3') descritos por Palumbi (1996) de cada primer se utilizó 1 µl (25 uM) y 2 µl de las diluciones de ADN genómico (50ng/µL) realizando la PCR en un termociclador Peltier PTC -100. El PCR consistió en: 95° C por 5 minutos (min.), 35 ciclos de 94° C por 90 segundos, alineamiento de 52° C por 25 segundos y 72° C por 90 segundo con una extensión final de 72° C por 8 min. Los productos de PCR (700pb) se corrieron en geles de

agarosa al 1,5% con buffer TAE 1X, y fueron teñidos con SYBR SAFE, usando un marcador de peso molecular de ADN y con un voltaje de 100 v por 1 hora. Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc. Las secuencias resultantes fueron alineadas de forma manual con el software Proseq Processor of sequences v. 2.91 (Filatov, 2003).

Se calculó los índices de diversidad nucleotídica a nivel poblacional y racial utilizando el software DNA sp v. 5.10.1 (Rozas et al. 2010). Las pruebas de neutralidad de Tajima's D (Tajima 1989), Fu's FS (Fu 1997), junto con el índice Raggedness (Harpending et al. 1993, 1994) y los parámetros de distribución mismatch, fueron estimados con el software Arlequin 3.5 (Excoffier et al. 2010). Para visualizar las diferencias en cuanto a pasos mutacionales y en composición de haplotipos a nivel racial, se confeccionó una red de haplotipos usando el algoritmo median-joining incluido en el software Network v. 4.6.1.3 (Bandelt et al. 1999).

Los análisis de reconstrucción filogenética se llevaron a cabo usando el criterio de Máxima Parsimonia disponible en el programa PAUP 4.0 (Swofford, 2004). Todos los caracteres fueron analizados asumiéndolos como no ordenados, del mismo peso y con cuatro estados posibles (A, C, G, T), y excluyendo aquellos caracteres filogenéticamente no-informativos. La búsqueda del árbol más parsimonioso se realizó a través de búsqueda heurística y fue conducida con el algoritmo de "barrido de ramas" por "bisección y reconexión del árbol" (TBR). Los árboles fueron enraizados siguiendo el criterio de grupos externos, usando como tales las secuencias de citocromo b disponibles en GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y correspondientes a *Liolaemus pictus* (código de acceso BYU47193), *Liolaemus nigroviridis* (Lnig676) y *Liolaemus tenuis* (B10IslaPV211). El árbol de consenso estricto se obtuvo mediante un análisis de bootstrap (1000 replicas). La reconstrucción realizada bajo el criterio de Máxima Verosimilitud se realizó con el software RaxML 8.0 (Stamatakis, 2014) usando el modelo de sustitución nucleotídica GTR + gamma y un análisis de bootstrap incluyendo 1000 réplicas. Se

obtuvo además el mejor árbol indicando los valores de bootstrap para el soporte de los nodos en un árbol consenso bajo un criterio de 75% "majority-rule". Para aceptar un nodo como respaldado desde el punto de vista del bootstrap se siguió la sugerencia de valores por sobre el 70% en ambas metodologías.

Para la Inferencia Bayesiana se utilizó el software MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2005), determinando el mejor modelo de sustitución nucleotídica según los criterios de información Akaike (AIC) entregados por MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004). MrBayes se corrió con árboles al azar a partir de 10 millones de generaciones y muestreando las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) cada 1000 generaciones con número de cadenas = 4, y fracción descartada (burning) = 25% para garantizar la exploración del espacio del árbol filogenético, y prevenir que la topología estuviese atrapada en óptimos locales. Para *cyt b* se asumió el modelo de sustitución GTR + I + G. Para establecer si las cadenas de Markov habían alcanzado un estado de equilibrio, se graficaron las puntuaciones de probabilidad (-ln Likelihood) de los árboles muestreados contra el tiempo de generación utilizando el software Tracer v.1.5 (Rambaut y Drummond, 2007).

2.5. Obtención de patrones aloenzimáticos.

Las muestras para electroforesis de proteínas se obtuvieron a partir de tejidos conservados en freezer (pulmón, hígado, músculo esquelético, e intestino, todos a -85°C), utilizando el protocolo descrito por Vásquez (2002) y Páez (2010). Luego de ser macerados con ayuda de un buffer de extracción, estos tejidos fueron rotulados y almacenados en freezer hasta la corrida de la electroforesis.

Los geles se prepararon a partir de una solución al 11% de almidón de papa hidrolizado (SIGMA) agregándose el buffer adecuado a los diferentes marcadores genéticos que se

pesquisaron. Se utilizaron los siguientes sistemas buffer: Tris Citrato Ph 8, Tris Borato EDTA en Ph = 8 y Ph = 8,6, y Tris HCl. El homogenizado se inoculó dentro del gel utilizando trozos de papel filtro, manteniendo una temperatura cercana a 4°C. Luego de esto el gel se llevó a la cámara de corrida, proceso que fue constantemente supervisado. Se procedió a realizar la tinción de proteínas, preparadas e incubadas según protocolos específicos. Se analizaron las siguientes siete enzimas: AAT (Aspartato aminotransferasa), α -MAN (Alfa manosidasa), LDH (Lactato deshidrogenasa), PEP-A (Peptidasa), PGI (Fosfoglucoisomerasa), PGM (Fosfoglucomutasa), y SOD (Superóxido dismutasa).

Las bandas de tinción fueron diagnosticadas de acuerdo a la conformación proteica y las variantes alélicas observadas se interpretaron usando zimogramas confeccionados con anterioridad (Páez 2010). Se estimó la variabilidad genética, heterocigocidades, posibles desviaciones al Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) el cual se probó estadísticamente utilizando un test de permutaciones implementados en el software Genetix 4.03 (Belkhir et al., 2004).

3. Resultados

3.1. Citogenéticos

3.1.1 Nueva Raza Norte Modificada 2

La dotación cromosómica para todas las localidades de esta raza, central en este estudio, corresponde a $2n = 35$ a 38 . Con 13, 14, 15 ó 16 M, más 22 m. No se observó cromosomas de determinación del sexo.

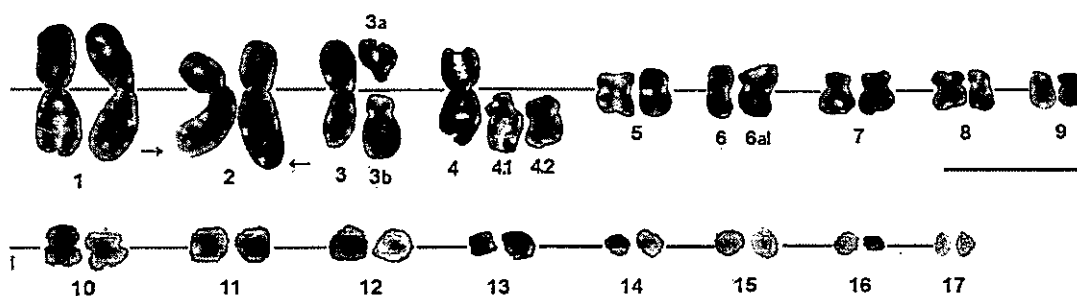


Figura 3: Cariotipo representativo de un individuo de la raza Norte modificada 2 con un $2n = 36$ (L 730 hembra, Salamanca) Nótese el polimorfismo del par 3 y 4. Las flechas representan la presencia de constricción secundaria y satélite. La línea al costado izquierdo representa 10μ .

Los pares 1 y 2 fueron monomórficos de tendencia metacéntrica y submetacéntrica respectivamente, el par 2 presentó constricción secundaria y satélite en el extremo de su brazo q. El par 3 exhibió polimorfismo, en todos los individuos con un cromosoma de tendencia metacéntrica y dos productos de fisión, de tendencia telocéntrica (3a), y submetacéntrica (3b). Con respecto al par 4 este también resultó polimórfico, presentando un cromosoma de tendencia metacéntrica más dos productos de fisión (4.1 y 4.2) ambos de tendencia submetacéntrica. El par 5 fue monomórfico y de tendencia metacéntrica. El par 6 fue polimórfico, con ambos cromosomas de tendencia metacéntrica, pero uno de ellos de mayor longitud. Los

microcromosomas 7, 8 y 9 fueron monomórficos de tendencia metacéntrica. Todos los cromosomas y sus rearrreglos fueron corroborados por medio de placas meióticas (Fig. 4a y b).

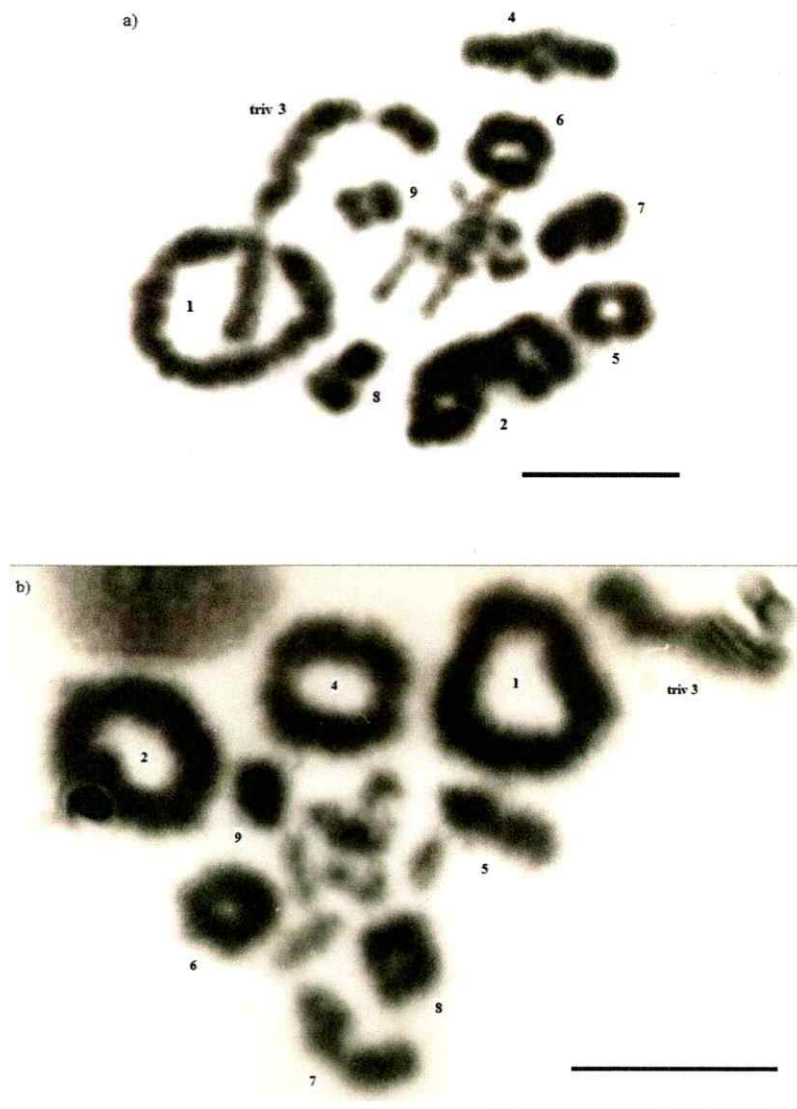


Figura 4a y 4b: Ejemplos de diaquinesis meiótica en machos: a) L821 Salamanca b) L818 Salamanca. Se observan los quiasmas y se asignan tentativamente los primeros nueve pares de cromosomas. La línea al costado izquierdo representa 10 μ .

Con fines comparativos se midió los primeros 9 pares de cromosomas a partir cariotipos representativos de las razas al Sur del Río Petorca, luego fue necesario incorporar a las razas Norte y Sur. Estos cariotipos se presentan a continuación (Fig. 5):

3.1.2 Razas Múltiples Fisiones 1 y 2

Ambas razas (fig. 5a y 5b) presentaron fisiones céntricas en los 4 primeros pares de macrocromosomas. El par 1 resultó polimórfico con un cromosoma de tendencia metacéntrica y dos productos de fisión (1a y 1b), ambos de tendencia telocéntrica. El par 2 submetacéntrico presentó fisiones con un producto telocéntrico (2a) y uno submetacéntrico (2b), que contiene en su brazo p la constricción secundaria y satélite. Ambas razas se diferenciaron en estas fisiones, la raza MF 1 presentó un polimorfismo para la posición de constricción secundaria y satélite siendo encontrado en el extremo del brazo q del cromosoma 2b'. El par 3 fue polimórfico, al poseer un cromosoma de tendencia metacéntrica y dos productos de fisión; uno de tendencia telocéntrica (3a) y el otro subtelocéntrica (3b). El par 4 fue homocigoto para las fisiones de tendencia telocéntrica. El par 5 fue monomórfico de tendencia metacéntrica. El par 6 fue polimórfico, con ambos cromosomas de tendencia metacéntrica, pero uno de ellos de mayor longitud. El par de microcromosomas 7, mostró polimorfismo con un cromosoma de tendencia metacéntrica y otro subtelocéntrico. Los pares 8 y 9 fueron monomórficos y de tendencia metacéntrica.

