

UCH-FC
MAG-B
V 335
C.1

GENÉTICA BIOGEOGRÁFICA

DE *Liolaemus monticola* (Iguanidae) EN CHILE CENTRAL

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética

Facultad de Ciencias



Mauricio Antonio Vásquez González

Marzo 2002

Director de Tesis: Prof. Madeleine Lamborot Ch.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

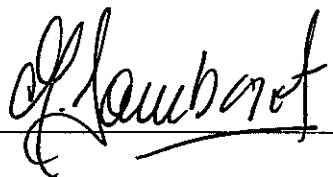
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de
Magister presentada por el candidato:

MAURICIO ANTONIO VASQUEZ GONZALEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para
optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética, en el
examen de Defensa de Tesis Rendido el día 23 de noviembre de 2001.

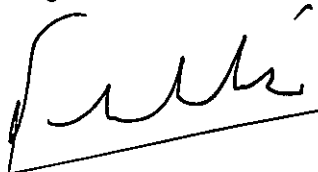
Director de Tesis:

Prof. Madeleine Lambrot/Ch.

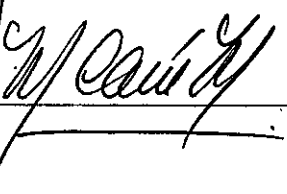


Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Nelson Díaz



Dr. Margarita Carú



INDICE

Agradecimientos	ii
Indice de figuras	iii
Indice de tablas	vi
Resumen	vii
Summary	ix
1. Introducción	1
1.1.Hipótesis de trabajo	9
1.2.Objetivos	10
1.2.1. Objetivos generales	10
1.2.2. Objetivos específicos	11
2. Materiales y métodos	12
2.1.Descripción y ubicación geográfica de las poblaciones muestreadas	12
2.2.Preparación de la muestra y extracción de enzimas	14
2.3.Electroforesis en geles de almidón	16
2.3.1. Preparación de los geles de almidón	16
2.3.2. Carga y corrida de geles	17
2.3.3. Tinción de geles	19
2.3.4. Interpretación de la información	20
2.3.4.1. Fijación de geles de almidón	20

2.3.4.2. Interpretación del patrón de bandas	20
2.3.4.3. Identificación y descripción de variantes	
electroforéticas	23
2.3.4.3.1 Aspartato aminotransferasa	24
2.3.4.3.2. Fosfoglucomutasa	24
2.3.4.3.3. Glucosa fosfato isomerasa	25
2.3.4.3.4. Esterasas	25
2.3.4.3.5. Peptidasa	26
2.3.4.3.6. α -Manosidasa	27
2.3.4.3.7. Glutation reductasa	27
2.3.4.3.8. Superóxido dismutasa	28
2.3.4.3.9. Lactato dehidrogenasa	29
2.3.4.3.10. Creatina kinasa	29
2.3.4.3.11. Adenilato kinasa	30
2.3.4.3.12. Malato dehidrogenasa	30
2.3.4.3.13. Glicerol 3 fosfato dehidrogenasa	31
2.3.4.3.14. Glucosa dehidrogenasa	31
2.4. Análisis estadísticos	31
2.4.1. Equilibrio de Hardy Weinberg	32
2.4.2. Estimación de los niveles de variabilidad	
genética	32
2.4.2.1. Promedio de alelos por locus	33

2.4.2.2. Porcentaje de loci polimórfico	33
2.4.2.3. Heterocigosidad	33
2.4.3. Heterogeneidad poblacional	33
2.4.4. Flujo génico	35
2.4.5. Distancias génicas	36
3. Resultados	37
3.1. Análisis de variantes alélicas	37
3.2. Resultado de análisis estadísticos	57
3.2.1. A nivel de equilibrio de Hardy Weingber	57
3.2.2. Variabilidad genética	60
3.2.3. Heterogeneidad poblacional	60
3.2.4. Flujo génico	64
3.2.5. Distancias genéticas	64
3.2.6. Análisis de Cluster	65
4. Discusión	69
5. Conclusiones	80
6. Bibliografía	82
7. Anexos	88

*A la memoria de mis Padres Graciela y Manuel
Quienes siempre me enseñaron a seguir adelante.*

*A Mis familiares y amigos
Que constantemente me apoyaron.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy afectuosamente a la Profesora Madeleine Lamborot por su incondicional apoyo en todo momento, siendo un pilar fundamental en mi aprendizaje no solo de ciertos tópicos de Genética, sino que de la vida en general, manteniendo siempre una gran disposición con una paciencia envidiable. Ella siempre me estimulo y me motivo a generar nuevas soluciones a las problemáticas que se iban suscitando.

Al Dr. Lafayette Eaton, quien me apoyo en la parte experimental de mi tesis, dedicando parte de su tiempo y laboratorio para poner en marcha los ensayos isoenzimáticos y que en gran parte realice en su laboratorio.

A todos los profesores del área de Genética de la Facultad de Ciencias: Margarita Carú, Claudio Martínez y Víctor Cifuentes, quienes de una u otra forma aportaron a mi formación profesional e integral.

Con gran aprecio quisiera agradecer la ayuda y amistad de Sandra Brito quien con gran paciencia apporto con su ayuda técnica invaluable para llegar al fin de esta tesis, y entregando valor para superar escollos que da la vida.

A Basilio Carrasco, gran amigo cuyo apoyo fue importante para comprender algunas problemáticas que se presentaban en el desarrollo del trabajo experimental y de interpretación de resultados.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias, Patricio, Oscar, Rafael, Rubén, Salvador, etc. quienes apoyaron con algún granito de arena para la solución de algunas problemáticas que se presentaron durante el desarrollo del trabajo. A muchos otros que por muchas razones ya no se encuentran en la Facultad, pero que también aportaron a la realización de esta tesis, donde estén también les agradezco su apoyo.

Finalmente quisiera agradecer a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por su aporte económico entregado a través de las rebajas de arancel, y la colaboración del Proyecto FONDECYT N° 1950683.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de Sudamérica, con la distribución geográfica del genero *Liolaemus*, en color negro (Donoso-Barros, 1966). 3
- Figura 2.** Mapa de Chile Central, que muestra la distribución geográfica de las cuatro subespecies de *Liolaemus monticola*. 4
- Figura 3.** Esquema que representa las diferentes variantes cromosómicas representativas de las razas cromosómicas en *L. m. monticola*. 8
- Figura 4.** Mapa de Chile Central, que destaca las 19 localidades de *Liolaemus monticola*, utilizadas en el estudio genético mediante la técnica de electroforesis. 13
- Figura 5.** Diagrama de expresión isoenzimática, de acuerdo a las subunidades que componen cada proteína. Las diferentes intensidades dan a conocer la actividad isoenzimática (Harris y Hopkinson, 1976). 22
- Figura 6.** Diagrama que representa las subunidades estructurales de las isoenzimas homoméricas y heteroméricas.. 23
- Figura 7.** A= fotografía del gel de almidón teñido para Aat, B= zimograma de s-Aat donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos. 39
- Figura 8:** Mapa de distribución geográfica para las localidades de *Liolaemus monticola* analizadas, donde se entregan los valores de las frecuencias alélicas para cada población en el loci s-Aat. En azul el alelo A y rojo alelo B. 40
- Figura 9.** A= fotografía del gel de almidón teñido para Pgm, B= zimograma de Pgm donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos. 43
- Figura 10.** A= fotografía de gel de almidón revelado para Pgi, B= zimograma de Pgi donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos. 44
- Figura 11.** A= fotografía de gel de almidón revelado para α - Est, B= zimograma de α - Est donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos. 45

- Figura 12.** A= fotografía de gel de almidón revelado para β - Est, B= zimograma de β -Est donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos. 46
- Figura 13.** A= fotografía de gel de almidón revelado para Pep, B=.zimograma de Pep donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos. 47
- Figura 14:** Valores de las frecuencias alélicas para cada población de *Liolaemus monticola*, distribuida geográficamente.
A : β -Est, en azul el alelo A, rojo alelo B, blanco alelo C y naranja alelo D. 48
B : Pep-A, en azul el alelo A, rojo alelo B y naranja alelo C
- Figura 15.** A= fotografía de gel de almidón revelado para Gr, B= zimograma de Gr donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos 51
- Figura 16.** A= fotografía de gel de almidón revelado para Ldh., B= zimograma de Ldh donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos. 52
- Figura 17.** A= fotografía de gel de almidón revelado para Ck, B= zimograma de Ck donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos. 53
- Figura 18.** A= fotografía de gel de almidón revelado para Ak, B=. zimograma de Ak donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos . 54
- Figura 19.** A= fotografía de gel de almidón revelado para Gcdh, B= zimograma de Gcdh donde se representa la migración diferencial para cada uno de los alelos obtenidos. 55
- Figura 20.** Fenograma generado por UPGMA a través de los análisis de Cluster, basados en las distancias genéticas modificadas de Rogers, para 19 localidades de *Liolaemus monticola* pertenecientes a cinco Razas Cromosómicas. 67
- Figura 21.** Fenograma generado por UPGMA a través de los análisis de Cluster, basados en las distancias genéticas modificadas de Rogers, para cinco Razas Cromosómicas de *Liolaemus monticola*. 68

Figura 22. Valores de heterocigosidad observadas para cada raza cromosómicas de *Liolaemus monticola* analizadas, distribuyéndolas en un mapa de ubicación geográfica. 71

Figura 23. Valores de las frecuencias alélicas para cada población de *Liolaemus monticola*, mapeadas de acuerdo a su ubicación geográfica. 76

A: Gcdh, en naranja el alelo A, negro alelo B y blanco alelo C.
B: Gr, en blanco el alelo A y rojo alelo B

INDICE DE TABLAS

TABLA 1	
Número y ubicación geográfica de los individuos estudiados de las diferentes razas cromosómicas.	12
TABLA 2	
Loci enzimáticos y condiciones electroforéticas usadas para el análisis genético en <i>Liolaemus monticola monticola</i>	16
TABLA 3.	
Sistemas buffer utilizados y condiciones para corridas electroforéticas utilizado en cada sistema.	18
TABLA 4	
Clasificación de los alelos de acuerdo a su frecuencia en los 18 loci analizados	56
TABLA 5	
Tabla resumen de los equilibrios de Hardy-Weinberg para 9 localidades de <i>Liolaemus monticola</i> con desequilibrio, en 13 marcadores polimórficos, obtenidos por el programa computacional Biosys.	58
TABLA 6	
Tabla resumen de los valores de equilibrios de Hardy-Weinberg para 5 localidades de <i>Liolaemus monticola</i> con desequilibrio, en 5 marcadores polimórficos, obtenidos por el programa computacional GENEPOP	58
TABLA 7	
Variabilidad genética de 18 loci enzimáticos en 19 poblaciones de <i>Liolaemus monticola</i> estudiadas	62
TABLA 8	
Presentación de los estatígrafos F para 12 loci variables, obtenidos para 19 poblaciones y análisis de razas de <i>Liolaemus monticola</i> .	63
TABLA 9	
Valores de flujo génico para los 18 loci enzimáticos en 19 poblaciones de <i>Liolaemus monticola</i>	64

RESUMEN

Liolaemus monticola, especie endémica montañosa de Chile, altamente variable y de amplia distribución geográfica en Chile, presenta diversas razas cromosómicas de complejidad creciente de sur a norte.

Se estudia la estructura genética y heterogeneidad poblacional de 18 loci aloenzimáticos en 19 poblaciones representativas de cinco razas cromosómicas de *Liolaemus monticola monticola*, mediante electroforesis en geles de almidón. Los genotipos se analizaron con programas computacionales BIOSYS y GENEPOP. La heterocigosidad observada (H_o) para el conjunto de marcadores muestra que tanto la raza cromosómica "Sur $2n=34$ ", considerada como ancestral y la raza del extremo norte "Norte modificada 2, $2n=38-40$ " presentan valores de H_o menores que las restantes razas cromosómicas consideradas derivadas: Raza Norte $2n=38-40$, Múltiple Fisiones $2n=40-42$ y Norte modificada 1, $2n=38-40$. Al analizar las frecuencias alélicas, para algunos loci en particular, se observa ya sea una disminución de la variabilidad genética, explicable por efectos de deriva genética, por ejemplo Aat. A pesar de esto, en otros varios loci, se observó un aumento de la variabilidad genética para las razas derivadas.

Los análisis de heterogeneidad poblacional estimados con los estadígrafos F de Wright, demuestran una moderada diferenciación genética tanto a nivel intrapoblacional como interpoblacional e interracial, con valores de F_{st} de 12% para una diferenciación genética interpoblacional y un 7,6% para una diferenciación genética interracial.

Los valores de los estadígrafos F y los de distancia genética de Rogers, aunque bajos, permiten distinguir las poblaciones estudiadas, acorde con las razas cromosómicas

y su distribución geográfica previamente descrita. Los análisis de "Cluster" permiten evidenciar dos grandes grupos: el primero correspondiente a las razas Sur $2n=34$ más la Norte modificada 2, $2n=38-40$ y el segundo, agrupa las restantes razas derivadas. Además, en este clado se observa una subdivisión concordante con cada una de las razas cromosómicas. La alta subdivisión encontrada, se ve reforzada al analizar el promedio de migrantes por generación, $Nm=0.290$, considerado bajo, lo que estaría avalando una efectiva limitación al flujo génico entre las razas y entre las poblaciones dentro de cada raza.

Los patrones de variabilidad genética y la aparente variación clinal de los alelos para algunos loci, por ejemplo: Aat, Gr, Gcdh, Pep, indican que la estructura genética altamente subdividida de *L. m. monticola* estaría modulada por la interacción de procesos estocásticos (aislamiento geográfico, deriva génica) y efectos de agentes selectivos (regímenes bioclimáticos locales), que cambian las frecuencias alélicas.

Basados en los resultados de diferenciación genética, se discute la concordancia de esta con la diferenciación obtenida a nivel cromosómico y morfológico. Adicionalmente, se proponen las posibles rutas de migración para el conjunto de las poblaciones y razas cromosómicas.

SUMMARY

Liolaemus monticola is a highly variable endemic montane species, widely distributed in Chile. It displays a latitudinal gradient of karyotypic complexity from South to North, and several chromosomal races are recognized.