3.1.3. Raza Norte Modificada 1 (Fig. 5c)

Los pares 1 y 2 fueron monomórficos y de tendencia metacéntrica y submetacéntrica respectivamente, el par 2 presentó constricción secundaria y satélite en el extremo de su brazo q. El par 3 fue polimórfico, con un cromosoma de tendencia metacéntrica y dos productos de fisión; uno de tendencia telocéntrica (3a) y el otro subtelocéntrica (3b). Los productos de fisión

del par 4 fueron de tendencia telocéntrica. El par 5 fue monomórfico de tendencia metacéntrica. El par 6 fue polimórfico, con uno de los cromosomas de mayor longitud. El par de microcromosomas 7 mostró polimorfismo con un cromosoma de tendencia metacéntrica y otro subtelocéntrico. Los pares 8 y 9 fueron monomórficos de tendencia metacéntrica.

3.1.4. Raza Norte (Fig. 5d)

Los pares 1 y 2 fueron monomórficos y de tendencia metacéntrica y submetacéntrica respectivamente, el par 2 presentó constricción secundaria y satélite en el extremo de su brazo q. Esta raza presentó fisiones céntricas en los pares 3 y 4. El par 3 fue polimórfico, al poseer un cromosoma de tendencia metacéntrica y dos productos de fisión; uno de tendencia telocéntrica (3a) y el otro subtelocéntrica (3b). Ambos productos de fisión del par 4 fueron de tendencia telocéntrica. Los pares 5, 6, 7, 8 y 9 fueron monomórficos y de tendencia metacéntrica.

3.1.5. Raza Sur (Fig. 5e)

Los nueve pares fueron monomórficos y de tendencia metacéntrica. El par 2 es tipo submetacéntrico y con satélite en el extremo de su brazo q.



Figura 5. Cariotipos representativos de los primeros nueve pares de cromosomas de las razas cromosómicas descritas y comparadas con la Raza Norte Mod 2. Los individuos por razas corresponden a: a) Hierro Viejo individuo L1362, b) Río Rocín L2180, c) Río Colorado L2561, d) San Gabriel L547, e) Cantillana L1085. Las flechas representan la presencia de constricción secundaria y satélite. La línea al costado izquierdo representa 10 μ .

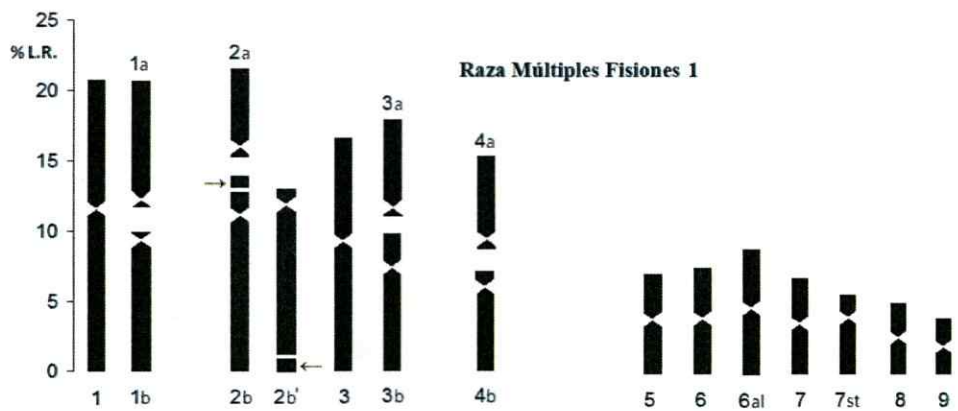
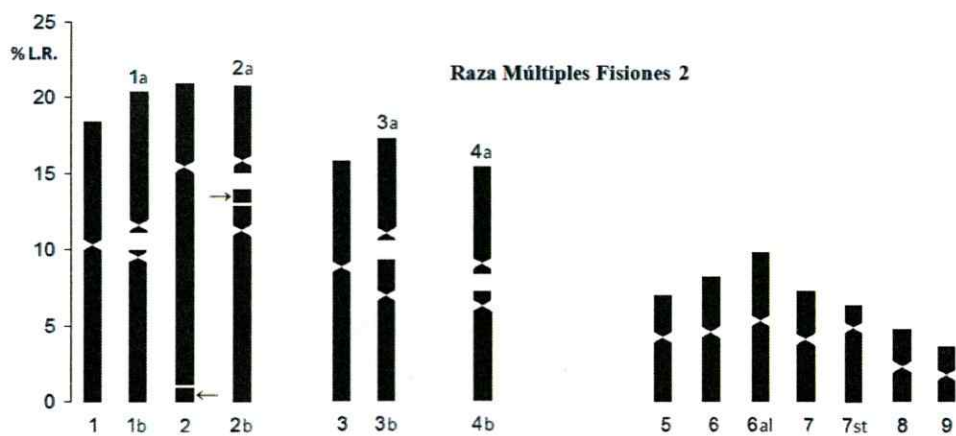
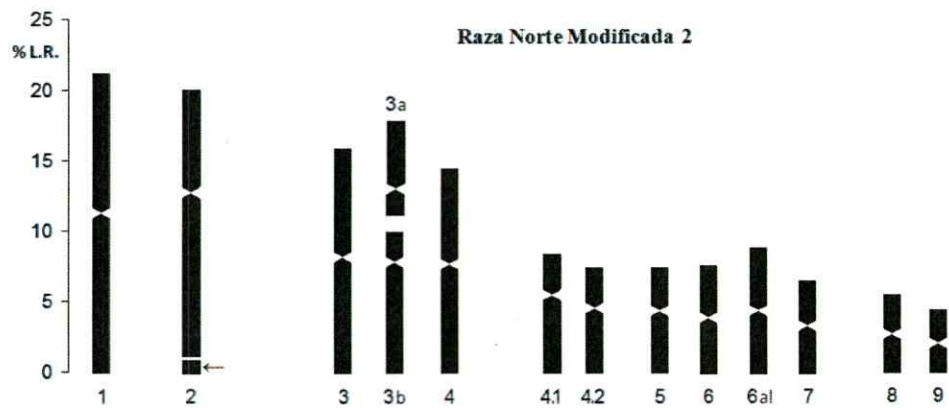
3.2 *Morfometría y Clasificación Cromosómica.*

Las variaciones obtenidas de la morfometría de los pares cromosómicos raciales y su clasificación se muestran en el Anexo 1. Estas mediciones fueron la base de los análisis cromosómicos posteriores y permitieron apreciar el polimorfismo intrarracial e interracial a nivel de varios pares de cromosomas. Las menos polimórficas fueron las razas Sur y Norte, luego al aumentar la frecuencia y complejidad de rearrreglos, siguieron en orden las razas Norte Mod 1 y finalmente las Razas MF 1 y MF 2 ambas con 5 pares polimórficos.

La raza Norte Mod 2, mostró polimorfismos únicos, pero fue menos polimórfica que las razas MF 1 y MF 2. Los valores de desviación estándar se incrementaron en los microcromosomas, debido a que la técnica utilizada presentó dificultades al medir cromosomas pequeños.

3.3 *Idiogramas por raza y Cario-idiograma*

Con la información de la morfometría cromosómica fue posible confeccionar los siguientes idiogramas de Norte a Sur por raza (Figura 6). Se ocupó la información publicada de razas Norte y Sur, adaptando los porcentajes a nueve pares de cromosomas. En esta figura se observa gráficamente las diferencias en cuanto a tamaño y forma, además se comparan los pares entre razas en términos de complemento cromosómico.



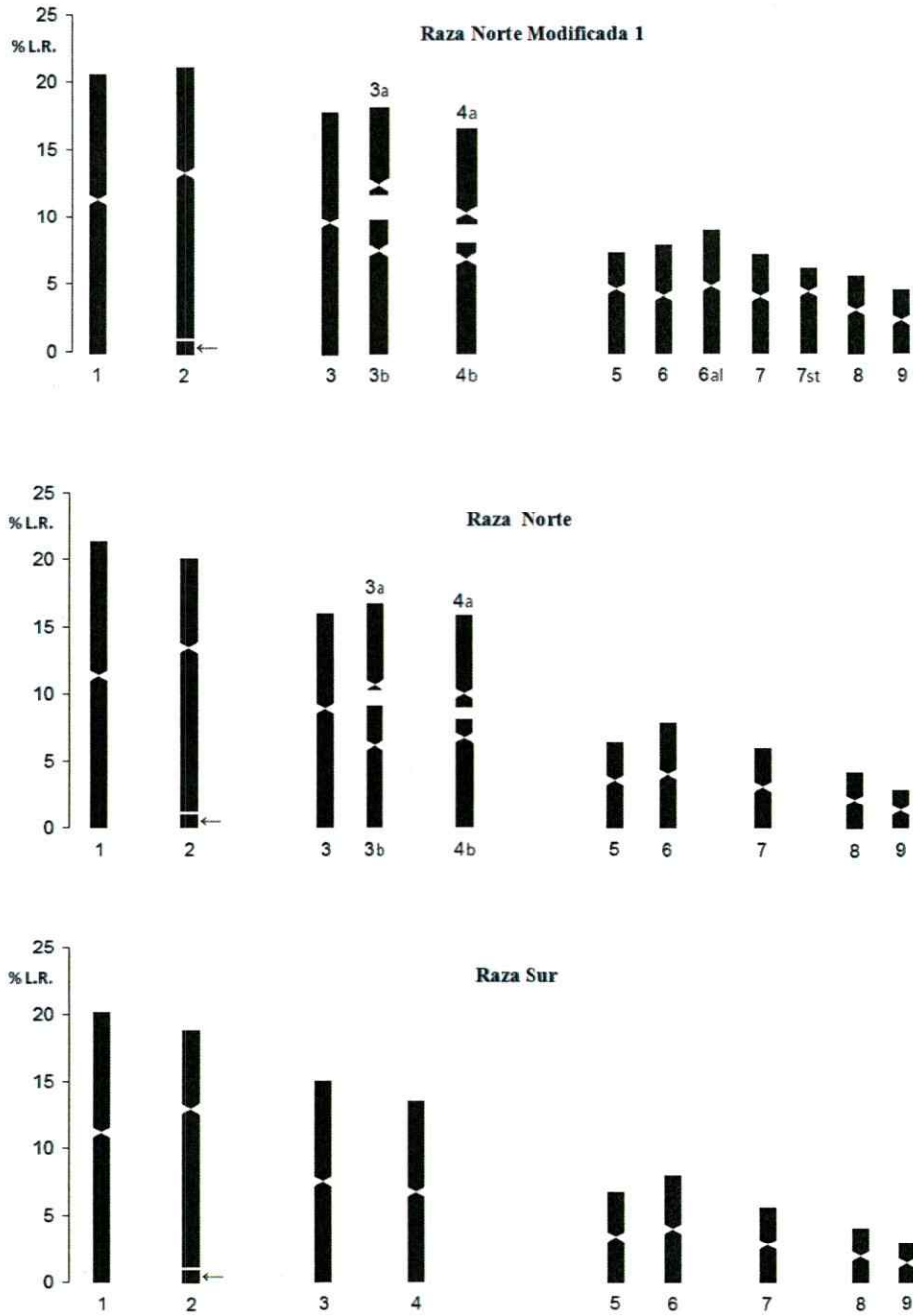


Figura 6. Idiogramas representativos de las seis razas cromosómicas analizadas de *L. monticola*. Las flechas indican la presencia de constricción secundaria y satélite.

El Cario-idiograma obtenido para la nueva raza y las restantes analizadas se muestra en la Fig. 7. Se evidenció claramente las diferencias entre cromosomas homeólogos, se agrupó a los pares cromosómicos gráficamente en cuanto a su morfometría, y finalmente se distinguió entre cromosomas de tipo ancestral y derivados tanto entre como dentro de las razas.

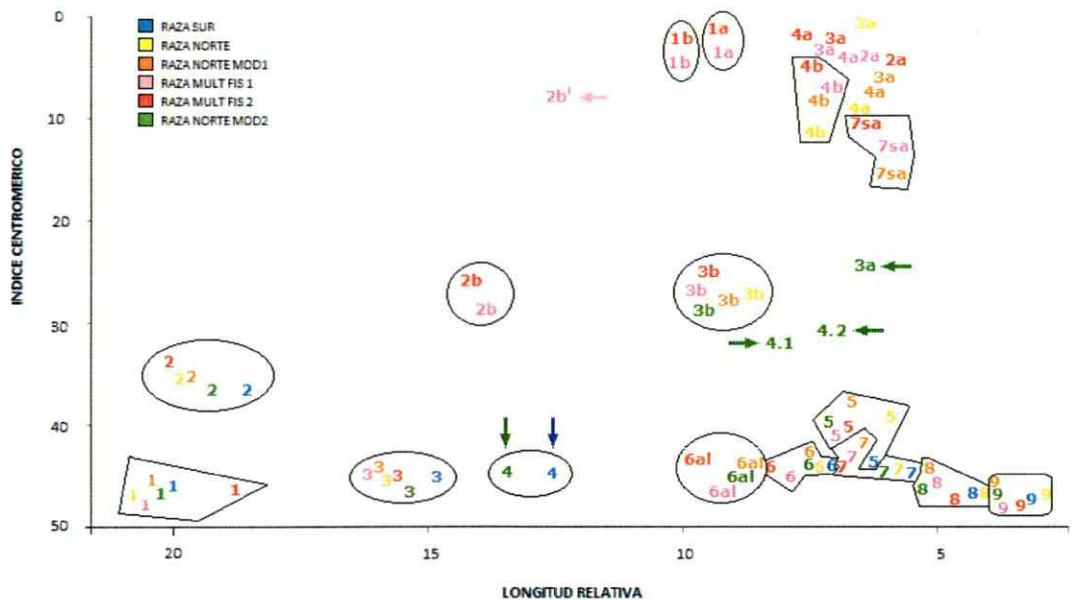


Figura 7. Cario-idiograma obtenido para las seis razas cromosómicas de *L. monticola*. Se agrupó en figuras geométricas a los cromosomas similares entre las razas. Las flechas indican cromosomas derivados y únicos.