The genetic structure and populational heterogeneity of 19 *Liolaemus monticola* populations representative of five chromosomal races, were studied by means of alloenzyme starch gel electrophoresis at 18 presumptive gene loci, analysed through the BIOSYS and GENEPOP programs. The observed heterozygosity (H_o) for all loci show that the Southern $2n=34$ race, considered ancestral, and the Northern modified 2, $2n=38-40$ present lower values than the other derived chromosomal races: Northern $2n=38-40$, Multiple Fissions $2n=42-44$ and Northern modified 1, $2n=38-40$. Allelic Frequency analysis for some studied loci presented a decreased genetic variability in the derived races, Aat, for example, explained by genetic drift. In spite of this other loci exhibited an increased variability in the derived races.

Population heterogeneity analysis carried out by the estimation of Wright's F-statistics, demonstrated a moderate genetic differentiation within and between populations, and within and between the chromosomal races, with F_{st} values of 12% for the genetic differentiation between populations and 7.6% for the genetic differentiation between races.

The F-statistic and the Rogers's genetic distance values were low, but showed that the genetic variation is distributed

In accordance with the chromosomal races previously described. The Cluster analysis exhibited Two main groups. The first group includes all the Southern race populations plus the Northern modified 2 from the Northern part of the range; the second includes all the derived race populations. Whithin this group a concordant subdivision of each chromosomal race was observed.

The pattern of genetic variability and the apparent clinal variation of alleles at few loci, Aat, Gr, Gcdh, Pep, for example, indicate that the subdivided genetic structure of *L. m. monticola* is molded by the interplay of stochastic processes (geographical isolation, genetic drift) and agents selectively affecting allele frequency changes (local bioclimatic regimes).

We discuss the concordance between our genetic differentiation results with the chromosomal and morphological previously analysed. In addition possible routes of migration and/or colonization are discussed for all populations and chromosomal races.

1. INTRODUCCION

La familia Iguanidae o Tropicuridae (Frost y Etheridge, 1989), se encuentra casi exclusivamente en el Continente Americano y contiene más de 60 géneros. Tres de estos géneros: *Anolis*, *Sceloporus* y *Liolaemus* se caracterizan por presentar un gran número de especies.

Liolaemus, género del cono sur de Sudamérica (Figura 1), presenta más de ochenta especies, taxonómicamente definidas, y en Chile resulta ser el género más representativo de Reptiles, con un gran número de especies endémicas.

Liolaemus monticola, Müller y Hellmich, 1932, es una especie endémica, montañosa a altitudes que van desde los 900 a 2300 metros, altamente variable, y de amplia distribución geográfica entre los 30° y 40° de latitud Sur (Donoso-Barros, 1966). Contiene cuatro subespecies (Müller y Hellmich, 1932) (Figura 2), a saber:

1.- *Liolaemus monticola villaricense*: subespecie que se ubica en las cercanías del Volcán Villarrica (Figura 2); de gran tamaño, de hábito alimentario preferentemente herbívoro. Presenta un color café oliváceo oscuro en la mayor parte de su cuerpo (Donoso-Barros, 1966). Posee un número cromosómico, relativamente conservado, diploide de $2n=32$ cromosomas (Lambrot y col, 1979, 1981, 1989).

2.- *Liolaemus monticola chillanensis*: se distribuye en la Cordillera de Chillán (Figura 2), de gran tamaño, y hábito alimentario omnívoro. Su colorido general es café plumizo (Donoso-Barros, 1966), posee un complemento cromosómico diploide de $2n=32$ (Lambrot y col, 1979, 1981, 1989).

3.- *Liolaemus monticola ssp*: se distribuye en la Cordillera de Chillán (Figura 2), de gran tamaño, con un hábito alimentario omnívoro. Su colorido general es café plumizo (Müller y Hellmich, 1932), posee una dotación cromosómica $2n=32$ (Lamborot y col, en preparación).

4.- *Liolaemus monticola monticola*: Habita en los nichos rocosos de la Cordillera de los Andes y de la Cordillera de la Costa desde Coquimbo hasta Curicó, entre los 1200 y 1500 metros de altura (Figura 2), su tamaño es mas bien mediano con un color café grisáceo en la mayor parte de su cuerpo, forma comunidades relativamente numerosas con un habito alimentario insectívoro (Donoso-Barros, 1966). Esta última subespecie de amplia distribución geográfica presenta diferentes razas cromosómicas de complejidad creciente de sur a norte, a saber:

- a.- Raza "Primitiva, $2n = 32$ " (Lamborot , 1993).
- b.- Raza "Sur, $2n = 34$ " (Lamborot , 1993; 2001; Lamborot y Alvarez,1993; Lamborot e Eaton, 1997)
- c.- Raza "Norte, $2n = 38-40$ "(Lamborot, 1993; 2001; Lamborot y Alvarez, 1993; Lamborot e Eaton, 1997)
- d.- Raza "Norte modificada 1, $2n = 38-40$ " (Lamborot y col, en preparación)
- e.- Raza "Múltiples fisiones, $2n = 42-44$ " (Lamborot, 1993, 2001)
- f.- Raza "Norte modificada 2, $2n = 38-40$ " (Lamborot y col, en preparación)

Si bien, la mayoría de las especies de *Liolaemus* en Chile, retiene una dotación cromosómica diploide de $2n = 32$ ó 34 considerada primitiva dentro de la familia (Lamborot y col, 1989), otras presentan un incremento en el número cromosómico, explicado principalmente por fisiones céntricas. Sin embargo otros reordenamientos como fusiones, translocaciones, inversiones, triploidía han sido descritos (Lamborot y Alvarez-Sarret, 1989; Lamborot, 1993; Lamborot and Vásquez, 1998; Lamborot, 2001)



Figura 1. Mapa de Sudamérica, que muestra la distribución geográfica del género *Liolaemus*, en color negro (Donoso-Barros, 1966).

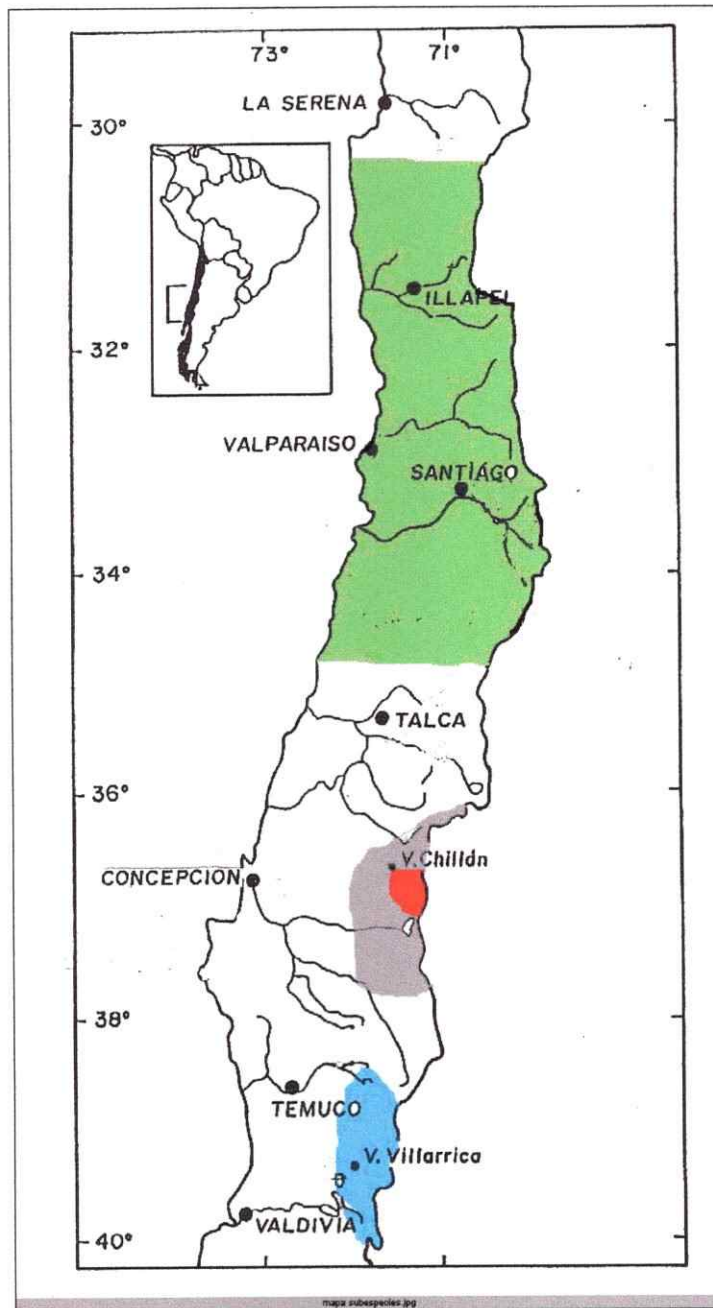


Figura 2. Mapa de Chile Central, que muestra la distribución geográfica de las cuatro subespecies de *Liolaemus monticola* :

- Liolaemus monticola villaricensis*
- Liolaemus monticola chillanensis*
- Liolaemus monticola monticola*
- Liolaemus monticola ssp.*

En algunas instancias, las razas cromosómicas descritas para *L. m. monticola* se encuentran separadas por ríos que actúan como barreras geográficas al flujo génico. Así el Río Maipo y uno de sus afluentes el Río Yeso, separan las razas cromosómicas “Sur $2n=34$ ” y “Norte $2n=38-40$ ” (Lamborot y Col, 1979; 1989; Lamborot y Alvarez, 1993; Lamborot, 1991; Lamborot e Eaton, 1997). Así también, en el Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile, se ha determinado que el Río Aconcagua es también una barrera geográfica para las razas “Norte $2n=38-40$ ” de la “Norte modificada 1 $2n=38-40$ ” y “Múltiple fisiones $2n=42-44$ ” (Lamborot y Alvarez, 1993; Lamborot, 2001). Tanto las poblaciones de la raza Norte, Norte modificada 1 y 2, como la de Múltiple fisiones, presentan un gran polimorfismo cromosómico para fisiones céntricas en los macrocromosomas tal como se muestra en la Figura 3. Además se observan otros reordenamientos como fusiones y translocaciones, entre otras (Lamborot, 2001).

El presente trabajo caracteriza genéticamente, a través del estudio electroforético de proteínas, la variabilidad intra e interpoblacional en la distribución geográfica de *L. m. monticola*, y su eventual congruencia con las separaciones evidenciadas por los ríos como barreras geográficas a nivel cromosómico y morfológico (Lamborot e Eaton, 1997), basados en varias Hipótesis y Objetivos descritos en el punto 1.1. y 1.2. de este estudio.

La electroforesis de proteínas, fue introducida a mediados de la década de los sesenta, como una herramienta de estudio en la Genética de poblaciones, y desde entonces ha sido ampliamente reconocida como el camino más directo para estimar la

variación de los genes en los individuos. Estos estudios se centran fundamentalmente en dos grandes categorías generales: la primera, utiliza la técnica de electroforesis para abordar interrogantes de amplio interés sobre la estructura y evolución de poblaciones y especies. Esto incluye estudios de la divergencia genética durante la especiación (Ayala y Gilpin, 1974; Harrison, 1979), la identificación de clones y especies crípticas, estimación de la cercanía de las especies por medio de la consanguinidad, niveles de flujo génico y otros (Coyne, 1982). Tales análisis de variantes electroforéticas, en gran medida se emplean como marcadores del genoma.

La segunda categoría de investigación trata de explicar en que consiste la variación y porqué existe. Dado que muchas especies de plantas y animales son altamente polimórficos en los loci que llevan la información para enzimas solubles y proteínas, dicha variación presenta un importante desafío a los genetistas de poblaciones. En un esfuerzo por entender su existencia encontramos dos grandes polos los llamados "Seleccionistas" que piensan que la variación se mantiene por selección natural balanceada, y los "Neutralistas" que piensan que la segregación de variantes son equivalentemente adaptativas o levemente deletéreas enfatizando como fuerzas primarias la mutación y la deriva genética.

Ambas líneas de investigación, coinciden sin embargo, que la electroforesis en gel no es un detector perfecto de la variación proteica ya que el método separa proteínas por su movimiento diferencial en un campo eléctrico, por lo tanto diferenciando sólo aquellas cuyas mutaciones implican un cambio en la carga y esto solo refleja una parte de toda la posible variación alélica.

El presente trabajo examina algunos patrones de variación genética en una especie de lagartija del género *Liolaemus* a saber; *Liolaemus monticola monticola* (Müller y Hellmich, 1932), especie altamente variable, endémica, montañosa, y de amplia distribución geográfica (Donoso-Barros , 1966).

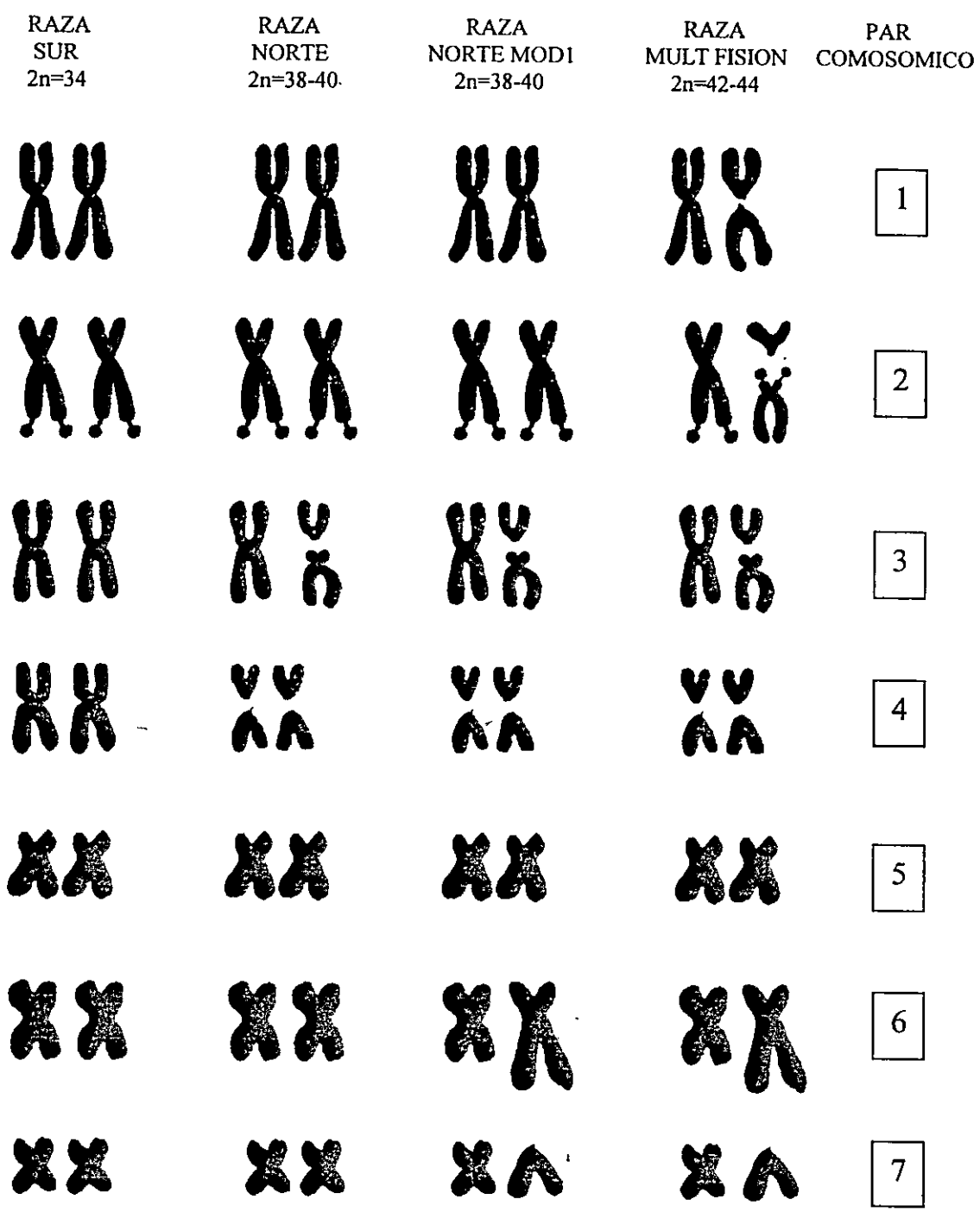


Figura 3. Esquema que representa las diferentes variantes cromosómicas representativas de las razas cromosómicas en *L. m. monticola*.