Para la raza Norte Mod 2 se aprecian cromosomas únicos en forma y tamaño (3a, 4, 4.1, 4.2 flechas color verde) ya que exhiben fisiones diferentes del resto y sus parámetros morfométricos también fueron distintos. Además el macrocromosoma 4, metacéntrico, fue similar en sus características morfométricas con la raza Sur (flechas verde y azul). Para la raza MF 1 el producto de fisión del brazo largo del macrocromosoma 2 (2b' flecha color púrpura), resultó ser un elemento único.

3.4 Componentes Principales y Análisis Discriminante Lineal de Medidas Cromosómicas

El análisis de Componentes Principales (PCA), realizado con 134 individuos pertenecientes a las seis razas cromosómicas estudiadas, y empleando información de las variables morfométricas de cada cromosoma, reveló que los dos primeros ejes de componentes principales representaron el 46.56% de la varianza total, siendo el primer componente (33.80%), aproximadamente tres veces mayor al segundo componente (12.76%) (Fig. 8).

Ambos componentes separaron claramente a cada una de las razas en el espacio multivariado, y se pudo distinguir a las variables más importantes dentro de los componentes formados. La raza Sur y las razas MF 1 y 2, están explicadas por el componente número uno, las variables que englobó este componente para la raza Sur fueron: C3, C3', IC C3, C4, C4', IC C4, C7, C7' IC C7, C9, C9' y IC C9, y para las razas MF 1 y 2: C2 fa, C2 fa', IC C2fa, C2 fb, C2 fb', IC C2fb, C2 fb*, C2 fb'*, IC C2fb*, C3 fa, C3 fa', IC C3fa, C3 fb, C3 fb', IC C3fb, C4 fa, C4 fa', IC C4fa, C4 fb, C4 fb', IC C4fb, C6 al, IC 6al, C7 st, C7 st' y IC C7 st. Las razas Norte y Norte Mod 1 fueron bien explicadas por el segundo componente principal que a su vez está compuesto por las variables: C1 C1', IC C1, C2, C2' IC2, C3, C3' y IC C3. La raza Norte Mod 2 se separó del resto de las razas al presentar las siguientes variables: C4, C4', IC C4, C4fa*, C4fb*, IC 4fa*, IC 4b*, C3fa*, IC3fa'*, C6, C6', y IC C6.

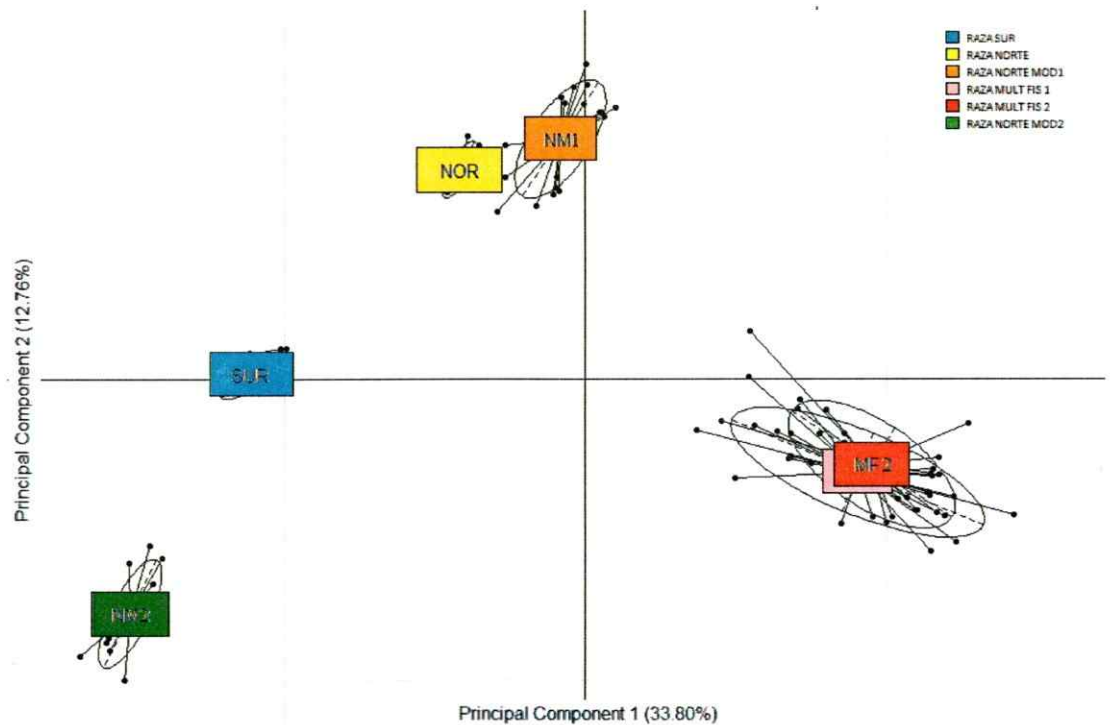


Figura 8. Gráfico de los primeros dos Componentes Principales utilizando la morfometría cromosómica de las 6 razas de *L. monticola*.

El Análisis discriminante lineal reveló que las trazas de los cinco ejes discriminantes lineales fueron: 0.611, 0.205, 0.142, 0.035, y 0.006 respectivamente. Los ADL 1 y 2 fueron seleccionados en base a la cantidad de varianza representada y muestran la posición segregada de los individuos de las seis razas analizadas (Fig. 9), luego los discriminantes 3, 4 y 5 generan separaciones entre las razas, pero menos acotadas. La función predictora del ADL indica que existe una asignación del 100% de los individuos a su grupo original o raza cromosómica, salvo para las razas MF 1 y MF 2 debido a que los parámetros utilizados no permitieron una diferenciación mayor.

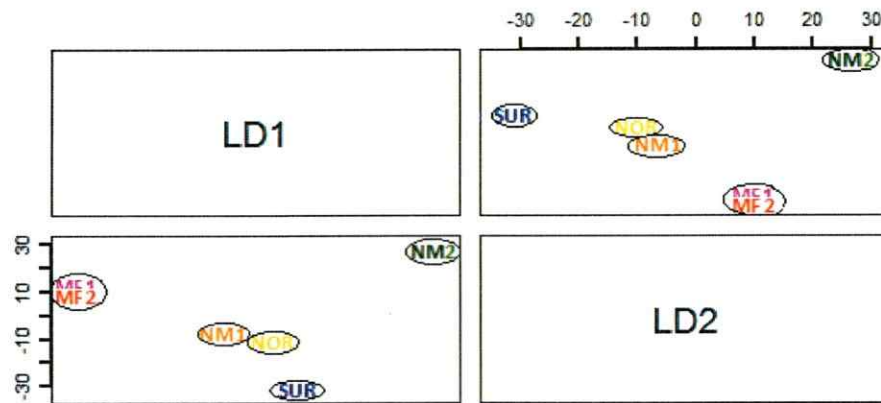


Figura 9. Análisis Discriminante Lineal (ADL) de las variables morfométricas cromosómicas de las 6 razas de *L. monticola*. Se muestran los discriminantes 1 y 2.

3.5 Estructura poblacional inferida con datos cromosómicos

Las variantes cromosómicas “alélicas” de los primeros siete pares fueron analizadas a nivel racial en 81 individuos (anexo 2). Los resultados obtenidos para la raza Norte Mod 2 determinaron el cambio de nomenclatura de “alelos” al encontrar nuevos y únicos rearrreglos cromosómicos que involucraron los cromosomas 3 y 4. Ambos pares se presentaron en heterocigosis, con un cromosoma en su forma ancestral. Para el par 3 se denominó como alelo X a la representación de una fisión céntrica, que involucra ganancia de material en uno de sus productos (brazo corto del cromosoma 3a), este hecho se constató a nivel de medidas relativas cromosómicas, y así, todos los individuos fueron diagnosticados como AX. Para el par 4, y de forma similar, se designó el alelo Y para representar a los productos de fisión que acompañan al cromosoma 4, siendo todos los individuos diagnosticados como AY.

Los pares monomórficos de tendencia metacéntrica (AA) fueron: el par cromosómico 5 para todas las razas; los pares 1 y 2 sólo en las razas Sur, Norte, Norte Mod

1 y Norte Mod 2, en tanto, el par 6 sólo en las razas Sur y Norte, y el par 7 en las razas Sur, Norte, y Norte Mod 2.

En cuanto a variabilidad genético-cromosómica, en la raza sur, no se detectó evidencias de desviación al HWE, encontrándose que He y Ho presentaron valores similares. En el resto de las razas se evidenció déficit de heterocigotos (raza MF1) y exceso de heterocigotos para: Norte, Norte Mod 1, MF 2, y Norte Mod 2. El valor más alto de Ho fue de la raza Norte Mod 2 ($H_o = 0.38$), y el valor más bajo de la raza Sur ($H_o = 0.00$). El número de “alelos” por locus fue idéntico para las razas MF1 y MF2 (1.7), y lo mismo ocurrió para las razas Norte Mod 1 y Norte Mod 2 (1.4). Los valores de FIS global, considerando la totalidad de loci, fueron sometidos a test de permutaciones (5000) para estimar su significancia y resultaron no significativos tanto para exceso (razas Norte, MF 2 y Norte Mod 2) como para déficit de heterocigotos (Norte Mod 1 y MF 1) (Tabla 4).

Tabla 3. Heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho) para las diferentes razas, valor p HWE, número de alelos por par cromosómico o locus (A). Se muestra además el índice de consanguinidad Fis y su respectivo valor p realizado con 5000 permutaciones. MONOM: variantes cromosómicas monomórficas.

RAZA	He	Ho	p-HWE	A	FIS	p-FIS
Norte Mod 2	0.2	0.38	0.42	1.42	- 0.81	0.9
Múltiple Fisiones 2	0.22	0.23	0.71	1.71	- 0.01	0.67
Múltiple Fisiones 1	0.30	0.26	0.71	1.71	0.18	0.13
Norte Mod 1	0.16	0.17	0.42	1.42	0.01	0.65
Norte	0.06	0.07	0.14	1.14	- 0.03	0.71
Sur	0.00	0.00	—	1.00	MONOM.	—

Todos los valores pareados de F_{ST} racial resultaron estadísticamente significativos (Tabla 4), y lograron evidenciar estructuración racial mayor a la media (F_{ST} promedio global = 0.66).

Tabla N° 4. Valores de FST para la codificación alélica de los siete primeros pares cromosómicos de las seis razas de *L. monticola*.

FST	Norte Mod 2	Múltiple Fisiones 2	Múltiple Fisiones 1	Norte Mod 1	Norte
Múltiple Fisiones 2	0.66**				
Múltiple Fisiones 1	0.57**	0.14*			
Norte Mod 1	0.49**	0.52**	0.42**		
Norte	0.62**	0.71**	0.62**	0.25**	
Sur	0.65**	0.87**	0.8**	0.84**	0.84**

Valores significativos (*) y altamente significativos (**)

3.6 Variación Morfológica

El análisis de componentes principales (PCA), en base a medidas morfológicas de 431 individuos, mostró que los primeros dos ejes de componentes principales representaron el 20,34% de la varianza total de los datos, 10,60% para el primer componente y 9,74% para el segundo (Fig. 10). El primer componente principal explica la separación de la Norte Mod 2 junto con las razas próximas geográficamente (MF 1 y MF 2), y también a la raza Norte. Este componente englobó la mayoría de las variables utilizadas, siendo posible identificar a las que diferenciaron a la nueva raza: LASUP 1B, SAB, TEM y SAME. La raza Sur fue explicada claramente por el componente principal dos, que incluye como variables principales: POSPA, LOR A, DOS, CATEM, y GUS. Se buscó una posible variación en los caracteres atribuibles a dimorfismo sexual, no encontrándose diferencias entre los caracteres usados para machos y hembras.

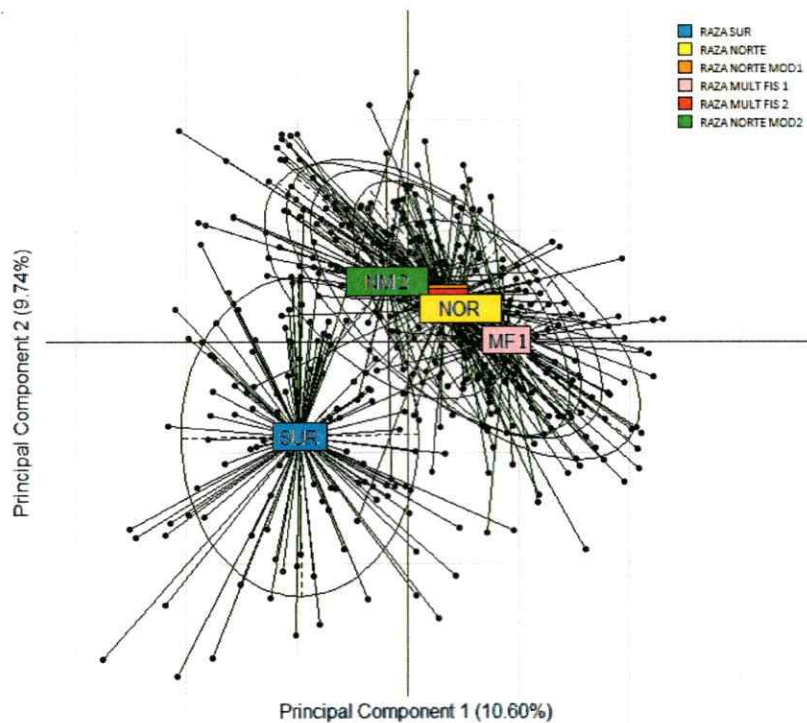


Figura 10. Gráfico de los primeros dos Componentes Principales utilizando los caracteres morfológicos de las 6 razas de *L. monticola*.