1.1 Hipótesis de trabajo.

1.1.1 Hipótesis 1

H0' La variabilidad genética intra e inter poblacional, evoluciona en forma independiente de la variabilidad cromosómica y morfológica descritas con anterioridad para *L. m. monticola*.

H1' La variabilidad genética intra e inter poblacional, evoluciona en forma ligada y congruente con la variabilidad cromosómica y morfológica descritas para *L. m. monticola*.

1.1.2 Hipótesis 2

H0'' La variabilidad genética intra e inter raza cromosómica, evoluciona en forma independiente de la variabilidad cromosómica y morfológica descritas con anterioridad para *L. m. monticola*.

H1'' La variabilidad genética intra e inter racial, evoluciona en forma ligada y congruente con la variabilidad cromosómica y morfológica descritas para *L. m. monticola*.

1.1.3 Hipótesis 3

H0''' Las razas cromosómicas derivadas presentarían una reducción en la variabilidad genética para los marcadores aloenzimáticos, en relación a la raza ancestral.

H1''' Las razas cromosómicas derivadas presentarían un aumento de la variabilidad genética para los distintos marcadores aloenzimáticos, en relación con la raza ancestral.

1.1.4 Hipótesis 4

H0'''' Si las barreras biogeográficas no limitan el flujo génico, las poblaciones derivadas presentarían una variabilidad genética similar a las presentadas por las poblaciones consideradas ancestrales.

H1'''' Si las barreras biogeográficas mantienen limitado el flujo génico, se debería encontrar que la variabilidad genética existente en las poblaciones derivadas sea menor que las poblaciones ancestrales

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivos generales

1. Caracterizar el grado de variación genética iso y aloenzimática intra e inter poblacional e intra e interrazas cromosómicas, estructura genética poblacional, diversidad genética y estimación del flujo génico para *L. m. monticola*
2. Comparar la divergencia genética con los parámetros cromosómicos y morfológicos ya estudiados en *L. m. monticola*.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Determinar los genotipos para al menos 20 loci enzimáticos de cada individuo de las diferentes poblaciones de cada una de las razas cromosómicas de *L. m. monticola*.

2. Determinar los patrones de variabilidad genética intra e inter poblacional, como intra e inter raza cromosómica de *L. m. monticola*.
3. Comparar los análisis de divergencia genética que se obtengan, con los de divergencia a nivel cromosómico y morfológico ya descritos.
4. Analizar la variabilidad genética aloenzimática en el contexto de su distribución y parámetros geográficos, intentando detectar algunas barreras geográficas que estarían funcionando como barrera al flujo génico entre las razas de *L. m. monticola*.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Descripción y ubicación geográfica de las poblaciones muestreadas.

En este estudio se analizaron 326 individuos de 19 poblaciones de *Liolaemus monticola monticola*, representativas de cinco razas cromosómicas, colectadas desde la IV a la VII región (Figura 4), entre los años 1998 y 2000, otras fueron colectadas con anterioridad, y los tejidos fueron preservados a -85° C en el Laboratorio de Citogenética, Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile.

La Tabla 1 y la Figura 4 indica el número de individuos y la distribución geográfica de las 19 poblaciones estudiadas para cinco razas cromosómicas.

TABLA 1
Número y ubicación geográfica de los individuos estudiados genéticamente, correspondiente a las diferentes razas cromosómicas.

POBLACION	N°	AREA**	REGIÓN	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD	RAZA CRONOSOM
1. Río Lontué	05	A	VII	35° 08'	71° 18'	1.200	34
2. Queñes	21	A	VII	35° 07'	70° 52'	1.200	34
3. C. Cantillana	18	C	RM	33° 57'	70°56'	1.300	34
4. Maipo Sur	19	A	RM	33° 45'	70° 17'	1.300	34
5. Farellones	20	A	RM	33° 20'	70° 15'	1.400	38-40
6. Yerba Loca	10	A	RM	33° 21'	70° 20'	1.800	38-40
7. Cta. Chacabuco	25	T	V	32° 59'	70° 44'	1.100	38-40
8. Cta. Dormida	26	C	V	33° 03'	71° 02'	1.300	38-40
9. C. Campana	14	C	V	32° 57'	71° 07'	1.400	38-40
10. Saladillo	26	A	IV	32° 58'	70° 18'	1.450	38-40
11. Río Blanco	05	A	IV	32° 55'	70° 16'	1.450	38-40
12. R.Colorado Norte	22	A	IV	32° 52'	70° 22'	1.550	38-40
13. R.Colorado Sur	26	A	IV	32° 53'	70° 20'	1.550	38-40
14. Cabrera	07	C	IV	32° 56'	71° 02'	600	42-44
15. Cerrillo	12	C	IV	32° 28'	71° 08'	1.400	42-44
16. Rocin- Chalaco	26	A	IV	32° 32'	70° 25'	1.600	42-44
17. Hierro Viejo	21	C	IV	32° 18'	70° 58'	350	42-44
18. CulimÓ- Tilama	15	C	IV	32° 04'	71° 14'	450	38-40
19. Salamanca	08	C-T	IV	31°50'	70° 58'	600	38-40

* N=número de individuos analizados para cada población ** Area de distribución altitudinal
A=andes; C=costa; T=valle transversal

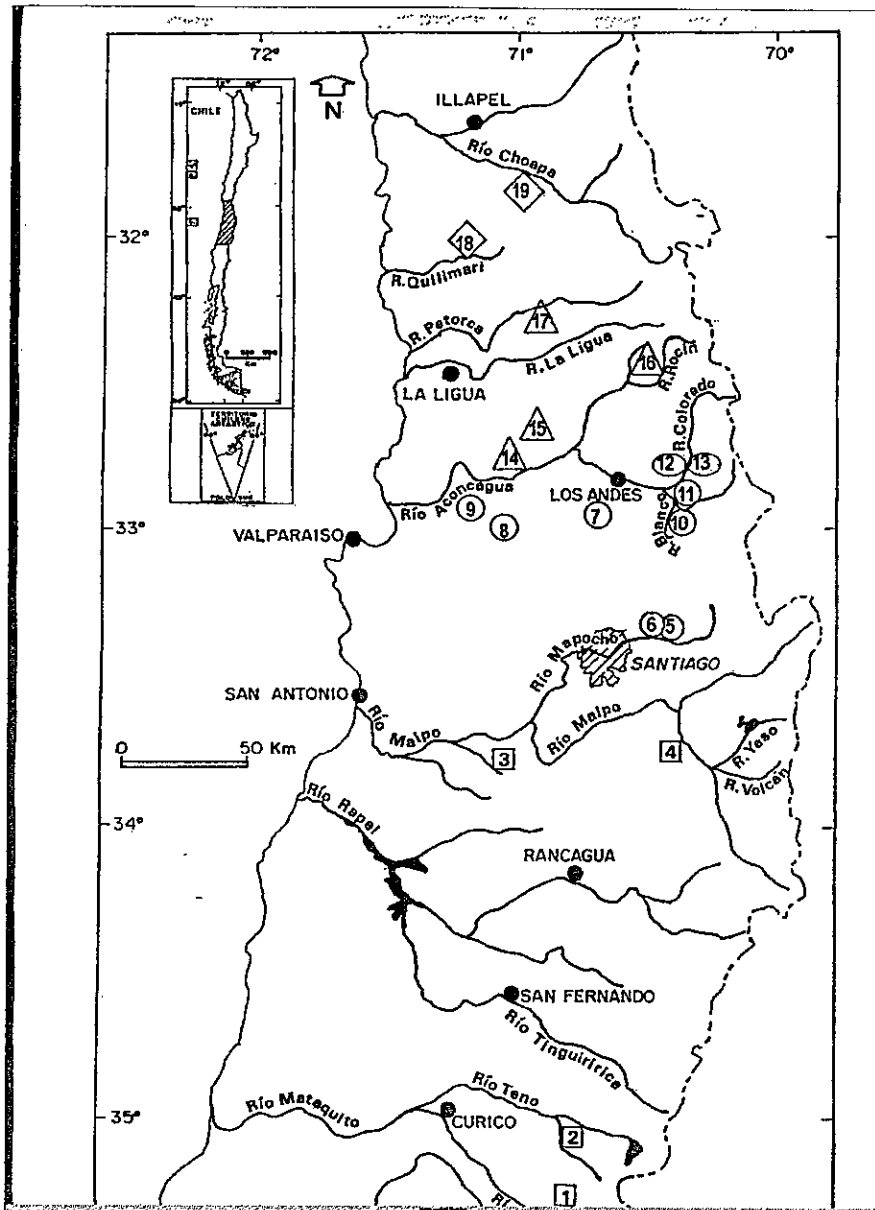


Figura 4. Mapa de Chile Central, que muestra las 19 localidades de *L. m. monticola*, utilizadas en el estudio genético mediante la técnica de electroforesis.

□ Representa a las localidades con individuos de la Raza Sur $2n=34$.

○ Representa a las localidades con individuos de la Raza Norte $2n=38-40$.

○ Representa a las localidades con individuos de la Raza Norte modificada 1 $2n=38-40$.

△ Representa a las localidades con individuos de la Raza Múltiples Fisiones $2n=42-44$.

◇ Representa a las localidades con individuos de la Raza Norte modificada 2 $2n=38-40$.

Poblaciones: 1. Río Lontué; 2. Los Queñes; 3. Cerro Cantillana; 4. Maipo sur; 5. Farellones; 6. Yerba Loca; 7. Cta. Chacabuco; 8. Cta. Dormida; 9. Cerro Campana; 10. Saladillo; 11. Río Blanco; 12. Río Colorado Norte; 13. Río Colorado Sur; 14. Cabrería; 15. Mina Cerrillo; 16. Rocín-Chalaco; 17. Mina Hierro Viejo; 18. Culimó-Tilama; 19. Salamanca.

2.2. Preparación de las muestras y extracción de las enzimas

Se utilizaron diferentes tejidos de machos y hembras de *L. m. monticola*, procedentes de 19 localidades, pertenecientes a cinco razas cromosómicas: La Raza Sur $2n = 34$, Raza Norte $2n = 38-40$, Raza Norte modificada 1 $2n = 38-40$, Raza Norte Modificada 2 $2n = 38-40$ y la Raza Múltiple Fisiones $2n = 42-44$ diagnosticadas en el Laboratorio. Los lagartos anestesiados con Uretano fueron disectados, extrayéndoles tejidos tanto para los análisis cromosómicos, de ADN, como para las corridas de electroforesis de proteínas, a saber: trozo de hígado, estómago e intestino (previamente limpiados y lavados con agua destilada), pulmón y músculo esquelético, los que fueron colocados en tubos Ependorff bien rotulados y guardados en un Freezer a -85°C del Laboratorio.

Para la obtención de las enzimas, los tejidos de cada individuo por separado son descongelados y macerados manualmente en un mortero de porcelana limpio mantenidos en hielo para evitar la degradación de enzimas más lábiles a la temperatura, y ayudar a una mejor y más rápida molienda.

Para mantener las actividades proteicas es importante seleccionar un buffer de extracción (Anexo 1). Estos son muy variados en su composición química, y dependientes del tipo de tejido, ya sea vegetal o animal. Para animales, la mayoría de los buffer de extracción utilizan 2-mercaptoetanol que ayuda a una mejor resolución de las bandas en el momento de la tinción, pero este compuesto no es recomendable para reptiles, pues reduce las actividades de varias enzimas (Hillis y col, 1996). A partir de las contradicciones del uso del buffer de extracción, se probó macerar las muestras con

agua destilada fría, no observándose ninguna variación en la obtención de los resultados, adoptando esta metodología para el resto del estudio.

Cada macerado es alicuotado en dos tubos Ependorff bien rotulados y dejados a -85°C , uno para la corrida electroforética y el otro de reserva en caso de tener que repetir la tinción de algún marcador. Se guardan a -85°C ya que corresponde a una temperatura óptima para mantener la actividad proteica durante varios meses y años, siempre y cuando no se expongan los tejidos o las moliendas a cambios bruscos de temperaturas (Soltis y Soltis, 1989); aunque la mayoría de las proteínas también mantienen su actividad a -70°C (Hoelzel, 1992). Existen algunas proteínas más lábiles que otras a las altas temperaturas y a los cambios bruscos de estas, por ejemplo el Lactato Dehidrogenasa (Ldh), es una de las más resistentes manteniendo su actividad y resolutivez en forma indefinida a -20°C . (Holzel, 1992).