El análisis discriminante lineal (ADL), reveló que el valor de la traza para cada uno de los discriminantes obtenidos fue de: 0.523, 0.232, 0.107, 0.086, y 0.05 respectivamente. Los dos primeros ejes discriminantes fueron seleccionados en base a la cantidad de varianza representada y mostraron la segregación entre las seis razas cromosómicas utilizadas (Fig. 11). La función predictora del ADL indica que existe un alto porcentaje de asignación de individuos en las razas: Norte (100%), Sur (96,58%), Norte Mod 1(77,27%), Norte Mod 2 (75%) y MF1 (72,3%). Un menor porcentaje se observó en la raza MF 2 (57,53%).

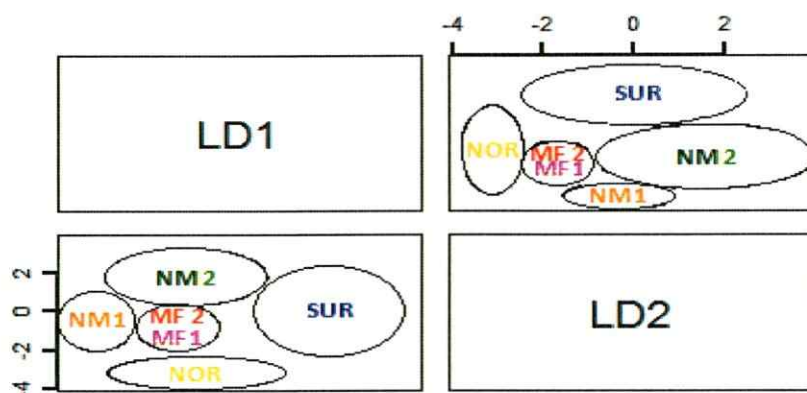


Figura 11. Análisis Discriminante Lineal (ADL) de las variables morfológicas de las 6 razas de *L. monticola*. Se muestran los discriminantes 1 y 2.

3.7 Secuenciación del gen *Cyt b*

Se logró secuenciar exitosamente 87 individuos para todas las razas en estudio. Se obtuvo un fragmento de 637 pb el cual no presentó ambigüedades, se observó 39 haplotipos (k), 129 sitios polimórficos (s), diversidad haplotípica $H = 0,961$, una diversidad nucleotídica $\pi = 0,05$, y un número promedio de diferencias entre pares de secuencias $\Pi = 36,20$. En la Tabla 6 se muestra los índices de diversidad y pruebas de neutralidad a nivel racial.

Tabla 5. Índices de diversidad nucleotídica, estadísticos de neutralidad y parámetros de distribución mismatch de *Cyt b* en las seis razas de *L. monticola*. n= número de individuos, k= número de haplotipos, s= número de sitios polimórficos, Π = número promedio de diferencias de pares de secuencias, D= estadístico de Tajima, F_u 's=estadístico de Fu, τ y θ =parámetros mismatch, R= índice raggedness. Se indica en cursiva los valores de desviación estándar.

RAZA CROMOSOMICA	n	k	s	Π	D	valor p D	Fu's	valor p Fu's	T	θ	θ^*	índice R	valor p índice R
NORTE MOD 2	21	10	29	7.571 +/- 3.680	-0.234	0.441	0.7	0.652	5.084	3.35	38.799	0.061	0.07
MF 2	17	9	41	17.036 +/- 7.975	1.675	0.977	3.63	0.917	34.34	0	47.73	0.044	0.18
MF 1	20	6	8	1.563 +/- 0.972	-1.033	0.166	-0.95	0.248	0.027	0	9999	0.102	1
NORTE MOD 1	5	4	14	6.4 +/- 3.651	-0.347	0.456	0.88	0.572	9.93	0	137.96	0.23	0.56
NORTE	9	7	32	11.888 +/- 5.947	0.049	0.548	0.64	0.605	19.758	0	56.794	0.175	0.17
SUR	15	4	23	5.352 +/- 2.735	-1.007	0.16	4.79	0.958	0	0	428.125	0.196	0.95

El número de haplotipos (k) mostró su valor más alto en la raza Norte Mod 2 (10), y los valores más bajos en las razas Sur y Norte Mod 1 (4), valores intermedios de este índice se observaron en las razas: Norte, MF1 y MF2. En cuanto al número de sitios polimórficos (s), las razas: MF2, Norte Mod 2 y Sur comparten los valores más altos (41, 32 y 29, respectivamente). El valor más bajo de este índice se observó en la raza MF1. Finalmente, el número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π) presentó su valor más alto en la raza MF2 (17.036), y el valor más bajo se observó en la Raza Sur (5.352). La raza Norte Mod 2 exhibió valores promedio (7.571).

3.7.1 Neutralidad e Índice de Rageddness

Los valores obtenidos para el test de Tajima (D), fueron variables y evidenciaron: valores cercanos al equilibrio (raza Norte, $D = 0.049$), negativos (razas Norte Mod 1; $D = -0.347$, MF1; $D = -1.033$, Norte Mod 2; $D = -0.234$), y positivos (raza MF2; $D = 1.675$). Los valores para el test de Fu (Fu 's) fueron positivos (razas Sur, Norte, Norte Mod 1, MF2 y Norte Mod 2), y de valor negativo para la raza MF1. Los valores raciales de estos test, así como el índice de Rageddness no fueron significativos.

3.7.2 Red de Haplotipos

La red de haplotipos obtenido por el algoritmo median-joining se muestra en la

Fig. 12.

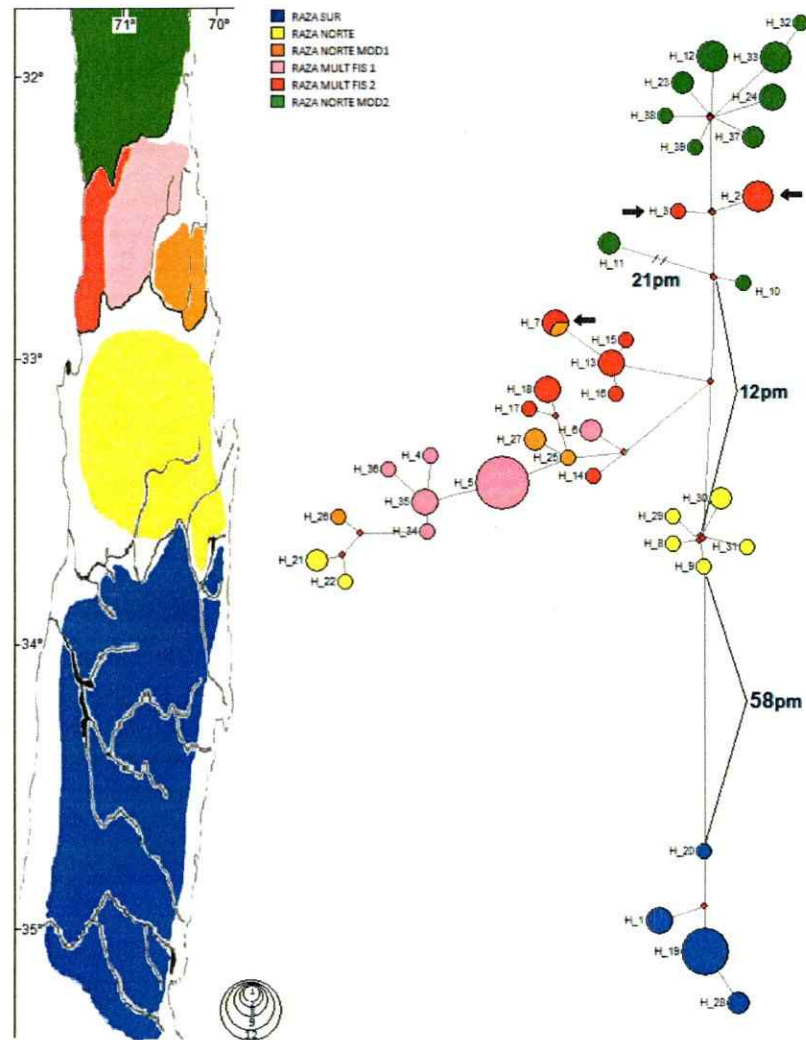


Figura 12. Red de haplotipos para las secuencias de Cyt b de las seis razas de *L. monticola*. Se indica con flechas los haplotipos no concordantes con la distribución geográfica racial y los pasos mutacionales (p m).

Las razas que poseen haplotipos de mayor frecuencia o centrales son la raza Sur (H 19), y la raza MF1 (H 5), el resto posee haplotipos de frecuencia similar. La raza Norte Mod 2 se separó de la raza Sur por 70 pm y de la raza Norte por 12 pm. Solo hubo haplotipos compartidos entre las razas MF 2 y la raza Norte Mod 1 (H7). En general se observó agrupaciones bien definidas y correspondientes en gran medida con el rango geográfico de distribución que ocupa cada raza, salvo para el caso de los haplotipos H2 y H3, pertenecientes a la raza MF2 y que aparecen enlazados a la red formada por los haplotipos de la raza Norte Mod 2.

3.7.3 Filogenia del gen Cyt b

Máxima Parsimonia

De un total de 1000 árboles, el más parsimonioso de estos (Fig. 13) presentó 345 pasos, un índice de consistencia (C. I.) de 0.56, índice de homoplasia (H. I.) de 0.44, e índice de retención de 0.93 (R. I.). Se puede apreciar la presencia de dos grandes grupos, ambos con máximo soporte de bootstrap. Un grupo contiene a los individuos de la raza sur y el otro está formado por un gran clado representado por individuos de las razas restantes (Norte, Norte Mod 1, MF 1, MF 2 y Norte Mod 2), este a su vez se subdivide en dos, el que emerge primero contiene a los individuos de las razas Norte, Norte Mod 1, MF 1 y MF 2. El otro clado contiene a todos los individuos de la raza Norte Modificada 2 más algunos pertenecientes a la raza MF 2, y con un valor de soporte alto.

Máxima Verosimilitud

El árbol de Máxima Verosimilitud ($\ln L = -2798.44$) se muestra en la figura 14. Exhibe dos grupos principales, uno de ellos emergería con anterioridad y está representado por los individuos de la raza sur con buen soporte de nodos. A partir de este grupo deriva el clado que incluye a las razas restantes agrupando a la raza Norte, Norte Mod 1, MF 1, MF 2 y Norte Mod 2. Los individuos de la raza en estudio comparten un clado bien definido, pero con presencia de algunos individuos de la raza MF 2.

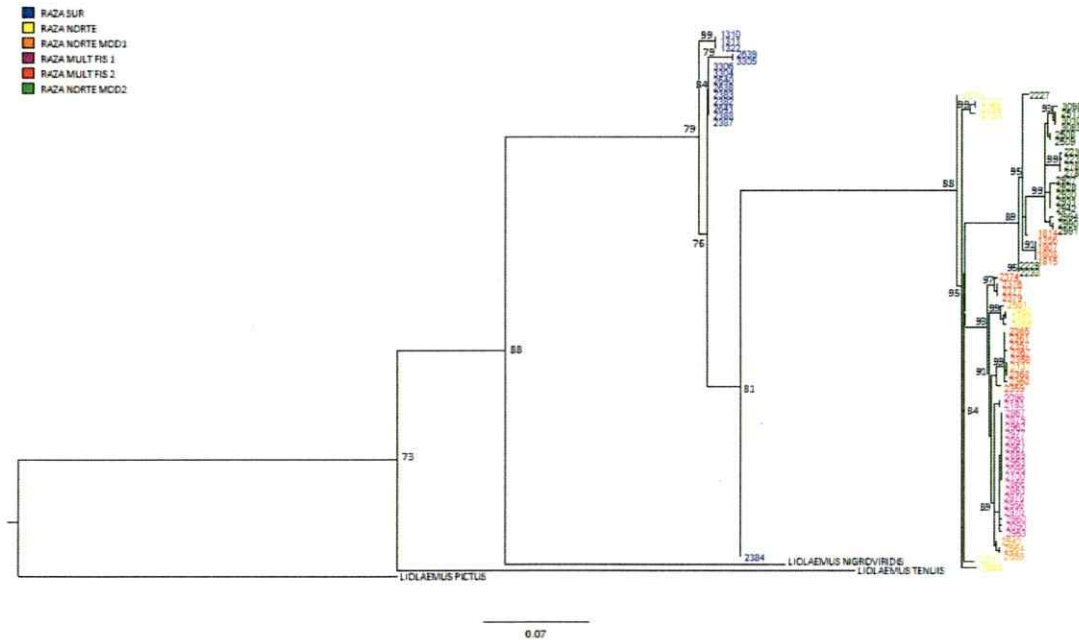


Figura 14. Árbol de Máxima Verosimilitud para el gen mitocondrial citocromo b, usando seis razas cromosómicas de *L. monticola*. Se indica el valor obtenido por bootstrap para cada nodo.

Inferencia Bayesiana

El árbol de inferencia bayesiana con los respectivos valores de probabilidad a posteriori de cada clado se muestra en la Fig. 15. Se aprecia la existencia de un primer clado que incluye a los individuos de la raza Sur, a partir del cual emerge otro gran clado representando a las razas Norte, Norte Mod 1, MF 1, MF 2 y otro que incluye a los individuos de la raza Norte Mod 2 que posee la máxima probabilidad a posteriori y está compartido con individuos de la raza MF 2.

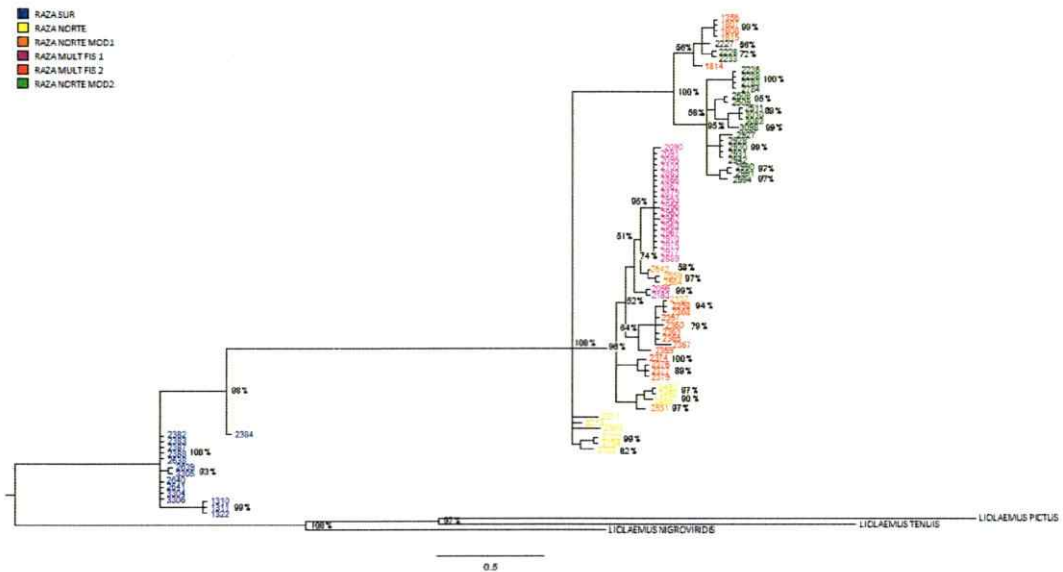


Figura 15. Reconstrucción filogenética para el gen mitocondrial citocromo b, obtenido mediante Inferencia Bayesiana para las seis razas cromosómicas de *L. monticola*. Se indica el valor en porcentaje de la probabilidad a posteriori de cada clado.

3.8 Patrones Aloenzimáticos

El análisis se realizó con 7 loci aloenzimáticos en 333 individuos representativos de las 6 razas cromosómicas (anexo 3). Estas aloenzimas evidenciaron la presencia de polimorfismo, salvo para la enzima LDHa (Lactato Dehidrogenasa, locus a). Los alelos considerados como privativos o únicos a nivel racial, fueron 2 y se encontraron en la raza Norte para la enzima SOD (Superóxido dismutasa) presentando el alelo C, y en la raza Norte Mod 1 para la enzima AAT (Aspartato aminotransferasa) donde se encontró el alelo D.

El análisis de variabilidad genética mostró diferencias no significativas del HWE, y en la mayoría de las razas se evidenció déficit de heterocigotos, salvo para la raza Norte Mod 2. Los valores más altos de la heterocigosidad observada fueron para las raza MF 2 y Norte Mod 2 ($H_o = 0.15$), y el más bajo fue para la raza Norte Mod 1 ($H_o = 0.05$) El número de alelos por locus fue variable en cada una de la razas. Los valores de FIS global, considerando la totalidad de loci, fueron sometidos a test de permutaciones (5000) para estimar su significancia. Todas las razas exhibieron déficit de heterocigotos, siendo este no significativo para las razas Norte Mod 2 y MF 1 y 2, y altamente significativo para el resto de las razas (Tabla 6).

Tabla 6. Heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) para las diferentes razas, valor p HWE, número de alelos por locus (A). Se muestra además el índice de consanguinidad Fis y su respectivo valor p realizado con 5000 permutaciones.

RAZA	H_e	H_o	p-HWE	A	FIS	p-FIS
Norte Mod 2	0.14	0.15	0.42	1.71	0.01	0.47
Múltiple Fisiones 2	0.16	0.15	0.57	2.00	0.05	0.25
Múltiple Fisiones 1	0.12	0.08	0.28	1.85	0.30	0.68
Norte Mod 1	0.07	0.05	0.28	1.85	0.33**	0.00
Norte	0.17	0.11	0.42	2.71	0.31**	0.00
Sur	0.17	0.13	0.71	2.57	0.20**	0.00

Valores altamente significativos (**)

La mayoría de los valores de FST pareados fueron significativos (Tabla 7), mostrando una diferenciación poblacional baja (FST promedio global = 0.22). Los valores más bajos fueron los de las razas del extremo norte que son cercanas geográficamente a la nueva raza.

Tabla 7. Valores de Fst obtenidos para los alelos aloenzimáticos de las seis razas de *L. monticola*.

FST	Norte Mod 2	Múltiple Fisiones 2	Múltiple Fisiones 1	Norte Mod 1	Norte
Múltiple Fisiones 2	0.01				
Múltiple Fisiones 1	0.00	0.00			
Norte Mod 1	0.60**	0.55**	0.62**		
Norte	0.06	0.05*	0.06	0.38**	
Sur	0.05	0.05**	0.06**	0.44**	0.03**

Valores significativos (*) y altamente significativos (**)

4. Discusión

Entender la dinámica de los cambios cromosómicos a nivel de: individuo, población, metapoblación, y especie proporciona un gran desafío al conocimiento básico de la estructura cromosómica, genética poblacional, las formas de recombinación y fijación de nuevos rearrreglos cromosómicos. Esto resulta esencial para comprender procesos de adaptación a ambientes nuevos o cambiantes que en último término se traducen en desafíos a la conservación y al equilibrio de la biodiversidad.

El complejo *Liolaemus monticola*, que incluye razas con diferente dotación y variabilidad cromosómica, exhibe mutaciones estructurales como inversiones y otros procesos que afectan la recombinación y adquieren una importancia inmediata al actuar como barreras semipermeables o absolutas al flujo genético y cromosómico, aspectos que podrían estar involucrados directamente en procesos de diferenciación en este grupo de vertebrados.

Variación Cromosómica y Especiación

Las primeras indicaciones que *Liolaemus* muestra una gran variabilidad cromosómica comparable con otros géneros de iguanianos cercanamente relacionados, sugieren que los cambios cromosómicos podrían facilitar la especiación (Lamborot 1979, Lamborot et al. 1981, Navarro et al. 1981). Varios aspectos de la variación cromosómica observada en *L. monticola* son concordantes y comparables con el complejo *Sceloporus grammicus* (Lamborot 1991, Sites y Reed 1994). Ambas especies de lagartos han generado radiaciones extensivas debido a cambios cromosómicos independientes en un corto periodo de tiempo, variaciones cariotípicas intra e interespecíficas y altos polimorfismos, como también la existencia de zonas híbridas parapátricas entre razas cromosómicas (Sites y Reed 1994, Vásquez et al 2007).

El patrón de variación cromosómica observado en el complejo *L. monticola* ha sido explicado a través el modelo de especiación en cascada de Hall (Hall 1973, 2010) propuesto para *S. grammicus* en México. Este modelo correlaciona la existencia de cambios cromosómicos con una rápida especiación en este grupo de lagartos. Plantea básicamente que las mutaciones cromosómicas presentes en una raza derivada (reordenamientos Robertsonianos, inversiones pericéntricas, etc.) experimentarían una serie de cambios cromosómicos sucesivos, lo que determinaría varios eventos de diferenciación con surgimiento de otras razas derivadas, y eventualmente especiación (Lamborot, 1993).

Estos aspectos concuerdan con lo postulado en el surgimiento de las razas de sur a norte, de *L. monticola* observando cambios sucesivos, y aditivos que implican mayor diversidad citogenética dando origen a las diversas razas cromosómicas antes mencionadas (Lamborot, 2008).

Patrones de Citogenética Poblacional, Variabilidad y Flujo Cromosómico.

La raza cromosómica Norte Modificada 2, geográficamente circunscrita al norte del Río Petorca, posee características que la distinguen claramente de las restantes con $2n=35-38$, 13 a 16 macrocromosomas y 22 microcromosomas. Los rearrreglos cromosómicos (polimorfismos de fisión del par 3 y 4), como el número diploide son únicos para esta raza y han sido corroborados en las diaquinesis meióticas de los machos. El polimorfismo del par 4 se presenta en todos los híbridos naturales entre las razas Norte, $2n=38$ a 40 x Sur $2n=34$ de *L. monticola* (Lamborot, 1991) con quiasmas característicos y altos niveles de aneuploidía en los individuos machos. Los análisis citogenéticos poblacionales, codificando y visualizando a los cromosomas como un conjunto heredado generacionalmente resultaron muy valiosos en este estudio y en otros realizados con anterioridad (Lamborot 1998), es así como el PCA, el ADL y el análisis de

estructura cromosómica poblacional corroboran estas diferencias frente a las razas: Sur $2n=34$, Norte, $2n=38$ a 40 , Norte Mod 1, $2n=38-40$, y MF 1 y 2, $2n=41-44$.

Los estudios de las razas cromosómicas en la zona central de Chile han descrito que el número cromosómico $2n$ aumenta de sur a norte debido a fisiones céntricas (Lambrot, 2008). Contrario a lo esperado, la raza cromosómica Norte Mod 2 mostró un menor número de macrocromosomas fisionados, comparada con las razas cromosómicas próximas (MF 1 y MF 2), provocando la interrupción del patrón clinal de complejidad cromosómica creciente. Al igual que lo observado en esta tesis, en *S. grammicus* hay existencia de razas cromosómicas con polimorfismos en los pares 3 y 4 que probablemente surgen debido a rearreglos independientes. Un ejemplo es el surgimiento de una la derivada fisión seis (F6, $2n = 34$) de forma independiente a la secuencia de derivación y de aumento del número cromosómico, a partir de la raza primitiva o estándar (S, $2n = 32$) (Hall 2010). Esto podría explicar las similitudes observadas con la raza Sur y la raza Norte Mod 2, a pesar de la distancia geográfica (560 km. aprox.), ya que presentan una alta frecuencia de macrocromosomas de tipo conservativo compartidos (4 pares) y la cantidad de microcromosomas es la misma (11 pares), lo que sugiere un patrón citogenético afín.

Se ha observado en algunas especies endémicas del género *Liolaemus* en Chile, como *L. monticola*, una posible correlación entre parámetros de diversidad cromosómica y de gradientes ambientales, apoyando la inferencia de que los cambios citogenéticos, como las fisiones céntricas, tendrían un componente adaptativo (Lambrot 2008). Esta propuesta se basa en la presencia de estas fisiones en todos los cariotipos al norte del Río Maipo (Lambrot 1993, Lambrot y Álvarez-Sarret 1989) ocupando hábitats más xéricos e inestables en cuanto a precipitaciones. Estos organismos con estos cromosomas fisionados podrían prosperar bajo estas presiones selectivas más que otros organismos con otros tipos de rearreglos. Para los polimorfismos cromosómicos de esta raza Norte Mod 2 esta propuesta resulta congruente.

La situación actual de las razas de *L. monticola* podría explicarse en el Pleistoceno. Individuos con cariotipo similar a la raza Sur, $2n=34$ habrían ocupado la actual distribución geográfica de este complejo. Un primer evento de colonización habría dado origen a la raza Norte estableciendo sus rearrreglos característicos (fisión céntrica homocigota del par 4 y polimorfismo del par 3), que se habrían extendido en el área norte del Río Maipo (Lamborot 1991; Lamborot y Alvarez-Sarret 1993). Luego sobre la raza Norte se produce el cambio de los pares 6 y 7 ambos polimórficos, estableciendo así a la raza Norte Mod 1 considerada zona de hibridación primaria (Lamborot et al. 2003) que se expande hacia el norte del Río Aconcagua (Lamborot et al. 2012). A continuación una serie de cambios que incluyen las fisiones céntricas de los pares 1 y 2 se establecen en los rangos andino y costero entre los ríos Aconcagua y Petorca, originando así a las razas MF 1 y MF 2 (Lamborot et al. en preparación). Se reconocen zonas de hibridación cromosómica que constatan estos reordenamientos.

En base a caracteres cromosómicos y aloenzimáticos, Vásquez et al. (2007) apoyarían la hipótesis de una colonización iniciada por la raza Sur que dió origen a las razas cromosómicamente más derivadas, las cuales continúan en un posterior proceso de colonización, hibridación y reemplazo. Esta hipótesis es consistente con estudios morfológicos (Lamborot y Eaton, 1992, 1997; Lamborot et al. 2003), y con la diferenciación genética entre las razas (Torres-Pérez et al. 2007, Lamborot, 2008).