Los tejidos fueron analizados electroforéticamente, en geles de almidón, para un total de 14 enzimas, que son las siguientes: Aspartato Aminotransferasa (Aat), Fosfoglucomutasa (Pgm), Glucosa - 6 fosfato isomerasa (Pgi o Gpi), α -Esterasa (α -Est), β -Esterasa (β -Est), Peptidasa-A (Pep-A), α -Manosidasa (α -Man), Superóxido Dismutasa (Sod), Lactato Dehidrogenasa (Ldh), Creatina Kinasa (Ck), Adenilato Kinasa (Ak), Malato Dehidrogenasa (Mdh), Gliceraldehido-3-fosfato Dehidrogenasa (G3pdh), Glucosa Dehidrogenasa (Gcdh). La Tabla 2 muestra los tejidos utilizados para cada una de las enzimas y loci presuntivos resueltos, obtenidos de individuos recién colectados previo al comienzo de este estudio más otros colectados durante el desarrollo del mismo.

TABLA 2

Los 18 Loci enzimáticos analizados y las condiciones de las electroforesis empleadas para el análisis genético en *L. m. monticola*

Enzima	Locus	Ec. Number	Tejido*	Buffer**
Aspartato Aminotransferasa	s-Aat	2.6.1.1	H-I-M	C
Fosfoglucomutasa	Pgm	5.4.2.2	H-M-I	A
Glucosa-6-fosfato isomerasa	Pgi	5.3.1.9	H	A
α -Esterasa	α -Est	3.1.1.1	H-I	C
β -Esterasa	β -Est	3.1.1.1	H-I	C
Dipeptidasa - A	Pep - a	3.4.13.11	I-M	A
α - Manosidasa	α -Man	3.2.1.24	H-M	C
Glutation Reductasa	Gr	1.6.4.2	I-H	C
Superóxido Dismutasa	s-Sod	1.15.1.1	H	A
L-Lactato Dehidrogenasa	Ldh-A/Ldh-B	1.1.1.27	H-M	A
Creatina Kinasa	Ck-1/ Ck-2	2.7.3.2	I-M	B
Adenilato Kinasa	Ak - 2	2.7.4.3	I-M	B
Malato Dehidrogenasa	m-Mdh/ s-Mdh	1.1.1.37	H-I	A
Glicerol-3-fosfato Dehidrogenasa	G3pdh	1.1.1.8	H-M-I	B
Glucosa Dehidrogenasa	Gcdh	1.1.1.118	H-M	C

* Tejido: M =músculo, H= hígado, I= intestino ** Buffer: A= tris citrato pH 8.0, B = tris citrato EDTA pH 7.0, C= tris borato EDTA pH 8.0.

2.3. Electroforesis en geles de almidón

2.3.1. Preparación de los geles de almidón

Se prepara una suspensión de almidón al 11% en un total de 450 ml de buffer adecuado al gel (Anexo 2), según el sistema a utilizar para los distintos marcadores proteicos como se muestra en la Tabla 2.

La mezcla (almidón + buffer) en un matraz Kitasato se calienta en un mechero, agitando vigorosamente a fin de lograr una buena suspensión del almidón. El gel de

almidón esta listo cuando adquiere una coloración semi-transparente y una consistencia más densa. Luego se aplica vacío por unos 10 a 15 segundos (con una bomba de vacío) para extraer el máximo de burbujas dándole al gel una mayor homogeneidad. Una vez completado este procedimiento, se vierte rápidamente en moldes evitando la solidificación antes de tiempo y la presencia de espacios vacíos en el interior del gel (Thompson y col, 1982). Una vez solidificado el gel, después de 30 a 45 minutos, es necesario cubrirlo con ALUSA PLASS (u otro similar) para evitar su deshidratación y contaminación. Cada molde consta de una base de vidrio de 20 x 20 cm y cuatro varillas de acrílico dos de las cuales de 19,3 x 1,4 x 0,5 cm y las otras dos son de 16 x 1,4 x 0,5 cm, con las que se forma un cuadrilátero con la forma característica al gel y la altura adecuada.

2.3.2. Carga y corridas de geles

Una hora antes de utilizar el gel, debe enfriarse a 4° C, para que adquiera una mejor consistencia y un ambiente más propicio que evite la degradación de las proteínas.

La inoculación del homogeneizado se realiza con trozos de papel filtro Watman N° 3 de 2 mm de ancho por 10 mm de largo (Hillis y col, 1996), reteniendo aproximadamente de 8-10 microlitro de la molienda de tejido (medición realizada en el Laboratorio). El homogeneizado a utilizar debe mantenerse en abundante hielo; y una vez descongelado, rápidamente cada trozo de papel filtro es humedecido y aplicado

inmediatamente en el gel en forma vertical intentando no mover una vez que toca el almidón para evitar que difundan las proteínas.

Los diferentes buffer utilizados en la preparación de los geles, están íntimamente relacionados a aquellos que se utilizan para los electrodos; en algunos casos estos son diferentes, y corresponden a variaciones en las diluciones que se utilizan (Anexo 2). Así mismo, se recomienda mantenerlos por aproximadamente 1 hora a una baja temperatura (4 ° C), antes de ser utilizado, en matraces o en las propias cámaras de corrida.

En el transcurso del tiempo se va ajustando la cantidad de voltaje adecuada que se requiere en la técnica de electroforesis, de modo que cada sistema buffer utilice el voltaje y amperaje apropiados para una migración correcta de las proteínas. La Tabla 3 indica las condiciones recomendadas y empleadas en este estudio para los distintos sistemas buffer utilizados.

TABLA 3.

Sistemas buffer y condiciones para corridas electroforéticas utilizado en cada sistema.

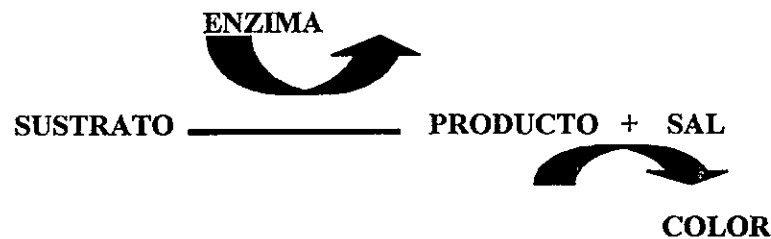
SISTEMA BUFFER	pH	mA	VOLTS	TIEMPO DE CORRIDA
Tris citrato	8.0	75	90	7- 8 horas
Tris citrato EDTA	8.0	75	130	7- 8 horas
Tris citrato EDTA	7.0	60	120	6 -7 horas
Tris borato EDTA	8.0	35	140	8-10 horas
Tris HCl	8.2	60	130	7- 8 horas

mA=corresponde miliampers.

2.3.3. Tinción de los geles

Transcurrido el tiempo promedio de corrida a voltaje apropiado, se procede a teñir las proteínas. La distancia de migración de cada proteína es altamente particular, siendo visualizadas una vez que el gel se expone a una mezcla de la tinción específica para la proteína que se desea evidenciar (Hillis y col, 1996) (Anexo 3)

La tinción se basa en un principio bioquímico, que comprende la interacción de la enzima con ciertos sustratos específicos cuyo producto da una coloración específica al aplicarle una sal para que actúe (PMS-MTT), tal como muestra el siguiente esquema:



Cada tinción dependerá de la vía metabólica en la cual participa la enzima en cuestión, como también de la existencia de un sustrato inmediato y la utilización de las sales adecuadas.

Cada tinción se prepara en matraces de 100 ml, con los buffer de tinción específicos de acuerdo al sistema enzimático que se desea teñir, y depositados en una estufa a 37° C unas 2 horas antes de realizar la mezcla de tinción. Esta mezcla de tinción se realiza una vez que el gel ha sido retirado del campo eléctrico, y por efectos prácticos y de economía, cada gel de 1.8 cm se corta en rebanadas que dan 6 geles de 3 mm de espesor. Cada uno es depositado en una cubeta para recibir la mezcla de tinción

adecuada a la proteína específica. Para acelerar el proceso de tinción se cubre la cubeta con alusa plass, evitando la evaporación y se deja en una estufa de cultivo a 37°C.

2.3.4. Interpretación de la información

2.3.4.1. Fijación de geles de almidón.

Para dejar registro de los geles teñidos con su patrón de bandas, cada uno de estos es fotografiado, a fin de analizar y rechequear los resultados en conjunto. Otra forma de asegurar la preservación de la información consiste en copiar el patrón de bandas en micas transparentes bien rotuladas. Por último, otra modalidad obtenida con éxito en el Laboratorio, es hacer perdurar los propios geles de almidón, fijados en Metanol Acido acético 3:1, luego secado en una estufa a 60° C, como se muestra en el Anexo 4 (técnica modificada en el laboratorio).

2.3.4.2. Interpretación del patrón de bandas

Las bandas evidenciadas en un gel, son diagnosticadas de acuerdo a la conformación proteica. Por ejemplo si una sola cadena polipeptídica es activa, la proteína se denomina monomérica y el patrón de bandas representará el aporte alélico de los genes que codifican su conformación. La Figura 5A representa la banda de migración más rápida, anodal o catodal, que estará conformada por el alelo A en homocigosis; la banda más lenta representará el alelo B también en homocigosis cuando ambos alelos están presentes en heterocigosis ambos darán un componente representativo en bandas codominantes. Si la proteína es multimérica, como por ejemplo

adecuada a la proteína específica. Para acelerar el proceso de tinción se cubre la cubeta con alusa plass, evitando la evaporación y se deja en una estufa de cultivo a 37°C.

2.3.4. Interpretación de la información

2.3.4.1. Fijación de geles de almidón.

Para dejar registro de los geles teñidos con su patrón de bandas, cada uno de estos es fotografiado, a fin de analizar y rechequear los resultados en conjunto. Otra forma de asegurar la preservación de la información consiste en copiar el patrón de bandas en micas transparentes bien rotuladas. Por último, otra modalidad obtenida con éxito en el Laboratorio, es hacer perdurar los propios geles de almidón, fijados en Metanol Acido acético 3:1, luego secado en una estufa a 60° C, como se muestra en el Anexo 4 (técnica modificada en el laboratorio).

2.3.4.2. Interpretación del patrón de bandas

Las bandas evidenciadas en un gel, son diagnosticadas de acuerdo a la conformación proteica. Por ejemplo si una sola cadena polipeptídica es activa, la proteína se denomina monomérica y el patrón de bandas representará el aporte alélico de los genes que codifican su conformación. La Figura 5A representa la banda de migración más rápida, anodal o catodal, que estará conformada por el alelo A en homocigosis; la banda más lenta representará el alelo B también en homocigosis cuando ambos alelos están presentes en heterocigosis ambos darán un componente representativo en bandas codominantes. Si la proteína es multimérica, como por ejemplo

dimérica (Figura 5B), se producen dos cadenas polipeptídicas activas, donde los homocigotos tanto para el alelo A como el B darán sus bandas correspondientes, así el heterocigoto estará representado por el aporte alélico de A de B y una migración de tipo intermedia aportada por la presencia de A y B en heterocigosis. Los restantes casos como trimérica y tetramérica se esquematizan en la Figura 5C y 5D respectivamente.

Debemos diferenciar dos tipos de nomenclatura, la primera tiene relación con los sistemas isoenzimáticos de un mismo marcador de acuerdo a la movilidad relativa que este posea, es decir, para aquellas proteínas con más de un sistema decidimos denominar al más anodal con la letra A, y B al que lo sigue a continuación; la segunda nomenclatura a utilizar tiene relación con la denominación de los alelos que están presentes para cada uno de los sistemas proteicos que observamos como fenotipo, por ejemplo se le llama alelo A aquel que se encuentra más anodal y se prosigue respectivamente con los alelos B – C, etc., para el caso de proteínas con más de un sistema, esta nomenclatura de designación de alelos es independiente para cada uno de ellos.

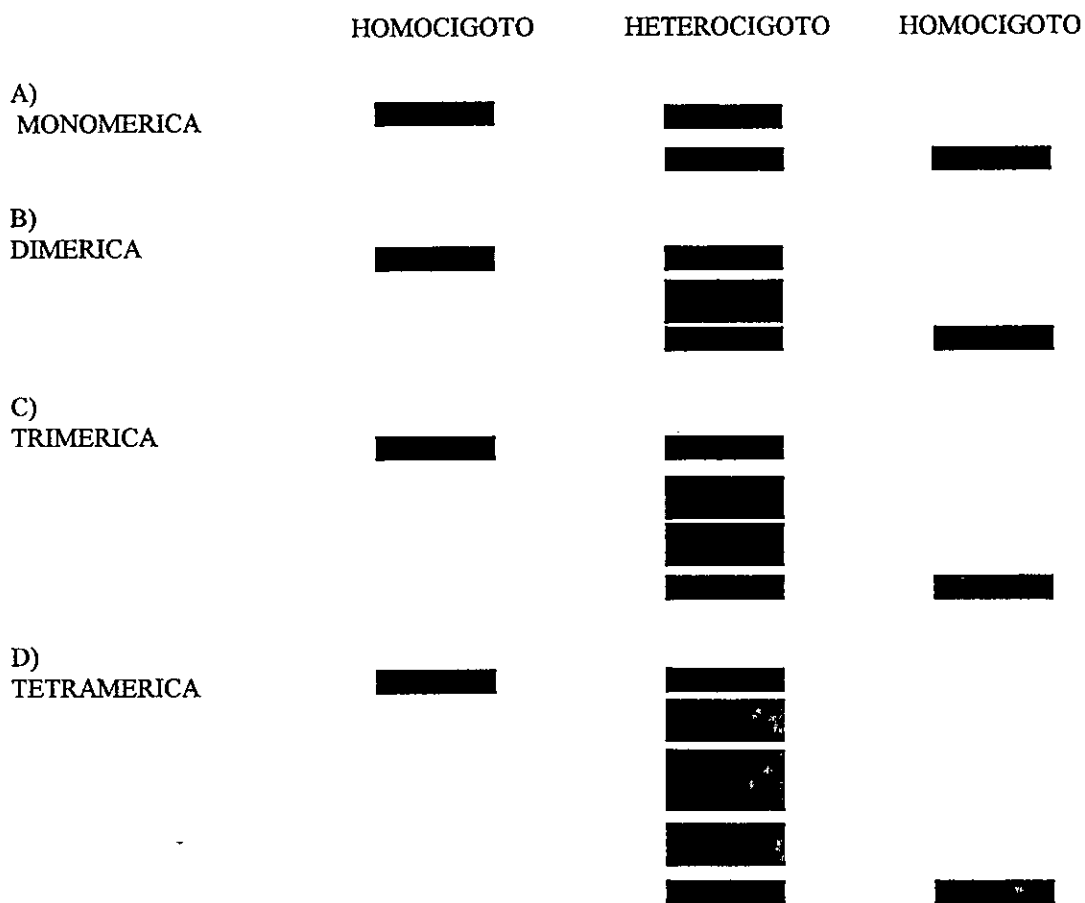


Figura 5: Diagrama de expresión isoenzimática, de acuerdo a las subunidades que componen cada proteína. Las diferentes intensidades dan a conocer la actividad isoenzimática (Harris y Hopkinson, 1976).

Obtener el patrón de bandeo para cada enzima es técnicamente sencillo, pero uno de los aspectos de mayor dificultad radica en la interpretación y asignación de las bandas a un eventual genotipo.

El análisis del patrón de bandas de las proteínas se basa en un principio genético básico relacionado con la estructura tridimensional de las proteínas (ya sea un monómero, dímero, trímero, etc.). Es así como, para un simple locus con un par de

alelos, una proteína monomérica debe presentar un patrón de bandeo como se muestra en la Figura 6. Existen ocasiones sin embargo, donde la interpretación electroforética se complica debido a muchos factores entre los cuales podemos mencionar: la presencia de más de un simple par de alelos, la presencia de dos loci, etc.

	MONOMERICO	DIMERICO	TRIMERICO	TETRAMERICO
HOMOMERICO	A	AA	AAA	AAAA AAAB AABA
			AAB ABA BAA	ABAA BAAA
HETEROMERICO		AB BA		AABB ABAB ABBA BABA BBAA BAAB
			BBA BAB ABB	ABBB BABB BBAB BBBA BBBB
HOMOMERICO	B	BB	BBB	

Figura 6: Diagrama que representa las subunidades estructurales de las isoenzimas homoméricas y heteroméricas.

2.3.4.3 Identificación y descripción de variantes electroforéticas

Para la realización de este estudio se analizaron 14 sistemas enzimáticos, que dan cuenta de 18 loci claramente definidos (Tabla 2).

2.3.4.3.1 Aspartato Aminotransferasa (Aat)

Enzima también conocida como Glutamato-Oxalacetato Transaminasa (Got), participa en la transformación del α -Ketoglutarato y el L-Aspartato en Glutamato y Oxalacetato, este último forma un complejo de color rojo oscuro con la sal Fast garnet GBC, evidenciando la presencia de la enzima en el gel de almidón (Figura 7A) (Radwan, 1980).

Aat posee una estructura cuaternaria dimérica, presumiblemente con dos loci descritos para vertebrados (Richardson y col, 1986). Se describen dos sistemas isoenzimáticos: uno a nivel mitocondrial m-Aat, con una migración anodal en ambiente básico, y una s-Aat a nivel nuclear de migración catodal en un ambiente básico. Se ha visto que para obtener mejores resultados electroforéticos, es importante tener extractos de tejidos frescos (Hillis y col, 1996).

2.3.4.3.2 Fosfoglucomutasa (Pgm)

La Pgm interviene en la vía metabólica que cataliza la reacción de Glucosa-1-Fosfato a Glucosa-6-Fosfato (con la ayuda de la Glucosa 1,6 difosfato), que a su vez es catalizada por la Glucosa-6-Fosfato Dehidrogenasa y magnesio como cofactor, a 6-Fosfogliceraldeido (6-PGA). Esta reacción permite que el NADP sea reducido a NADPH, y este último en presencia de sales como el MTT y PMS forman un complejo coloreado de azul oscuro (Figura 9A), en los geles de almidón.

Posee una estructura cuaternaria con una sola unidad estructural activa, siendo catalogada como monomérica. Se ha descrito la presencia de tres loci para esta enzima

en vertebrados en general, aunque para mamíferos se ha logrado distinguir cuatro (Pretorius y col, 1975). En los restantes taxa sólo se distinguen uno o dos loci. Comúnmente esta enzima puede exhibir bandas como artefacto de sobre tinción, además se debe tener presente que su actividad se ve afectada con el tiempo.

2.3.4.3.3. Glucosa fosfato isomerasa (Pgi o Gpi)

Esta enzima participa en la transformación de la fructosa 6 fosfato en glucosa 6 fosfato, para poder visualizar su presencia es necesario transformar el resultado de la reacción enzimática (glucosa 6 fosfato) a 6-fosfogliceraldehido en presencia de Magnesio y NADP, este último se reduce a NADPH, y en el estado reducido, en unión con las sales MTT y PMS dan una coloración azul característico de la enzima (Figura 10A).

Pgi presenta una estructura cuaternaria dimérica, con la presencia de un loci descrito para vertebrados revelado catodalmente en el gel de almidón (Richardson y col, 1986)

2.3.4.3.4. Esterasas (Est)

Las esterazas corresponden a un conjunto de enzimas de gran interés en investigación para conocer o determinar cuantos genes están participando en estos complejos, dado el gran polimorfismo encontrado en las diversas taxa estudiadas a través del tiempo: Hubby y Lewontín, 1966 en *Drosophila*; Narang y col, 1977, en mosquitos; Baron,

1972; 1973, en peces. Pueden ser revelada a través de dos metodologías de tinción: una utilizando

4-Methylumbelliferyl acetato, reactivo que es catalizado por las Esterasas a acetato y Methylumbelliferone, el que se colorea evidenciando la presencia de las enzimas al ser expuestos a luz ultravioleta; la otra metodología utiliza el α -Naphthyl Acetato, que es catalizado por las Esterasas a Acetato y α -Naphthol, este último en presencia de Fast Garnet forma un complejo coloreado de negro (Figura 11A). Se ha visto la existencia de varios otros sustratos para estas enzimas como: β -Naphthyl Acetato (Figura 12A), α -Naphthyl Butirate y α -Naphthyl Palmitate; es importante tener presente la no-utilización de mas de un sustrato por tinción.

Estas enzimas poseen una estructura cuaternaria de tipo monomérica o dimérica dependiendo del tipo de Esterasa que estamos revelando. El número de loci variaría de acuerdo a las taxa, encontrándose hasta seis para peces *Alburnus alburnus* (Radwan, 1980).

2.3.4.3.5. Peptidasa-A (Pep-A)

Los términos dipepetidasa y tripeptidasa son los más recomendables para referirse a las Peptidasa en general, dada la existencia de variados sustratos. Esta enzima cataliza la reacción donde un péptido es llevado al ácido L-amino en presencia de magnesio. El ácido L-amino es catalizado a Cetoacido, Amoníaco y Agua oxigenada, esta última catalizada por la Peroxidasa a oxígeno el cual forma un complejo coloreado con la O-dianisidina (Figura 13A).

Las subunidades estructurales son variadas de acuerdo al tipo de sustrato que participa, como así también lo es el número de loci descritos para este complejo enzimático. En vertebrados están descritos los siguientes:

ENZIMA	SUBUNIDAD ESTRUCTURAL	SUSTRATO
PEP-A	Dimérica	Glycyl-Leucine
PEP-B	Monomérica o dimérico	L-Leucineglycylglycine
PEP-C	Monomérico	Glycyl-Leucine
PEP-D	Dimérica	L-phenylalanyl-L-proline
PEP-E	Monomérico	Lycine-Leucine
PEP-F	subunidad estructural desconocida	L-Leucyl-Leucyl-Leucine
PEP-S	probablemente tetamérico	Glycil-Leucine.

2.3.4.3.6. α -Manosidasa (α -Man)

Enzima responsable de la reacción que transforma al 4-Metylumberiferyl- α -D Manopiranosido en Manosa y Metilumberiferon, este último compuesto al exponerlo a luz ultravioleta evidencia la presencia de la enzima, con bandas fluorescentes.

Para los vertebrados se postula que esta enzima presenta un locus y una estructura cuaternaria monomérica, aunque para algunas taxa puede ser dimérica (Hillis y col, 1996).

2.3.4.3.7. Glutation reductasa (Gr)

Gr cataliza la reacción de NADPH a NADP y el de Glutación oxidado a Glutación reducido. El cambio reversible de Glutación reducido a Oxidado permite que el

Dichlorophenolindophenol se reduzca formando un complejo coloreado con el MTT (Figura 15A).

Se ha descrito como una estructura cuaternaria dimérica, con la presencia de un locus descrito para vertebrados (Richardson y col, 1986).

En ocasiones la tinción de la GR permite además la aparición de una enzima contaminante que según la literatura sería la Diaforasa-dependiente de NADPH la que se diferencia de la GR por el sentido de la migración. Al tener que preparar la tinción con agar, en ocasiones se dificulta la interpretación, principalmente por la no-uniformidad del pintado del gel; para evitar eso es necesario aplicar el agar a una temperatura de 50 °C ya que una menor temperatura solidificaría antes de tiempo la tinción y una mayor temperatura podría eventualmente degradar las proteínas a evidenciar.

2.3.4.3.8. Superoxido dismutasa (Sod)

Enzima conocida también como Indofenol oxidasa (Ipo) o Tetrasolium oxidasa (To), su presencia puede ser evidenciada con una tinción indirecta y negativa, basada en una reacción sencilla donde el MTT, en presencia de PMS y luz se transforma a Formazan, este último responsable de una coloración azul intensa del gel de almidón, sin embargo, la presencia de Sod impide que se produzca Formazan, quedando el gel incoloro, evidenciando la presencia de la enzima, mientras que las demás zonas, donde no esta la enzima, se tiñen de azul (Richardson y col, 1986).

Para la mayoría de los vertebrados se presentan dos loci: uno citoplasmático (s-Sod) con una estructura cuaternaria dimérica, y un segundo locus mitocondrial (m-Sod) tetramérico.

2.3.4.3.9. Lactato dehidrogenasa (Ldh)

LDH cataliza la reacción que transforma el Lactato a Piruvato en presencia de NAD, siendo este último reducido a NADH, que forma un complejo coloreado con MTT y PMS (Figura 16A). Posee una estructura cuaternaria del tipo tetramérico. En vertebrados presenta dos loci (Richardson y col, 1986), los cuales en su conjunto generan el tetrámero en forma aleatoria (Figura 16B).

En general, se puede revelar adecuadamente con varios sistemas buffer, siendo el mejor el tris citrato pH=8.0, donde migra en forma anodal con una separación de bandas bien marcadas.

2.3.4.3.10. Creatina kinasa (Ck)

Ck cataliza la reacción de la Creatina Fosfato a Creatina en presencia de Mg como cofactor enzimático, permitiendo que el ADP se fosforile a ATP; la reacción reversible entre el ATP a ADP permite que la Hexoquinasa cataliza la reacción de Glucosa a Glucosa-6-Fosfato, producto que es llevado a 6-Fosfogliceraldehido por la acción de la Glucosa-6-Fosfato Dehidrogenasa (G6PDH), permitiendo que el NADP se reduzca a NADPH formando un complejo coloreado con el MTT y el PMS (Figura 17A).

Ck se describe como una estructura cuaternaria dimérica, generada por la presencia de dos loci (Ck-1 y Ck-2) (Figura 17B) descritos para vertebrados con representatividad en los diferentes tejidos.

2.3.4.3.11. Adenilato kinasa (Ak)

Esta enzima descrita por Buth y Murphy en 1980, cataliza la reacción de ATP a ADP en presencia de magnesio (Mg) como cofactor, esta reacción permite que la hexoquinasa lleve la Glucosa a Glucosa-6-Fosfato, esta por acción de la Glucosa 6 Fosfato Dehidrogenasa pasa a 6 Fosfogliceraldeido, permitiendo que el NADP se reduzca a NADPH formando un complejo coloreado con el PMS y el MTT (Figura 18A).

2.3.4.3.12. Malato dehidrogenasa (Mdh)

Enzima responsable de la transformación del Malato en Oxalacetato en presencia de NAD, sufriendo este último una reducción a NADH, en el estado reducido el NADH junto con MTT y PMS da una coloración azul en el gel.

En vertebrados se evidencian 2 loci uno mitocondrial m-Mdh de una escasa migración anodal y un s-Mdh nuclear que presenta una mayor migración anodal, ambos loci descritos como diméricos (Richardson y col, 1996; Hillis y col, 1996), exhiben una serie de artefactos de banda tanto anodales como catodales lo que tiende a mal diagnosticar un polimorfismo.

2.3.4.3.13. Glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (G-3-pdh)

Enzima conocida también como α -Glicerofosfato dehidrogenasa, es la responsable de la catalización del Glicerol-3-fosfato a Dehidroxiacetona fosfato en presencia de NAD, reacción en la cual este último cofactor se reduce a NADH. El NADH en presencia de sales como MTT y PMS dan una coloración azul revelando así la presencia de la enzima en el gel de almidón.

Presenta una estructura cuaternaria dimérica, con un número de 2 loci en general para los vertebrados, la mayoría de las ocasiones sólo uno de los loci se revela, mientras que el otro se tiñe muy débilmente.

2.3.4.3.14. Glucosa dehidrogenasa (Gcdh)

Enzima poco conocida en términos de análisis electroforéticos, formalmente en un principio conocida como Hexosa-6-Fosfato Dehidrogenasa (H6PDH) (Hillis y col, 1996), esta enzima cataliza la reacción de la Glucosa a Glucosa 6 Fosfato.

Se postula que es dimérica aunque no se plantea con seguridad de que esto sea así dado a los pocos estudios que se han realizado (Figura 19A).

2.4. Análisis estadísticos

Una vez definida la nomenclatura, se procede a asignar el eventual genotipo para cada individuo de cada población, llenando una pauta de trabajo (Anexo 5), los que son posteriormente analizados con los programas computacionales BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981) y GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1995). Estos análisis

estadísticos aportaran datos como: frecuencias alélicas, equilibrio de Hardy-Weinberg, variabilidad genética, heterogeneidad poblacional, flujo génico, distancia genética y la obtención de análisis de Cluster.

2.4.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Es importante aclarar que la ley de Hardy-Weinberg se basa en los supuestos de que una población ideal presentan las frecuencias alélicas y genotípicas mantenidas en equilibrio estable siempre y cuando en la población se cumplan los siguientes requisitos: que no exista migración, que el tamaño poblacional sea infinito, que no exista mutación ni selección, que las poblaciones presenten panmixia. Sin embargo, encontrar una población natural que cumpla todas las condiciones señaladas anteriormente sería irreal, a pesar de ello, este análisis permite estudiar las desviaciones genotípicas de las esperadas y sus probables causas.

Las desviaciones de las frecuencias genotípicas observadas en relación a las esperadas bajo las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg, se obtuvieron de los programas computacionales BIOSYS y GENEPOP.

2.4.2 Estimación de los niveles de variabilidad genética

Para determinar el nivel de variabilidad genética en las 19 poblaciones muestreadas de *L. m. monticola* se utilizó el programa computacional BIOSYS, obteniendo los siguientes indicadores:

2.4.2.1 Promedio de alelos por locus (A)

A= se obtiene de la suma de los alelos por locus observados, dividido por el número de loci analizados.