En resumen, la presencia de rearrreglos únicos en la raza Norte Mod 2, junto con la disminución de fisiones céntricas en comparación con las razas geográficamente próximas, permite postular que la concatenación en la secuencia de derivación y reemplazo, seguiría un proceso independiente a partir de una antigua colonización de la raza Sur que involucraría fisiones céntricas, seguidas de inversiones pericéntricas incluyendo segmentos cromosómicos de mayor tamaño.

Morfología

La variación observada de los caracteres morfológicos a partir de individuos representativos fue congruente con trabajos anteriores para la separación de las razas cromosómicas en bloques sur y norte (Lamborot y Eaton 1992, 1997; Lamborot et al. 2003; Aravena 2013). Usando la totalidad de las razas cromosómicas se puede concluir que la raza Norte Mod 2 está estrechamente relacionada con las razas próximas, y comparte la mayoría de los caracteres que inciden en su diferenciación, aun así fue distinguible principalmente por cuatro caracteres morfológicos: SAME, LASUP 1B, TEM, y SAB. Al realizar los análisis individuales, se observó mediciones morfométricas y merísticas similares y compartidas entre las seis razas utilizadas (figura no incluida).

ADN mitocondrial

El gen Citocromo b mostró características que permiten distinguir a la raza Norte Mod 2 de las restantes. Posee una alta diversidad genética tanto en número de haplotipos, como en número de sitios polimórficos. La red de haplotipos obtenida mostró una secuencia tipo clinal y acorde con la separación geográfica y la variación cromosómica, además presentó evidencia de una variación genética intrarracial alta (haplotipo 11). La cantidad de pasos mutacionales que separa a esta raza de la Sur (considerada ancestral), indicaría ha tenido el tiempo de divergencia suficiente para establecerse como un grupo bien definido y revela una menor divergencia respecto a la raza Norte. También se apreció la presencia de haplotipos característicos de la raza MF 2 (haplotipos 2 y 3) intercalados en el área de distribución de la raza Norte Mod 2. Si bien, ambas razas se encuentran separadas por el Río Petorca, considerado una barrera al flujo génico, este hecho indicaría migración de individuos posterior a la formación de estas razas.

Las reconstrucciones filogenéticas ponen de manifiesto la separación en grupos Norte y Sur respecto al Río Maipo. Las tres metodologías mostraron similitud en cuanto a la ubicación de la raza Norte Mod 2 en relación a las restantes y en establecer su probable origen posterior al establecimiento de la raza Norte. Además se observó en el clado de esta raza la presencia de individuos pertenecientes a la raza MF 2. Estudios anteriores con secuencias de Cyt b en las razas Sur, Norte, Norte Mod 1, MF 1 y MF 2, revelan de forma similar la existencia de los grupos sureño y nortino, con presencia de individuos no concordantes geográficamente entre ellos (no observado en esta tesis), indicativos de flujo génico entre razas cromosómicas (Torres-Pérez et al. 2007, Aravena, 2013). Este hecho se podría llegar a explicar por la evidencia que existe en vertebrados de que los cromosomas estarían seleccionados por sobre los genes mitocondriales (Boissinot y Boursot, 1997).

Se logró establecer en esta tesis una concordancia entre una división cromosómica, genética y geográfica, destacando el efecto de las barreras fluviales. En un estudio anterior en *L. monticola* se sugiere que el proceso de separación alopátrica no sería reciente considerando la topología monofilética entre ambos grupos y una alta divergencia de secuencias (Torres-Pérez et al. 2007). Los presentes resultados son coincidentes también con análisis previos de tipo cromosómico (Lambrot 1991, Lambrot y Alvarez-Sarret 1993), morfológico (Lambrot y Eaton 1992, Lambrot et al. 2003) y aloenzimático (Vásquez et al. 2007).

Aloenzimas

Los resultados aloenzimáticos son los que presentaron la menor resolución para distinguir a las razas. El análisis de estructura poblacional mostró casi nula diferenciación entre ellas. La raza Norte Mod 2 no se diferenció de las geográficamente próximas para los 7 loci utilizados. Estudios anteriores (Vásquez 2002, Vásquez et al. 2007) en base a 14 loci detectaron

estructuración, alelos privativos raciales originados por mutación, y evidenciaron un nexo entre patrones aloenzimáticos de la raza Norte Mod 2 con la raza Sur en tres localidades al norte del río Petorca (Salamanca, Culimó y Tilama).

El Río Petorca como barrera al flujo de genes

Los resultados demuestran que el río Petorca es una barrera efectiva al flujo cromosómico, y por lo tanto circunscribe el área de distribución de la nueva raza. En cuanto a los caracteres morfológicos y secuencias mitocondriales, la separación es parcial, y no se pudo detectar el efecto de esta barrera con el análisis de aloenzimas.

Estudios en *L. monticola*, establecen de forma clara la separación de razas cromosómicas por barreras fluviales: El Río Maipo y su afluente el Río Yeso separa a las razas Norte y Sur (Lamborot 1991, Lamborot y Álvarez-Sarret 1993); el río Aconcagua separa a la raza Norte de la raza Múltiples Fisiones 1 (Lamborot 1998). El Río Colorado, un afluente del Aconcagua separa a la raza Norte de la raza Norte Modificada 1 (Lamborot et al. 2012). Estos resultados entregan evidencia de que estos ríos han sido importantes en la diferenciación cromosómica y morfológica (Lamborot y Eaton 1992, 1997; Lamborot et al. 2003). Distintos niveles de diferenciación obtenidos con ADNmt y patrones aloenzimáticos apoyan la idea que estas barreras disminuyen el flujo génico (Torres-Pérez et al. 2007; Vásquez et al. 2007; Páez 2010; Aravena 2013).

Hace décadas Pounds y Jackson (1981) indicaron que las barreras geográficas impuestas por ríos pueden facilitar la diferenciación, o al menos limitar la re-expansión de poblaciones divergentes. Varios estudios a nivel mundial se han centrado en los cambios experimentados por las barreras fluviales y como estos promueven la divergencia entre poblaciones de variados organismos. Se han abordado desde el punto de vista de la introgresión de genes (Lugon-Moulin

et al. 1999), patrones filogeográficos (Gehring et al. 2012), y estructura genética (Colombi et al. 2010). Es por lo tanto posible sugerir que el Río Petorca, desde su establecimiento (Pleistoceno, última o penúltima glaciación aprox.), ha sido una barrera efectiva para mantener a la nueva raza del complejo *L. monticola* separada del resto.

5. Conclusiones

1. La nueva raza cromosómica Norte Modificada 2 se caracteriza por cromosomas propios y ocupa un área bien delimitada al sur por el Río Petorca, el que funcionaría como barrera al flujo genético-cromosómico.

2. La sucesión de cambios crecientes en la complejidad cromosómica diploide sur-norte se ve interrumpida en esta raza. Las similitudes cromosómicas compartidas con la raza Sur, sugerirían su probable origen en base a eventos mutacionales independientes, a partir de una antigua colonización de esta última.

3. El análisis basado en la morfología pudo distinguir a esta raza, en base a algunos caracteres únicos, pero existe similitud en la mayoría de los rasgos morfológicos con las razas geográficamente próximas.

4. El marcador mitocondrial citocromo b, tanto a nivel filogeográfico como filogenético, diferenció a esta raza de las restantes y permitió evidenciar un posible flujo de genes con la raza geográficamente próxima. La separación racial es concordante con la distribución geográfica delimitada por barreras fluviales.

6. Referencias

- Acosta N, López E, González N, Fernández MJ & Rojas de Arias A. (2001) Isoenzyme profiles of *Triatoma infestans* populations from eastern and western regions of Paraguay. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud 1: 2001/02.
- Aljanabi SM & Martínez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research 25: 4692–4693.
- Aravena N (2013) Niveles de introgresión interracial en *Liolaemus monticola* (Iguanidae). Tesis de Magíster. Universidad de Chile.
- Arnold, M.L. (1997) Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press, Nueva York. 232 pp.
- Astete P (2011) Estudio comparativo de los patrones de recombinación vía quiasmática en poblaciones de dos razas cromosómicas de *Liolaemus monticola* (Sauria:Iguanidae) y una zona de hibridación. Memoria para optar al Título de Profesor de Biología y Ciencias Naturales. Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.
- Avise JC (2000) Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, United Kingdom. 447 pp.
- Baverstock P. R., Adams M., Maxson L., & T. H. Yosida (1983) Genetic Differentiation among karyotypic forms of the black rat *Rattus rattus*. Genetics 105 969-983.
- Bandelt H-J, Forster P, & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol 16:37-48.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N. & F. Bonhomme. (2004) GENETIX 4.05, Logiciel sous Windows TM pour la Génétique des Populations. Montpellier: Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II.

Boissinot, S., & Boursot, P. (1997) Discordant phylogeographic patterns between the Y chromosome and mitochondrial DNA in the house mouse: selection on the Y chromosome?. *Genetics*, 146(3), 1019-1034.

Bush GL, SM Case, AC Wilson & JL Patton (1977) Rapid species formation and chromosomal evolution in mammals. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 74: 3942-3946.

Cei JM & F Videla (2002) Singulares hallazgos evolutivos y taxonómicos en géneros de iguánidos relevantes de la herpetofauna andina y de zonas limítrofes. *Multiquina* 11: 67-73.

Claumann C F, Marinho J, de Freitas T RO (2004) New Karyotypes and Some Considerations about the Chromosomal Diversification of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the Coastal Plain of the Brazilian State of Rio Grande do Sul. *Genetica* 121: 25-132.

Colombi, V. H., Lopes, S. R., & Fagundes, V. (2010) Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. *Genetics and molecular biology*, 33(4), 785-789.

de Queiroz K (2005) Different species problems and their resolution. *BioEssays*, 27(12), 1263-1269.

Dobzhansky (1935) Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. *Genetics* 20:366-376.

Dobzhansky (1970) Genetics of the Evolutionary Process. *BioScience* (1971) 21 (16): 879.

Donoso-Barros R (1966) Reptiles de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. 606 pp.

Espinosa G, Díaz-Fernández R, Bequer U, Matos J, Romo Ramos, J & Borrell Y. (2003) Análisis poblacional del camarón blanco cubano (*Litopenaeus schmitti*) utilizando aloenzimas como marcadores genéticos. *Rev. Invest. Mar.* 24:11-16.

Espinoza, N. D., & Formas, J. R. (1976) Karyological pattern of two Chilean lizards species of the genus *Liolaemus* (sauria; iguanidae). *Experientia*, 32(3), 299-301.

Endler J (1977) Geographic variation, speciation and clines. *Monographs in Population Biology* 10. Princeton University Press. 244 pp.

Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010 May;10(3):564-7

Filatov DA (2003) ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. Notes* 2: 621-624.

Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* 147(2):915-25.

Gehring, P. S., Pabijan, M., Randrianirina, J. E., Glaw, F., & Vences, M. (2012) The influence of riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs (*Heterixalus*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 64(3), 618-632.

- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013)** GenBank. Nucleic acids research, 41(D1), D36-D42.
- Goyenechea, I., Mendoza-Quijano, F., Flores-Villela, O., & Reed, K. M. (1996)** Extreme chromosomal polytypy in a population of *Sceloporus grammicus* (Sauria: Phrynosomatidae) at Santuario Mapethé, Hidalgo, México. Journal of Herpetology, 39-46.
- Hall WP (1973)** Comparative population cytogenetics, speciation and evolution of the crevice-using species of *Sceloporus* (Sauria: Iguanidae). Ph.D. Dissertation, Harvard University, Cambridge, Massachusetts. 215 pp.
- Hall WP (2010)** Chromosome variation, genomics, speciation and evolution in *Sceloporus* lizards. Cytogenet Genome Res. 2009;127(2-4):143-65.
- Hall W & Selander R (1973)** Hybridization of Karyotypically Differentiated Populations in the *Sceloporus grammicus* Complex (Iguanidae). Evolution 27: 226-242.
- Harmon, L. J.; Schulte, J. A. Larson, A. & J. Losos (2003)** Tempo and Mode of Evolutionary Radiation in Iguanian Lizards. Science 301: 961 - 964.
- Harpending H C (1994)** Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human Biology Vol 66 (591-600).
- Harrison, R.G. (1990)** Hybrid zones: windows on evolutionary process. D. Futuyma y J. Antonovics [editors.]. Oxford Surveys in Evolutionary Biology 7:69-128.
- Hewitt, G.M. (1988)** Hybrid zones –natural laboratories for evolutionary studies. Trends in Ecology and Evolution 3:158-167.

Hewitt, G.M. (1989) The subdivision of species by hybrid zones: D. Otte y J. Endler [editors.]. Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Jonathon C. Marshall & Jack w. Sites jr (2001): A comparison of nuclear and mitochondrial cline shapes in a hybrid zone in the *Sceloporus grammicus* complex (Squamata; Phrynosomatidae). Mol. Ecol. 10: 435-449.

King M (1993) Species Evolution: The Role of Chromosome Change. Cambridge University Press, New York.

Lamborot, M., Espinoza, A., & Alvarez, E. (1979) Karyotypic variation in Chilean lizards of the genus *Liolaemus* (Iguanidae). Experientia, 35(5), 593-595.

Lamborot, M. Alvarez, E. Campos, I. & Espinoza A. (1981) Karyotypic characterization of three Chilean subspecies of *Liolaemus monticola*. J Hered. 72:328-334.

Lamborot M (1991) Karyotypic variation among populations of *Liolaemus monticola* (Tropiduridae), separated by riverine barriers at the Andes range. Copeia 1991: 1044-1059.