2.4.2.2 Porcentaje de loci polimórficos (P)

P = se obtiene de la suma de todos los loci polimórficos observados, divididos por el número total de loci analizados. Se consideró un locus polimórfico cuando presenta más de una variante alélica independiente de su frecuencia.

2.4.2.3 Heterocigosidad (H)

La Heterosigosidad es la medida de variabilidad genética más simple y ampliamente utilizada. Su importancia radica en que cada heterocigoto lleva diferentes alelos, representando la variabilidad existente. Generalmente en los estudios poblacionales se calculan dos heterocigosidades: La heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) (Capula, 1996; Fisher, 1997).

Heterocigosidad observada (H_o): Esta medición de heterocigosidad en una población, se obtiene de la suma del número de individuos heterocigotos observados para cada locus y se divide por el número total de individuos y loci analizado en la población.

Heterocigosidad esperada (H_e): Esta medición de heterocigosidad para una población, se obtiene de la suma del número de individuos heterocigotos esperados para cada locus, considerando el equilibrio de Hardy-Weinberg, y dividido por el número total de individuos y loci analizados en la población.

2.4.3 Heterogeneidad poblacional

Una medida para analizar la heterogeneidad poblacional o estructura genotípica de una población es la utilización de los estadígrafos F de Wright. Las relaciones genéticas entre las poblaciones estudiadas fueron calculadas usando la identidad genética de Nei (I) y la distancia standard de Nei (D) (Nei, 1972). Este estadígrafo aporta estimativos tales como F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , que representan coeficientes de consanguinidad.

F_{IS} : corresponde a la correlación existente en la unión de dos gametos al azar en relación a la subpoblación, por lo tanto es el coeficiente de consanguinidad, cuyos valores explican las variaciones de la heterocigosidad debido a apareamientos no aleatorios en la subpoblación y a posibles efectos selectivos. Su valor explicaría el grado de panmixia ($F_{IS}=0$) o el grado de consanguinidad ($F_{IS}=1$), como también los excesos o déficit de heterocigotos en la población de acuerdo al signo que presenta su valor: si el valor es negativo (-) da cuenta de un exceso de heterocigotos, y si es positivo (+) da cuenta de un déficit de heterocigotos.

F_{ST} : corresponde a la correlación existente en la unión de dos gametos al azar de dos subpoblaciones en relación a los gametos de la población total. Llamado índice de fijación que explica los cambios en la heterocigosidad debido a subdivisión poblacional y deriva genética, entregando el grado de diferenciación existente, estimado entre las

poblaciones; sus valores siempre son positivos y pueden ser clasificados como (Hartl, 1987; Cuguen y col, 1988):

$F_{ST} = 0$ a 0.05 Escasa diferenciación entre poblaciones

$F_{ST} = 0.05$ a 0.15 Moderada diferenciación

$F_{ST} =$ más de 0.15 Gran diferenciación

F_{IT} : correlación entre dos gametos que se unen para producir un individuo en relación a la población total, se define, por lo tanto, como el grado de consanguinidad de un individuo en relación a la población total, por lo que participa como un índice promedio entre los F_{IS} y el F_{ST} (Fisher, 1997).

Para determinar el grado de significancia de los estadígrafos F se usó la prueba de bondad de ajuste Chi Cuadrado (X^2) para cada locus, esta prueba se aplica bajo las siguientes ecuaciones:

a) F_{IS} y F_{IT} se usa el estadístico X^2 de Li y Horvitz, 1953.

$$X^2 = F^2 N (k - 1); \text{ gl} = k (k - 1) / 2$$

b) F_{ST} se usa el estadístico de X^2 de Workman y Niswander, 1970.

$$X^2 = 2N F_{st} (K-1); \text{ gl} = (k-1) (s-1)$$

Donde N=tamaño total de la muestra, k=número de alelos, s=número de subpoblaciones.

2.4.4 Flujo génico

En general los análisis de flujo génico, en la teoría, se basan en la estructura espacial de las poblaciones naturales, a partir de esta se han planteado variados modelos para explicar el flujo génico, por ejemplo: modelo de isla de Wright, continuo o de aislamiento por distancia y el discontinuo o paso en paso. Sin embargo, en todos estos modelos la estimación del flujo génico se basa en métodos indirectos, tomando en cuenta estimativos como alelos privativos, F_{ST} entre otros.

En este estudio se utilizaron dos métodos para la obtención de los Nm , uno de ellos basado en el F_{ST} estimando el número de migrantes por generación (Nm) bajo una amplia variedad de estructuras poblacionales. El mecanismo utilizado para el cálculo de flujo génico se resume en la siguiente ecuación:

$$Nm_{F(st)} = (1/F_{st} - 1) / 4$$

N =Tamaño poblacional; m = tasa de migración; F_{st} = índice de fijación.

El segundo método utilizado, se realiza a través del programa computacional GENEPOP, el cual realiza una estimación de los Nm basados en el método de alelos privativos.

2.4.5 Distancias genéticas

Mediante el programa BIOSYS se obtuvieron, las distancias genéticas de Nei, (1978) y de Rogers, (1972) para las 19 poblaciones de *L. m. Monticola* (Anexo 8). Las distancias de Rogers obtenidas para estas poblaciones se utilizaron para generar fenogramas por los análisis de Cluster, basados en la metodología UPGMA.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de variantes alélicas

Con un total de 14 sistemas enzimáticos se resolvieron 18 loci (Tabla 2), que dan cuenta de 41 alelos identificados en todas las poblaciones de *L. m. monticola*; la mayoría de los loci presentan migraciones anodales, a excepción de la Aspartato Aminotransferasa (s-Aat), la Glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) y Glutación Reductasa (Gr) (Figura 7, 10 y 15 respectivamente) que presentaron migración catodal. Del total de loci resueltos, para las 19 poblaciones de *L. m. monticola* estudiadas, cinco de ellos resultaron fijos y monomórficos, a saber: m-Mdh, s-Mdh, G3pdh, Ldh-a y Ck-1, todos ellos de migración anodal; s-Sod fue monomórfica en todas las poblaciones excepto para dos individuos de la población Cerro la Campana (alelo privativo).

A continuación se presentan los análisis de frecuencias alélicas para cada uno de los marcadores por separados:

Aspartato aminotransferasa (Aat)

Para este locus sólo se obtuvo el sistema isoenzimáticos catodal a pH 8.0, lo que nos permite decir que se trata del s-Aat presente a nivel citoplasmático. Pese a ensayar en un principio diversos sistemas buffer, no fue posible obtener la Aat mitocondrial (m-Aat), lo que podría atribuirse a que en los lagartos como *L. m. monticola* no este presente o si lo está se encuentra en muy poca cantidad; esto tanto en material fresco de individuos recién colectados, o antiguos.

Para s-Aat se obtuvo la presencia de dos alelos característicos, siendo el alelo A el más común dentro de las poblaciones (Anexo 6), más aún en algunas poblaciones corresponde al único alelo presente, como en las poblaciones de la Raza: Norte, Múltiple Fisiones y la población de Salamanca, esta última perteneciente a la Raza Norte Modificada 2. Sólo la Raza Norte Modificada 1, la Raza Sur y la población de Culimó-Tilama, presentaron alelos A y B aunque este último en una frecuencia menor a excepción de Maipo Sur y Cantillana (Figura 8).

Fosfoglucomutasa (Pgm)

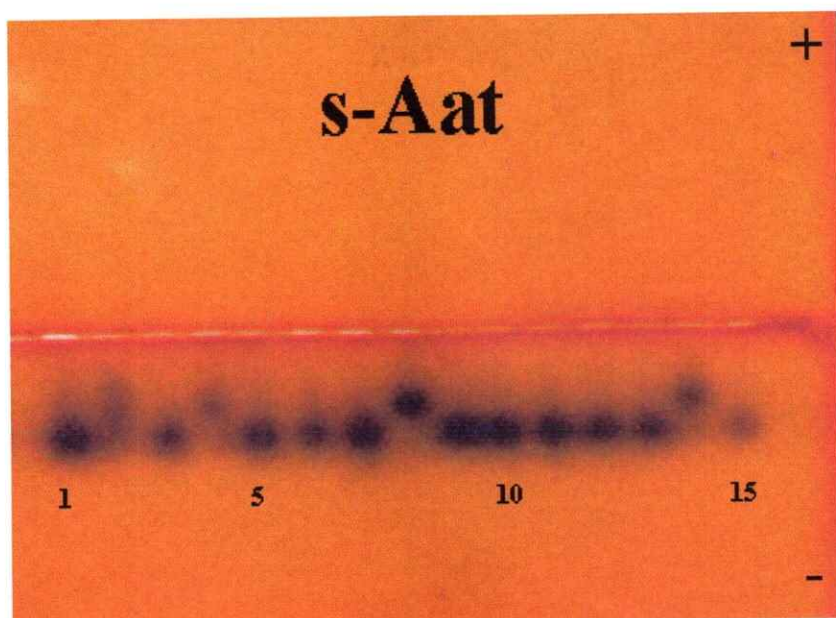
En *L. m. monticola* se observa la presencia de migración anodal en todas las poblaciones estudiadas, con cuatro alelos denominados según patrón de interpretación propuesto (Figura 5 y 6). Es importante mencionar la presencia del alelo A, privativo, sólo en algunos individuos de Cantillana; la alta frecuencia del alelo C en todas las poblaciones y la fijación del mismo en Río Blanco, Yerba Loca, Colorado Sur, Río Rocín, Cabrería, Maipo Sur, Río Lontue y Salamanca. Y en general, el alelo B y D se encuentra presente en variadas poblaciones con una baja frecuencia (Figura 9 A y B).

Glucosa fosfato isomerasa (Pgi o Gpi)

En este estudio claramente se distinguen para este locus dos alelos designados de acuerdo a la interpretación planteada en los materiales y métodos de este trabajo.

En todas las poblaciones de *L. m. monticola* analizadas el alelo B se encuentra en alta frecuencia, llegando a ser fijo en la mayoría de ellas, a excepción de: Cta Dormida, Colorado Norte, Rocín, Hierro viejo, Maipo Sur, Cantillana y Cerro La Campana, donde el alelo A está en baja frecuencia (Anexo 6) (Figura 10 A y B).

A



B

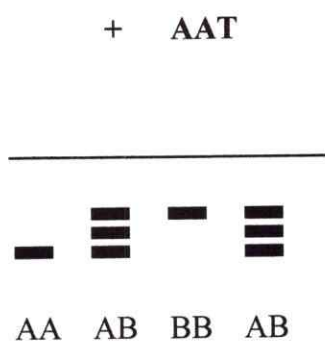


Figura 7: A= fotografía del gel de almidón teñido para Aat, B= zimograma para s-Aat donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

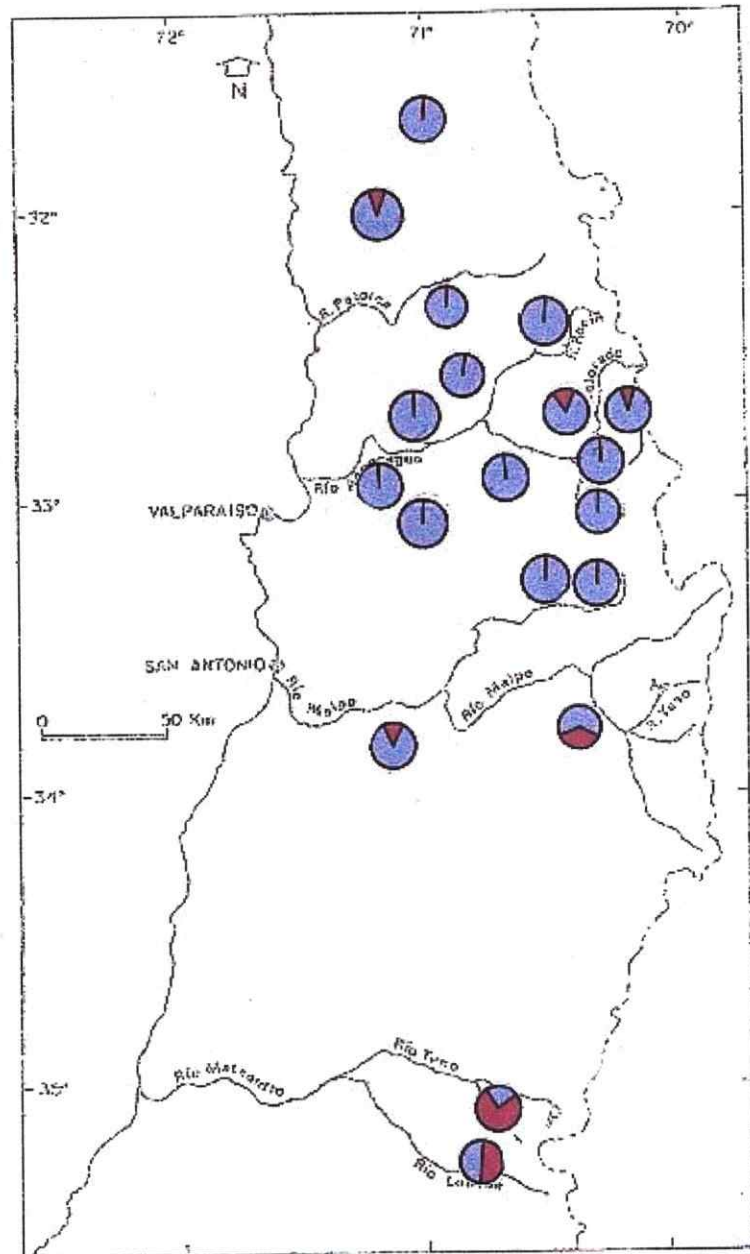


Figura 8: Mapa de distribución geográfica para las localidades de *Liolaemus monticola* analizadas, donde se entregan los valores de las frecuencias alélicas para cada población en el loci s-Aat. En azul el alelo A y rojo alelo B.

Esterasas (Est)

En *Liolaemus* se observó que las Esterasas poseen una migración rápida de tipo anodal, logrando distinguir variados tipos isoenzimáticos, sin embargo, en *L. m. monticola* son solo interpretables: la " α -Esterasa" de migración más rápida y " β -Esterasa", de migración más lenta, ambos loci presentan estructura cuaternaria monomérica, con un alto polimorfismo.