Lamborot M (1993) Chromosomal evolution and speciation in some Chilean lizards. Evolución Biológica 7: 133-151.

Lamborot M (1998) A new and highly polymorphic chromosomal race of *Liolaemus monticola* (Iguanidae) from the "Norte Chico" of Chile. Chromosome Research 6: 247-254.

Lamborot M (2001) Karyotypic polymorphism and evolution within and between the *Liolaemus monticola* (Iguanidae) "northern 2n=38-40" chromosome race populations in central Chile. Revista Chilena de Historia Natural 74: 121-138.

Lamborot M (2008) Herpetología de Chile, Capítulo 7: Evolución cromosómica en Reptiles de Chile. Editores: Vidal, M. y A. Labra. Science Verlag.

Lamborot M & Álvarez-Sarret E (1993) Karyotypic variation within and between populations of *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) separated by the Maipo River in the coastal range of central Chile. *Herpetologica* 49: 435-449.

Lamborot M & Eaton LC (1992) Concordance of morphological variation and chromosomal races in *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) separated by riverine barriers in the Andes. *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 30: 189-200.

Lamborot M & Eaton LC (1997) The Maipo River as a biogeographical barrier to *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) in the mountain ranges of central Chile. *Journal of Zoology, Systematics & Evolutionary Research* 35: 105-111.

Lamborot M & Vásquez M (1998) A triploid of *Liolaemus gravenhorsti* (Tropiduridae) in central Chile. *J. Herpetology* 32:617-620.

Lamborot M, Eaton L & Carrasco BA (2003) The Aconcagua River as another barrier to *Liolaemus monticola* (Sauria: Iguanidae) chromosomal races of central Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76: 23-34.

Lamborot M, Ossa CG, & Vásquez M. (2012) Population cytogenetics of the "Northern Mod 1" chromosomal race of *Liolaemus monticola* Muller & Hellmich (Iguanidae) from central Chile. *Gayana* 76: 10-21.

Levan, A Fredga K, & Sandberg A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* Volume 52: 201-220.

Lobo, F., Espinoza, R. E., & Quinteros, S. (2010) A critical review and systematic discussion of recent classification proposals for liolaemid lizards. *Zootaxa*, 2549, 1-30.

Lugon-Moulin, N., Brünner, H., Balloux, F., Hausser, J., & Goudet, J. (1999) Do riverine barriers, history or introgression shape the genetic structuring of a common shrew (*Sorex araneus*) population?. *Heredity*, 83(2), 155-161. .

Marshall, J. C., & J. W. Sites, Jr. (2001). A comparison of nuclear and mitochondrial cline shapes in a hybrid zone in the *Sceloporus grammicus* complex (Squamata; Phrynosomatidae). *Mol. Ecol.* 10:435–449.

Marshall, J. C., Arévalo, E., Benavides, E., Sites, J. L. & Sites, J. W. (2006) Delimiting species: comparing methods for mendelian characters using lizards of the *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) complex. *Evolution*, 60: 1050–1065.

Mayr E (1942) Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist. Harvard University Press. 334 pp.

Mayr E (1963) Animal Species and Evolution. Harvard University Press. 797 pp.

Mayr E.(2002) The biology of race and the concept of equality. *Daedalus*, Vol. 131, No. 1: 89-94.

Morando, M., Avila, L. J., Baker, J., & Sites Jr, J. W. (2004) Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution*, 58(4), 842-861.

Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2005) MrBayes, version 3.1.2.: Bayesian inference of phylogeny.

Navarro, J., M Sallaberry, A Veloso & J Valencia (1981) Diversidad cromosómica en lagartos (Squamata – Sauria). I: Avances citotaxonómicos. Perspectiva de estudios evolutivos en Iguanidae. Medio Ambiente (Chile) 5: 28-38.

Naviera, H. & A. Fontdevila (1985) The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. IX. High frequencies of new chromosome rearrangements induced by introgressive hybridization. Chromosoma 91: 87-94.

Nylander, J. A. A. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2.

Olmo E, Odierna G, Capriglione T (1993) The karyology of Mediterranean lacertid lizards. In: Valakos ED (ed), Lacertids of the Mediterranean region. Hellenic Zool Soc, Athens, Bonn, Germany. pp 61-84.

Olmo E, T Capriglione & G Odierna (2002) Different genomic evolutionary rates in the various reptile lineages. Gene 295: 317-321.

Olmo E (2005) Rate of chromosome changes and speciation in reptiles. Genetica 125: 185-203.

Páez E (2010) Variación genética aloenzimática en una zona de hibridación, entre dos razas cromosómicas de *Liolaemus monticola*. Memoria para optar al Título de Profesor de Biología y Ciencias Naturales, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.

Palumbi SR (1996) Nucleic acids I: the polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds), Molecular Systematics. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, pp. 205–247.

Patau K (1960) The identification of individual chromosomes, especially in man. Am. J. Human. Genetics, 12: 250-276.

Paull, D., Williams, E. E., & Hall, W. P. (1976) Lizard karyotypes from the Galapagos Islands: Chromosomes in phylogeny and evolution. Museum of Comparative Zoology. Breviora 441: 1-31.

Pincheira-Donoso, D. & Núñez H. (2005) Las especies chilenas del género *Liolaemus* Wiegmann 1834 (Iguania, Tropicuridae, Liolaeminae). Taxonomía, sistemática y evolución. Publicación ocasional Museo Nacional de Historia Natural (Chile) 59: 7-486.

Poe S. & Wiens J. J. (2000) Character Selection and the Methodology of Morphological Phylogenetics. In Phylogenetic analysis of morphological data (J. J. Wiens, ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. Pages 20–36.

Pounds, J. A., & Jackson, J. F. (1981) Riverine barriers to gene flow and the differentiation of fence lizard populations. *Evolution*, 516-528.

R Core Team (2014) A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>. Version 2.13.1.

Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2007) Tracer 1.5. University of Edinburgh, Edinburgh, UK Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.

Rosas J, Sanchez del Barrio J C, Messeguer X, Rozas R (2010) DnaSP v.5.1.0.1 A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* (2009) 25 (11): 1451-1452.

Searle J B (1984) Three new karyotypic races of the common shrew *Sorex araneus* (mammalia: insectivora) and a phylogeny. *Syst. Zool.* 33:184-194.

Searle J B , Fedyk S, Fredga K, Hausser J, Volobouev V.T. (2010) Nomenclature for the chromosomes of the common shrew (*Sorex araneus*). *Comparative Cytogenetics* 4: 87-96.

Schulte J A, Macey, J. R., Espinoza, R. E., & Larson, A. (2000) Phylogenetic relationships in the iguanid lizard genus *Liolaemus*: multiple origins of viviparous reproduction and evidence for recurring Andean vicariance and dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69(1), 75-102.

Schulte J A, Losos J B, Cruz F B, & Nuñez H. (2004) The relationship between morphology, escape behaviour and microhabitat occupation in the lizard clade *Liolaemus* (Iguanidae:Tropidurinae : Liolaemini). *J. Evol. Biol.*17:408-20.

Sites, J. W., & Reed, K. M. (1994) Chromosomal evolution, speciation, and systematics: some relevant issues. *Herpetologica*, 237-249.

Spotorno A E, Fernandez-Donoso R & Pincheira J. (1979) Similitud Cromosómica: Un nuevo método cuantitativo de descripción y comparación. *Arch. Biol. Med. Exp.* 12: 223.

Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.

Swofford, D. L. (2004) Paup 4.0 for Macintosh: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (Software and User's Book for Macintosh). Sinauer Associates, Incorporated.

Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123 (3): 585-95

Torres-Pérez F. (2004) Especiación en saurios de montaña: Sistemática e identidad evolutiva de los *Liolaemus* del grupo *L. monticola* (Liolaemidae). Tesis de Doctorado Universidad de Concepción.

Torres-Pérez F. & Lamborot M. (2008) Herpetología de Chile, Capítulo 6: Hipótesis filogenéticas de reptiles. Editores: Vidal, M. y A. Labra. Science Verlag.

Torres-Pérez F, Lamborot M, Boric-Bargetto D, Hernández CE, Ortiz JC, Palma RE (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.

Vásquez, M (2002) Genética Biogeográfica de *Liolaemus monticola* (Iguanidae) en Chile central. Tesis de Magister. Universidad de Chile.

Vásquez, M., Torres-Pérez F. & M. Lamborot (2007) Genetic variation within and between four chromosomal races of *Liolaemus monticola* in Chile. Herpetological Journal 17: 149-160.

Veloso & Navarro (1988) Lista sistemática y distribución de anfibios y reptiles de Chile. Bolletino Museo Regionale di Scienze Naturale Torino 6: 481-539.

Vidal, M. Ortiz, J C. Ramírez, C & M. Lamborot (2005) Intraspecific variation in morphology and sexual dimorphism in *Liolaemus tenuis* (Tropiduridae) Amphibia-Reptilia, Volume 26, Issue 3, pages 343 – 351

von Müller, L. & Helmich, W. (1932) Beitrag zur Kenntnis der Herpetofauna Chiles. IV. *Liolaemus monticola*, ein weiterer neuerer Rassenkreis aus den Hochanden Chiles. Zoologischer Anzeiger 99: 177-192.

Webster, T. P., Selander, R. K., & Yang, S. Y. (1972) Genetic variability and similarity in the *Anolis* lizards of Bimini. *Evolution*, 523-535.

Wiens, J. J. & M. R. Servedio (2000) Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proc Biol. Sci.*; 267(1444): 631–636.

White, M. (1978) Modes of speciation. W. H. Freeman and Co, San Francisco. 455 pp.

Woodruff, D.S. (1989) Genetic anomalies associated with Cerion hybrid zones: the origin and maintenance of new electromorphic variants called hybridizymes. *Biological Journal of the Linnean Society* 36, 281–294.

ANEXOS

Anexo 1: Valores de longitud relativa, índice centromérico y clasificación morfológica de los pares cromosómicos 1 al 9 de las seis razas analizadas de *L. monticola*. Se indica el número de cariotipos medidos por raza (n), y el tipo morfológico de cada par según Levan et al 1964: m (metacéntrico), sm (submetacéntrico), st (subtelocéntrico), t (telocéntrico). Los valores en cursiva corresponden a la desviación estándar.

PAR	LONGITUD RELATIVA %						ÍNDICE CENTROMÉRICO						TIPO
	SUR n=20	NORTE n=23	NORTE MOD1 n=26	MF 1 n=25	MF 2 n=24	NORTE MOD 2 n=16	SUR	NORTE	NORTE MOD 1	MF 1	MF 2	NORTE MOD 2	
1	20,05 (3,52)	21,00 (2,33)	20,56 (1,74)	20,69 (1,20)	18,42 (2,76)	20,23 (1,96)	46,97 (2,62)	47,77 (1,42)	46,92 (1,78)	48,66 (1,15)	47,31 (0,73)	47,33 (2,51)	m
1a				8,95 (0,88)	9,26 (1,25)					2,61 (3,34)	1,19 (1,72)		t
1b				10,18 (1,04)	9,98 (1,02)					2,82 (4,77)	1,69 (2,45)		t
2	18,60 (3,04)	19,93 (2,13)	19,52 (1,43)		20,90 (2,23)	19,14 (1,43)	37,53 (3,27)	36,89 (2,20)	36,31 (2,76)		33,24 (3,50)	37,50 (4,21)	sm
2a				6,21 (0,83)	5,65 (0,81)					4,86 (6,02)	5,93 (6,42)		t
2b				13,94 (1,77)	13,91 (1,20)					29,77 (5,70)	26,09 (4,69)		sm
2b'				13,03 (1,66)						7,14 (7,21)			t
3	14,88 (2,84)	15,93 (2,96)	16,44 (1,63)	16,59 (1,54)	15,74 (2,40)	15,22 (2,38)	46,66 (1,88)	45,54 (1,68)	44,80 (2,88)	46,50 (2,64)	44,72 (2,94)	48,04 (2,06)	m
3a		6,26 (0,93)	5,91 (0,69)	6,90 (1,14)	6,76 (0,50)	6,33 (1,49)		0,95 (0,20)	5,16 (6,42)	3,26 (4,46)	2,53 (3,12)	25,12 (12,56)	t/sm
3b		8,54 (1,06)	9,10 (0,96)	9,79 (1,05)	9,23 (1,56)	9,56 (1,03)		24,45 (4,28)	25,34 (5,39)	24,12 (9,37)	23,29 (9,57)	28,60 (5,75)	st/sm
4	13,16 (2,47)					13,80 (1,81)	46,46 (2,47)					45,80 (4,71)	m
4.1						8,00 (0,99)						32,93 (5,47)	sm
4.2						7,14 (0,87)						31,95 (10,53)	sm
4a		6,63 (0,91)	6,50 (0,67)	6,66 (0,75)	6,96 (0,78)			8,86 (8,22)	6,74 (7,59)	4,69 (5,92)	2,77 (2,85)		t
4b		7,31 (0,69)	7,44 (0,81)	7,20 (0,67)	7,18 (1,14)			10,69 (7,87)	8,10 (8,34)	7,64 (7,16)	4,47 (4,62)		t
5	6,34 (1,12)	5,89 (0,71)	6,83 (0,71)	7,07 (0,77)	6,95 (0,76)	7,13 (0,76)	45,44 (3,39)	39,24 (4,78)	37,06 (4,69)	41,81 (3,83)	39,33 (6,44)	39,74 (6,47)	m
6	7,20 (1,17)	7,19 (0,67)	7,33 (0,42)	7,56 (0,42)	8,14 (1,37)	7,35 (1,08)	46,76 (2,41)	46,44 (2,31)	44,24 (3,51)	46,99 (3,02)	46,76 (3,31)	46,14 (3,69)	m
6al			8,33 (0,86)	8,90 (0,76)	9,77 (1,90)	8,49 (1,23)			44,44 (3,33)	47,02 (2,19)	43,05 (4,42)	45,75 (4,59)	m
7	5,32 (1,07)	5,67 (0,47)	6,68 (0,74)	6,83 (0,94)	7,20 (0,74)	6,26 (0,72)	46,76 (2,72)	45,71 (4,46)	41,77 (6,42)	42,66 (6,34)	43,91 (4,62)	46,26 (4,50)	m
7st			5,70 (1,02)	5,68 (0,91)	6,33 (0,85)					15,38 (6,92)	13,76 (6,26)	10,40 (10,35)	t/st
8	4,20 (1,00)	4,30 (0,50)	5,18 (0,68)	5,09 (0,75)	4,67 (0,80)	5,24 (0,87)	47,16 (2,54)	47,15 (2,77)	45,19 (4,39)	46,16 (4,34)	48,03 (3,28)	47,07 (3,06)	m
9	3,48 (0,72)	3,24 (0,60)	4,29 (0,64)	4,00 (1,09)	3,56 (0,99)	4,23 (0,89)	48,04 (2,67)	47,29 (2,83)	47,16 (3,40)	48,86 (2,27)	48,78 (3,30)	47,22 (4,20)	m

Anexo 3: Codificación de alelos para los 7 loci de aloenzimas de los individuos utilizados a nivel racial.