Para α -Esterasa distinguimos tres alelos, denominados de acuerdo a la nomenclatura propuesta (Figura 11 B), donde es importante mencionar que la presencia del alelo C es el de mayor frecuencia, fijándose en Río Lontué y Salamanca. La presencia del alelo A solo en las poblaciones de la Raza Norte, Raza Norte Modificada 1, y una muy baja frecuencia del alelo B en Los Queñes y Maipo Sur, estos últimos de la Raza Sur.

Para β -Esterasa en cambio se interpretaron cuatro alelos (Figura 12 B) con la fijación del alelo B en: Queñes, Maipo Sur, Río Lontué (Raza Sur) y Salamanca (Raza Norte Modificada 2). Los demás alelos se presentan repartidos en las distintas poblaciones en variadas frecuencias exceptuando la ausencia de los alelos A y D para las poblaciones de la Raza Sur (anexo 6) (Figura 14 A).

Las interpretaciones de estas enzimas en ocasiones se dificulta por las cercanías que existe entre ellas, pero al realizar tinciones en geles separados y específicas para cada una, se les puede distinguir claramente. Así para α -Esterasa se aplica la tinción con α -Naphthyl Acetato y la revelación es bastante rápida a temperatura ambiente (unos pocos minutos), en cambio para β -Esterasa que utiliza el β -Naphthyl acetato la aparición

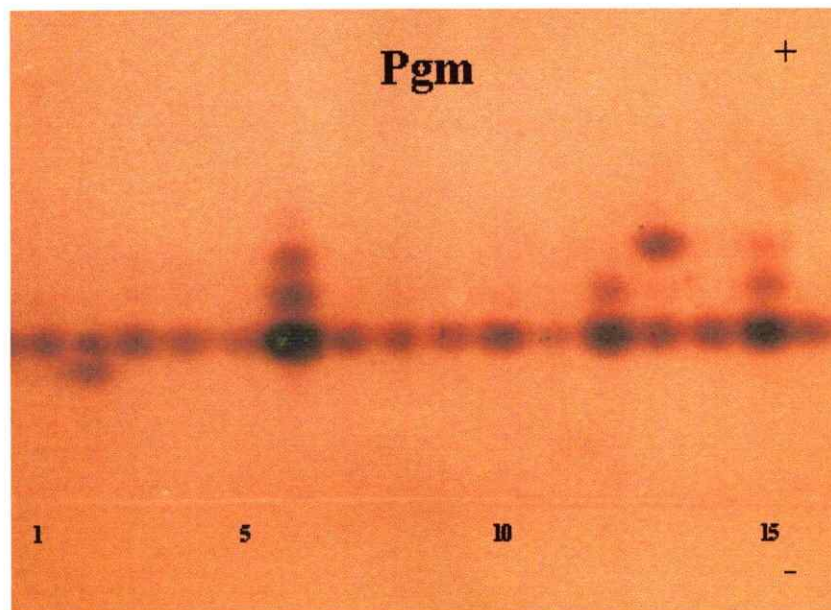
es también rápida pero comparativamente bastante más lenta que para la α -Esterasa. En ambos casos obtenemos la presencia de ambos sistemas isoenzimáticos en un mismo gel (Figura 11 y 12).

Peptidasa-A (Pep-a)

Durante el desarrollo de este trabajo se pudo distinguir la presencia de un locus de migración mas bien rápida y anodal cuya tinción se refleja con bandas de color naranja en un fondo blanco (Figura 13 A). De los diversos sistemas buffer ensayados, la migración más nítida se obtuvo con Tris Citrato a pH 8.0, observándose la presencia de tres alelos para la calificada Peptidasa-a (Figura 13 B), trabajada con un sustrato específico el Glycyl-Leucine.

En esta enzima se puede observar una alta frecuencia para el alelo B, llegando a ser fijo para las localidades de la Raza Múltiple Fisiones, más la población de Salamanca. El alelo A en cambio, se encuentra en baja frecuencia y bastante representativo en casi todas las localidades, exceptuando las poblaciones de la Raza Múltiple Fisiones, Colorado Norte y Salamanca. El alelo C presenta aún una menor frecuencia y en unas pocas poblaciones como Cuesta la Dormida, Chacabuco y Colorado Norte (Anexo 6) (Figura 14 B).

A



B

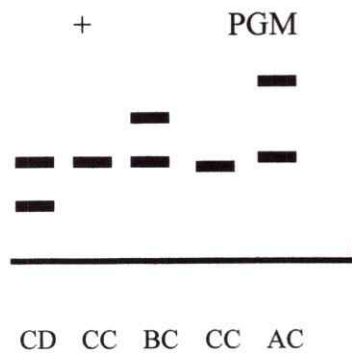
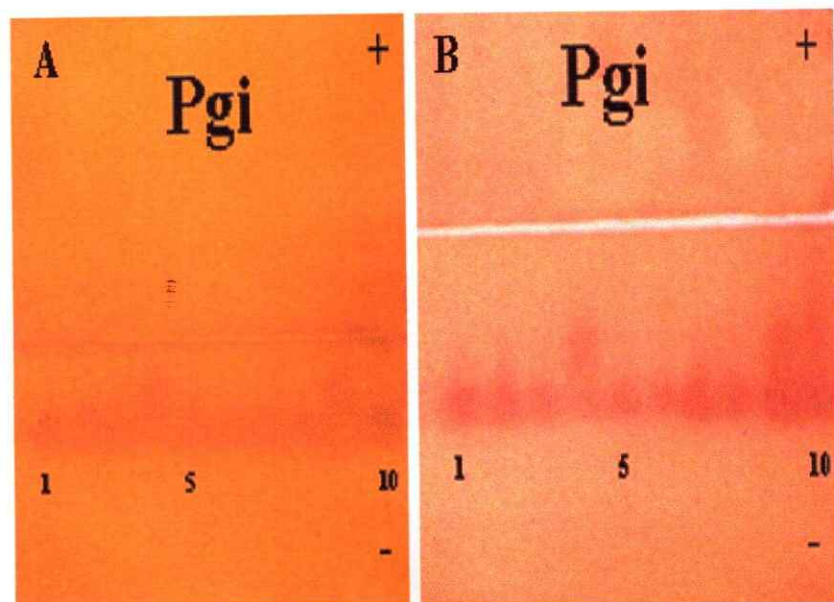


Figura 9: A= fotografía del gel de almidón teñido para Pgm, B= zimograma para Pgm donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

A



B

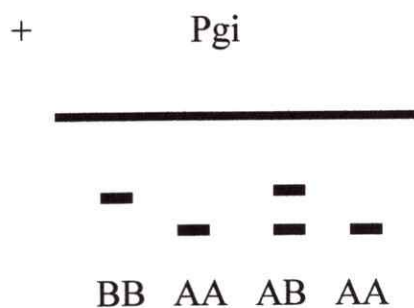
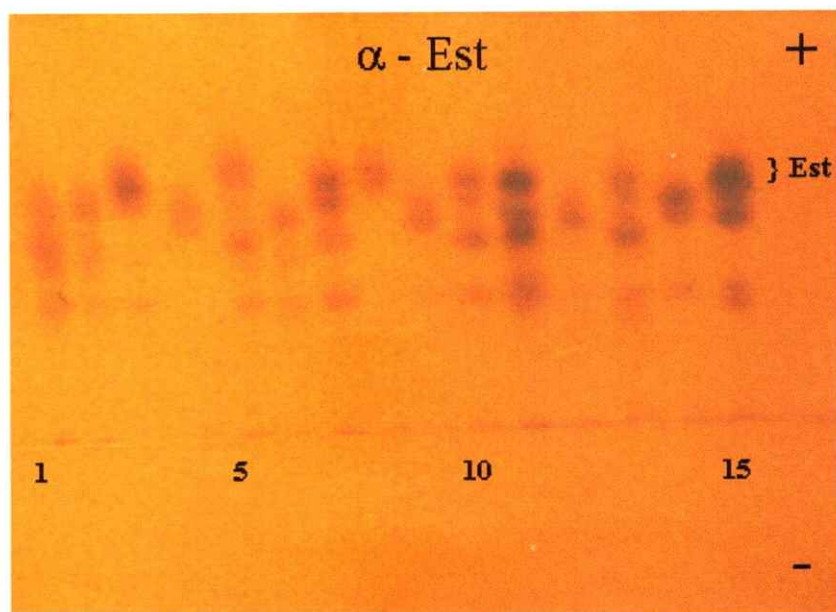


Figura 10: A= fotografía de gel de almidón revelado para Pgi, B= zimograma para Pgm donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

A



B

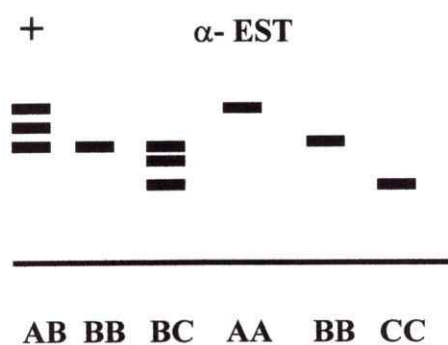
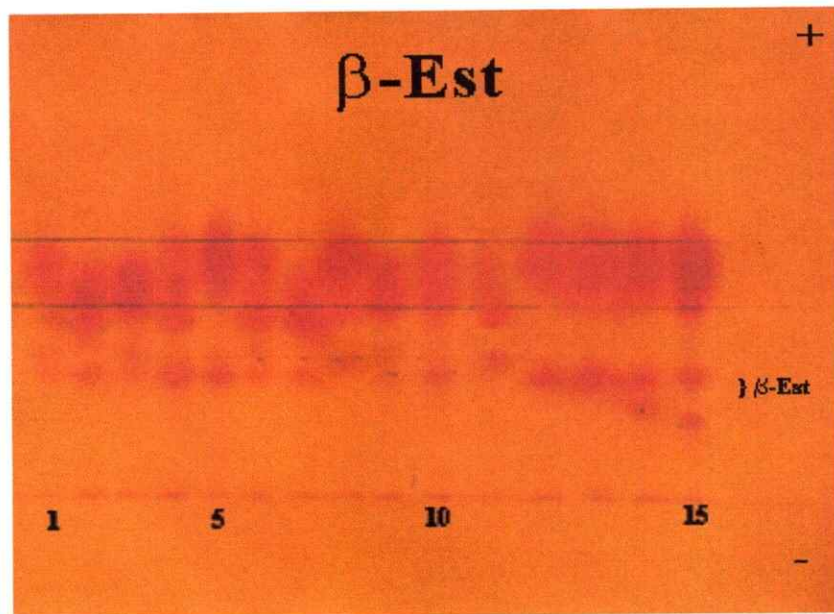


Figura 11: A= fotografía de gel de almidón revelado para α - Est, B= zimograma para α - Est donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

A



B

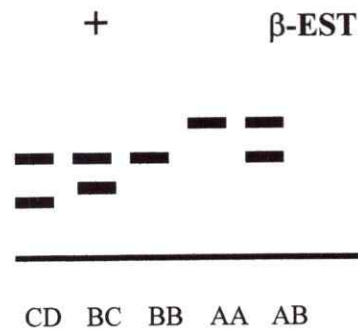
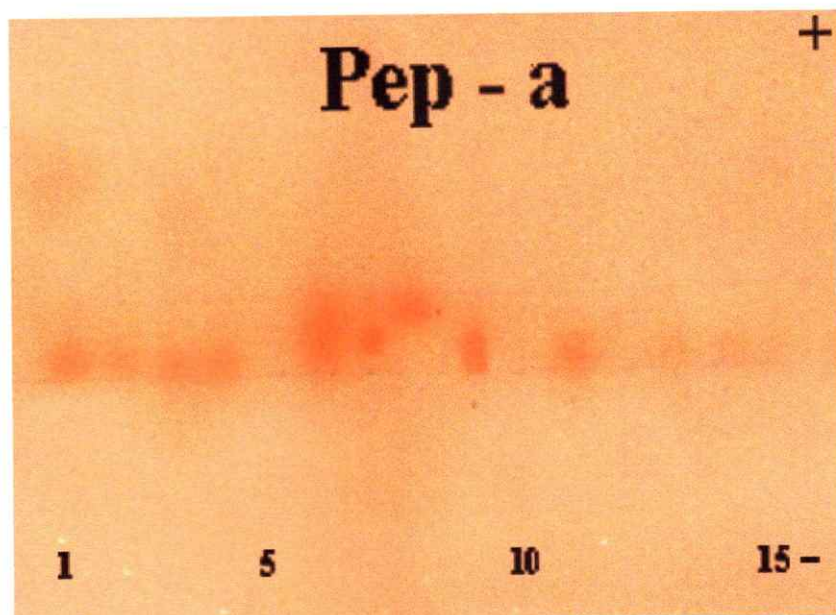


Figura 12: A= fotografía de gel de almidón revelado para β - Est, B= zimograma para β - Est donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

A



B

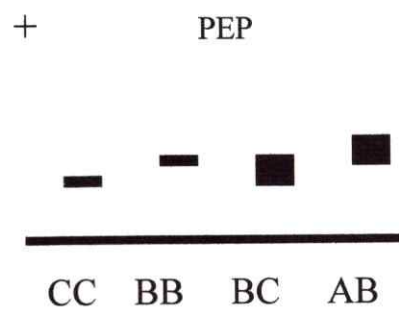


Figura 13: A= fotografía de gel de almidón revelado para Pep, B=.zimograma para Pep donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos

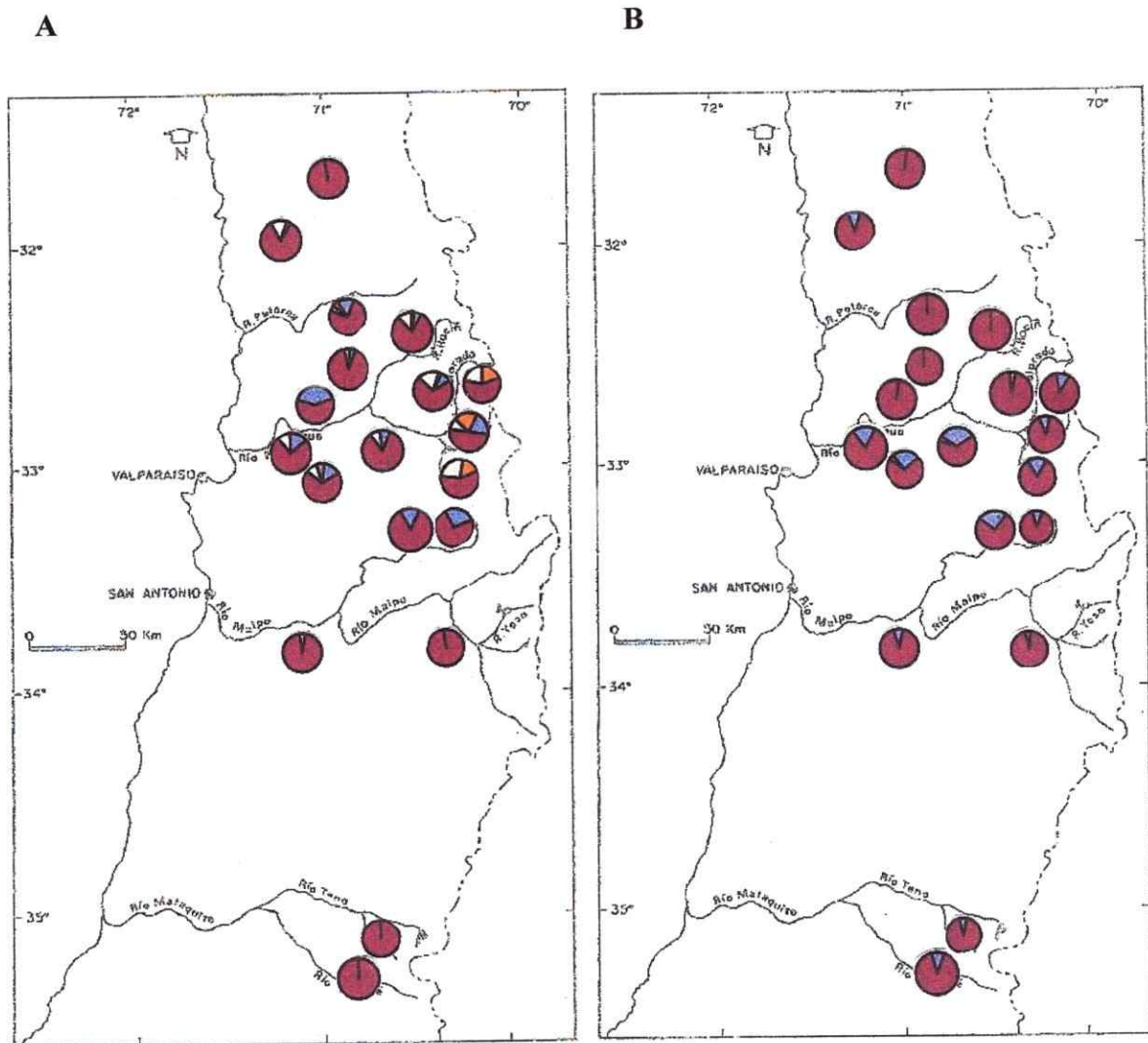


Figura 14: Valores de las frecuencias alélicas para cada población de *Liolaemus monticola*, distribuida geográficamente.

A : β -Est, en azul el alelo A, rojo alelo B, blanco alelo C y naranja alelo D.

B : Pep-A, en azul el alelo A, rojo alelo B y naranja alelo C

α -Manosidasa (α -Man)

En *L. m. monticola* se reveló un locus monomérico con dos alelos, de acuerdo a la interpretación (Figura 5). El alelo A se presenta en baja frecuencia para 18 de las poblaciones estudiadas excepto Los Queñes que tiene fijo el alelo B. (Anexo 6).

Glutación reductasa (Gr)

La Gr de migración catodal más bien rápida con bandas nítidas de coloración verde oscuro en un gel verde más claro (Figura 15 A), permite una buena interpretación. También se observó un patrón de bandas anodales, que al compararlos pudimos constatar que eventualmente corresponden a una enzima denominada Menadión Reductasa (Mnr). Para GR distinguimos la presencia de dos alelos (Figura 15 B), siendo el alelo B el más frecuente en todas las poblaciones, llegando a ser fijo para las localidades de la Raza Sur, Norte Modificada 1 y para las seis poblaciones de la Raza Norte más Salamanca; sólo las localidades de la Raza Múltiple Fisiones, Chacabuco y Culimó-Tilama, presentan el alelo B y A este último en baja frecuencia (Anexo 6).

Superoxido dismutasa (Sod)

En *Liolaemus monticola* solo se obtuvo s-Sod con una migración anodal y dos alelos. Donde el alelo A es fijo para todas las poblaciones a excepción de La Campana única localidad que presenta el alelo B privativo.

Lactato dehidrogenasa (Ldh)

Según la literatura y lo observado pudimos obtener la presencia de dos loci, siendo él más anodal (Ldh-a) invariablemente monomórfico, para todas las poblaciones. En cambio, para el otro sistema isoenzimático (Ldh-b) encontramos la presencia de dos

alelos. La interpretación de los cambios sutiles para Ldh-b se ve esquematizada en la figura 16 B.

Es importante mencionar la presencia del alelo B fijo de Ldh-b para las poblaciones de la Raza Norte modificada 2, Río Blanco, Maipo Sur y Río Lontué, las restantes poblaciones presentan una marcada variabilidad alélica con un alelo A en baja frecuencia.

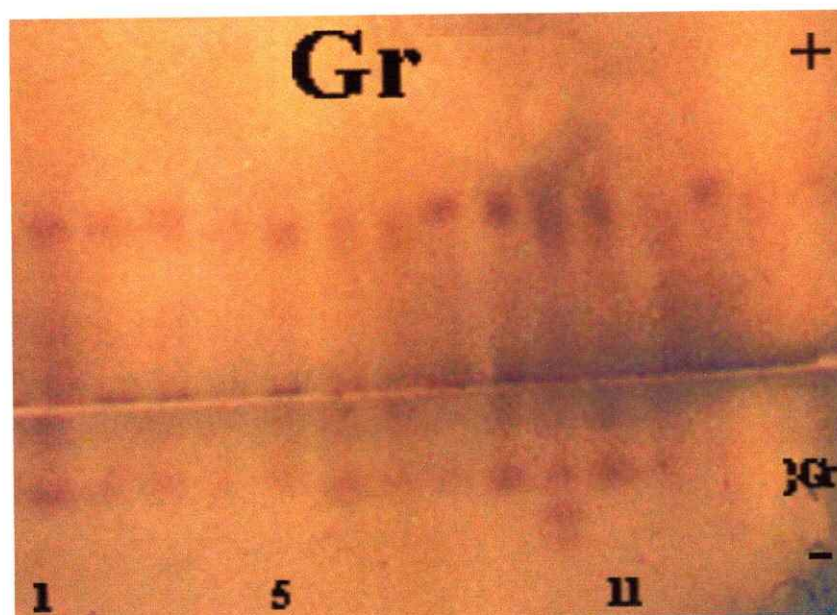
Creatina kinasa (Ck)

Ck, en *L. m. monticola* presenta una migración rápida anodal donde los dos loci se encuentra relativamente muy cercanos entre sí (Figura 17 A) (más anodal Ck-1). Ck-1 presenta un patrón de bandas fijas y monomórficas, mientras que Ck-2 presenta poca variabilidad con una fijación del alelo A en 17 de las poblaciones a excepción de Colorado Sur y Rocín únicas localidades que presentan el alelo B siendo este considerado un alelo privativo (Figura 17 B) (Anexo 6).

Adenilato kinasa (Ak)

Ak posee una estructura cuaternaria del tipo monomérica, describiéndose dos loci para vertebrados: Ak-1 y Ak-2. Ambas poseen una migración de tipo anodal muy pegada al origen, asignando dos loci, muy juntos lo que en ocasiones dificulta la interpretación (Figura 18 B). Los mejores resultados se obtuvieron con un sistema buffer Tris Citrato EDTA pH=8.0. Por problemas de interpretación sólo se pudo diagnosticar Ak-2, altamente variable con dos alelos siendo, el alelo A el más frecuente, para todas las localidades.

A



B

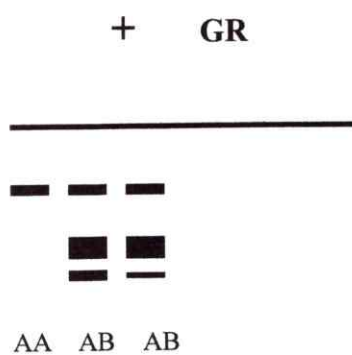
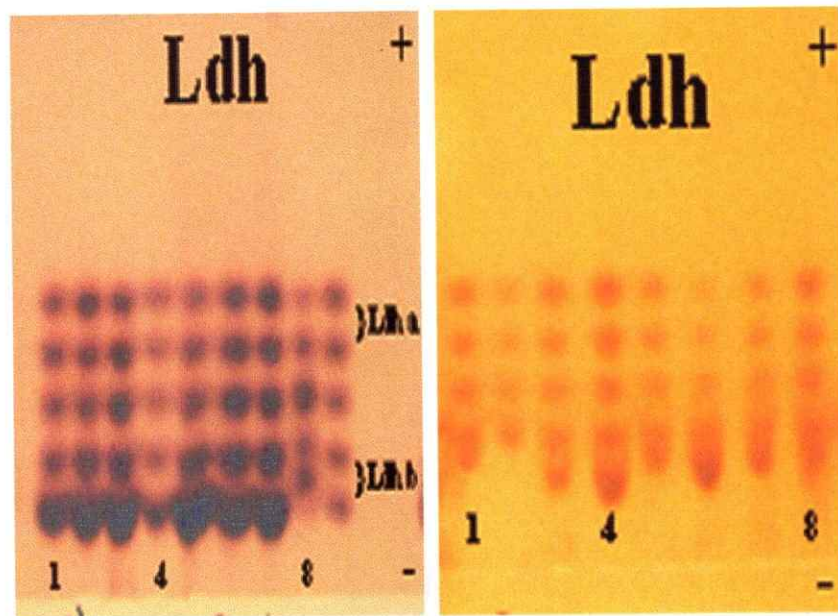


Figura 15: A= fotografía de gel de almidón revelado para Gr, B= zimograma para Gr donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos

A



B

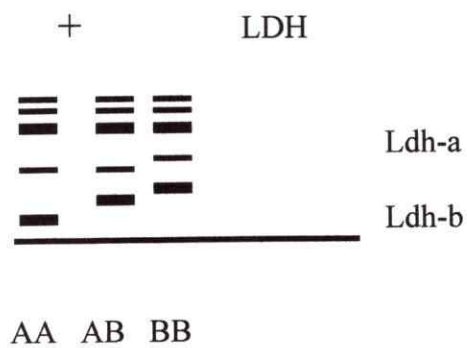
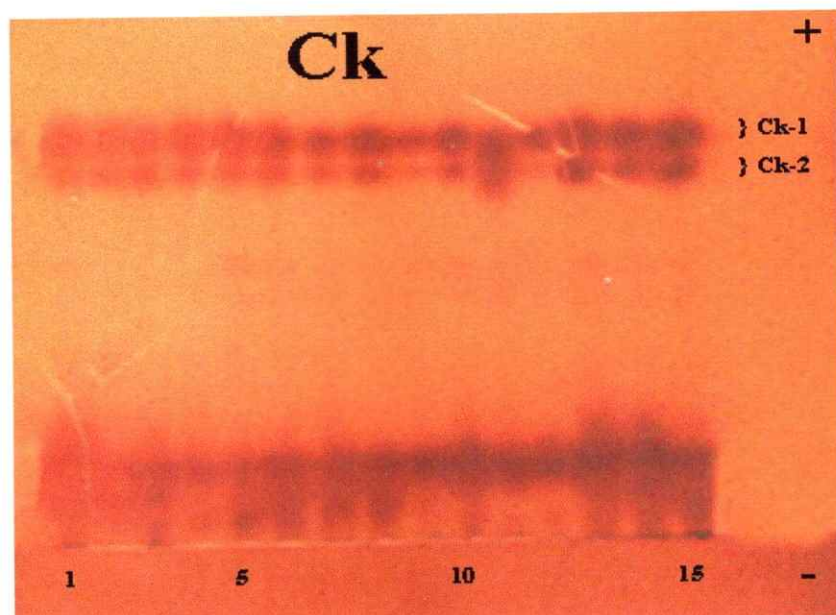


Figura 16: A= fotografía de gel de almidón revelado para Ldh., B= zimograma para Ldh donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

A



B

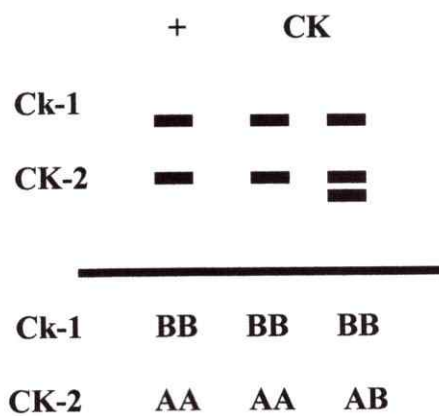
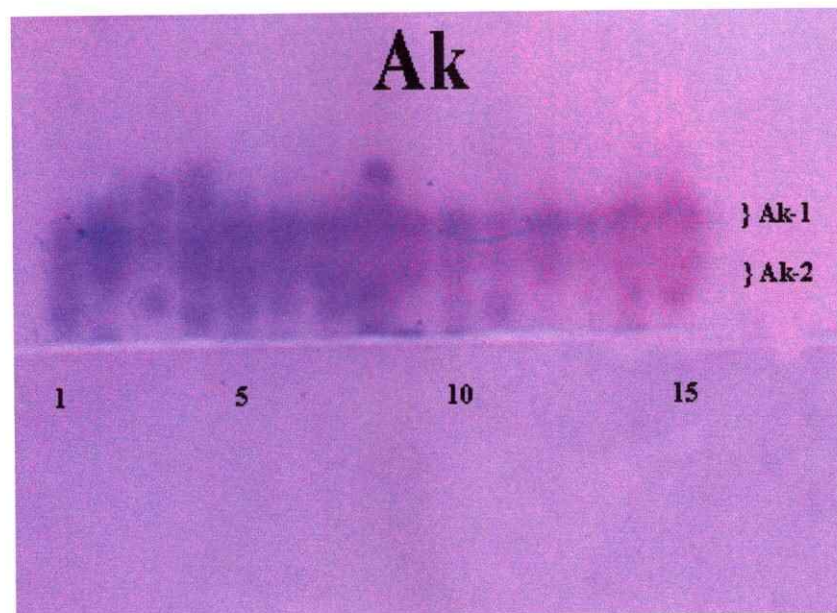


Figura 17: A= fotografía de gel de almidón revelado para Ck, B= zimograma para Ck donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

A



B