	AAT	aMAN	PGM	PGI	LDHa	PEP	SOD		AAT	aMAN	PGM	PGI	LDHa	PEP	SOD
1174,	BB	BC	CC	CC	AA	AB	BB	2539,	BD	BB	CC	00	AA	BB	BB
1175,	BB	AC	CC	CC	AA	BB	BB	2543,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2508,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2544,	BD	00	CD	BB	AA	BB	BB
2509,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2545,	BD	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2510,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2546,	BB	BB	CD	BB	AA	BB	BB
2511,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2551,	BD	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2512,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2552,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2516,	BB	BB	CC	CC	AA	AB	BB	2553,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2227,	BB	BC	CC	CC	AA	BB	BB	2554,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2228,	BB	BB	CC	CC	AA	CC	BB	2555,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	00
2229,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2556,	BB	BB	CD	BB	AA	BB	BB
2230,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB	2557,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	00
2231,	BB	BC	CC	CC	AA	BC	BB	2558,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2232,	BC	BB	CC	CC	AA	BB	00	2613,	BD	BB	CC	BB	AA	BB	00
2233,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB	2615,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	00
2235,	BB	BC	CC	CC	AA	CC	BB	2616,	BD	BB	BC	AB	AA	BB	BB
2629,	BC	BB	CC	CC	AA	BC	BB	2617,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2630,	BC	00	CC	CC	AA	BB	BB	2618,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2632,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2619,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2236,	BB	BC	CC	CC	AA	BC	BB	2620,	BB	AA	CC	BB	AA	BB	BB
2237,	BC	BC	CC	CC	AA	AB	BB	2621,	BD	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2238,	BC	BC	CC	CC	AA	AB	BB	2622,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2239,	BB	AC	CC	CC	AA	BC	BB	2540,	BB	BB	CC	BB	AA	AB	BB
1354,	BB	00	AC	CC	AA	CC	00	2541,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
1355,	BB	BB	AC	CC	AA	CC	00	2542,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
1356,	BB	AB	CC	CD	AA	BB	BB	2559,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
1357,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2560,	BB	BB	CC	BB	AA	AB	00
1358,	BB	AB	CC	CD	AA	BB	BB	2561,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
1359,	BB	BB	BC	CD	AA	BB	BB	2562,	BD	BB	CC	BB	AA	BB	BB
1360,	BB	BC	CC	CC	AA	BB	00	2563,	DD	BB	CC	BB	AA	BB	00
1361,	BB	BB	AC	CC	AA	CC	00	2565,	BB	AA	CC	BB	AA	BB	00
1362,	BB	BB	AC	CC	AA	CC	00	2567,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
1807,	BB	BC	BC	CC	AA	BB	BB	2568,	BD	BB	CC	BB	AA	BB	00
1808,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2570,	BB	BB	CC	BB	AA	AA	BB
1809,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB	2571,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
1810,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB	2572,	BB	00	CC	BB	AA	AA	00
1811,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2661,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
1812,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB	2662,	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
1813,	BB	BC	CC	CC	AA	BB	BB	2663,	BC	AB	CC	CC	AA	BB	00
1814,	BB	BB	AC	CC	AA	BC	BB	2664,	BB	00	CC	CC	AA	BB	00
1815,	BB	00	CC	CC	AA	BC	BB	2665,	BC	BB	CC	CC	AA	AB	BB
1816,	BB	00	CC	CC	AA	AC	BB	2666,	AC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
1817,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB	2667,	BC	AB	CC	CC	AA	BB	AA
1818,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2765,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2357,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2766,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	AA
2358,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB	2767,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2359,	BB	BB	CC	CC	AA	AB	BB	2768,	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2360,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2769,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2361,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	00	2770,	BB	AB	CC	CD	AA	AB	BB
2362,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2772,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB
2363,	BB	BC	CC	CC	AA	BB	BB	2773,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB
2364,	BB	BC	CC	CC	AA	BB	BB	2774,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB
2365,	BB	AB	BC	CC	AA	00	BB	3352,	CC	00	BC	BC	AA	BB	BB
2366,	BB	AB	CC	CD	AA	BB	BB	3353,	BB	00	CC	BC	AA	BC	BB
2367,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB	3354,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
2368,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB	3355,	CC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2373,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	3356,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB
2374,	BB	AB	CC	CC	AA	BC	BB	3357,	BB	00	BC	CC	AA	BB	BB
2375,	BB	AC	BC	CC	AA	AC	BB	2365,	AB	BB	CC	CC	AA	00	BB
2376,	BB	AB	CC	CC	AA	BC	BB	2433,	BB	00	CC	CC	AA	BC	BB
2377,	BB	AB	CC	CD	AA	BB	BB	2435,	BC	AB	CC	CC	AA	00	BB
2378,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB	2540,	00	00	CC	CC	AA	00	00
2379,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB	2541,	BB	00	CC	CC	AA	00	BB
2090,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2544,	BB	00	CC	CC	AA	00	BB
2091,	BB	AC	CC	CC	AA	BB	BB	2556,	00	00	CC	CC	AA	00	AB
2092,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB	2654,	AB	BB	CC	DD	AA	BB	BB
2093,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2655,	AB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2094,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB	2379,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB

	AAT	aMAN	PGM	FGI	LDHa	FEP	SOD		AAT	aMAN	PGM	FGI	LDHa	FEP	SOD
2090,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	1341,	BB	AB	CC	BB	AA	BB	BB
2091,	BB	AC	CC	CC	AA	BB	BB	1454,	BC	00	CC	CC	AA	00	BB
2092,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB	1459,	BC	BB	CC	CC	AA	00	BB
2093,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	1460,	BB	BB	00	00	AA	00	BB
2094,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB	1464,	BC	BC	CC	BB	AA	BC	BB
2095,	BC	00	CC	CC	AA	BB	BB	1468,	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2096,	BB	00	CC	CC	AA	CC	00	1467,	BC	00	CC	CC	AA	00	BB
2097,	BB	BB	CC	CC	AA	CC	00	1741,	00	00	CC	CC	AA	00	BB
2099,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB	1746,	BB	00	00	CC	AA	00	BB
2100,	BB	BC	CC	CC	AA	BC	BB	2312,	BC	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2174,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	00	2583,	BB	BB	CC	CC	AA	00	BB
2175,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2584,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
2176,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	00	2585,	BC	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2177,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2586,	BB	00	CC	CC	AA	CC	BB
2178,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB	2636,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2179,	BB	BC	CC	CC	AA	BC	BB	2635,	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2180,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	00	2637,	BB	BC	00	00	AA	00	BB
2181,	BB	AC	CC	CC	AA	BC	BB	2638,	BB	BB	00	00	AA	00	BB
2182,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2639,	BC	BC	CC	CC	AA	BB	BB
2183,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2640,	BC	00	CC	CC	AA	BB	BB
2184,	BB	BB	CC	CC	AA	CC	00	2641,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
2185,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2642,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2170,	BB	BB	CC	CC	AA	CC	00	2643,	BC	BB	00	00	AA	00	BB
2171,	BB	00	CC	CC	AA	AC	BB	2644,	BC	BB	CC	CC	AA	BC	BB
2172,	BB	BB	CC	CD	AA	AC	BB	2645,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2173,	BB	00	CC	CC	AA	BC	BB	2646,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2479,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2647,	00	BB	CC	CC	AA	00	BB
2480,	00	BB	CC	CC	AA	CC	BB	2108,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
2375,	BB	BC	CC	CC	AA	BB	BB	2109,	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2722,	BB	BC	CC	BB	AA	BB	BB	2118,	00	00	CC	CC	AA	BC	BB
2723,	BC	BC	CC	BB	AA	BB	BB	2383,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
2789,	BC	BB	CC	BC	AA	00	BB	2384,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB
2790,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB	2382,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2791,	BB	AB	CC	CC	AA	00	BB	2385,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
1792,	BB	BB	CC	00	AA	BC	BB	2386,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
1793,	BB	00	CC	00	AA	00	BB	2387,	BB	BB	CC	BC	AA	BC	BB
1479,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2388,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
1480,	00	BB	CC	CC	AA	CC	BB	2993,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2375,	BB	BC	CC	CC	AA	BB	BB	3304,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB
2722,	BB	BC	CC	BB	AA	BB	BB	3305,	BC	BB	CC	00	AA	BB	BB
2723,	BC	BC	CC	BB	AA	BB	BB	3306,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB
2789,	BC	BB	CC	BC	AA	00	BB	2456,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	00
2790,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB	2457,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	00
2791,	BB	AB	CC	CC	AA	00	BB	2458,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
2792,	BB	BB	CC	00	AA	BC	BB	2459,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	00
2793,	BB	00	CC	00	AA	00	BB	2460,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2794,	00	BC	00	00	AA	00	BB	2461,	BB	BB	CC	CC	AA	AB	00
2795,	BB	BB	00	00	AA	AA	BB	2467,	BB	00	CC	CC	AA	AA	BB
2796,	AB	BB	00	00	AA	BB	BB	2468,	BB	BB	CC	CC	AA	AB	00
2801,	00	BB	00	00	AA	AB	BB	1422,	BB	AA	CC	AC	AA	BB	BB
2802,	BB	BB	00	00	AA	BB	BB	1670,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2803,	BB	AB	00	00	AA	BC	BB	1671,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB
2804,	00	BB	00	00	AA	BB	BB	1672,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB
2805,	BB	AB	00	00	AA	00	BB	1675,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
1381,	BB	AB	CC	BB	AA	BB	BB	1676,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
1382,	BB	BB	CC	AB	AA	AB	CC	1677,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
1383,	BC	BC	CC	BB	AA	BB	BB	1678,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
1384,	BB	BC	CC	BB	AA	BB	BB	1679,	BB	AB	CC	CC	AA	AA	BB
1385,	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB	1681,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
1386,	BB	AB	CC	BB	AA	BB	CC	1682,	BB	BB	CC	BC	AA	BB	BB
1387,	BB	AB	CC	CC	AA	AB	BB	1310,	BB	BB	CC	CD	AA	BB	BB
1388,	BB	AB	CC	CC	AA	AB	BB	1311,	BC	BB	00	CD	AA	BB	BB
1389,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	1312,	BB	00	AC	BB	AA	BB	BB
1390,	BB	BB	CC	CC	AA	AB	BB	1313,	BC	00	BC	CD	AA	BB	BB
1391,	BB	00	CC	CD	AA	BB	BB	1314,	BB	BB	BC	CD	AA	AB	BB
1392,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	1315,	BB	AA	00	CC	AA	00	BB
1393,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2528,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2781,	BB	BC	CC	CD	AA	AB	BB	2529,	BB	BB	CD	BB	AA	BC	BB
1408,	BB	AB	00	CD	AA	BB	BB	2530,	BB	BC	CC	BB	AA	BB	BB
1410,	AB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2531,	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB
1450,	BB	BB	CC	CC	AA	AB	BB	2532,	BB	AA	CC	CC	AA	BB	BB
1451,	BB	BB	CC	BB	AA	00	BB	2533,	BB	BB	00	00	AA	00	BB
1452,	BB	BB	00	BB	AA	AB	BB	2534,	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
1453,	BB	BB	CC	BB	AA	BC	BB	2535,	BB	BB	00	00	AA	00	BB
1455,	BB	BC	CC	BB	AA	BB	BB	2688,	BB	BB	CC	BB	AA	00	BB
2690,	AB	00	CC	CC	AA	00	BB	2689,	BB	BB	CC	CC	AA	00	00
2693,	BB	00	CC	BB	00	00	BB	2525,	BB	00	00	00	AA	BB	00
2448,	BB	00	CC	CC	AA	AB	BB	2527,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
2449,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB	2451,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	00
2450,	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB	2452,	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB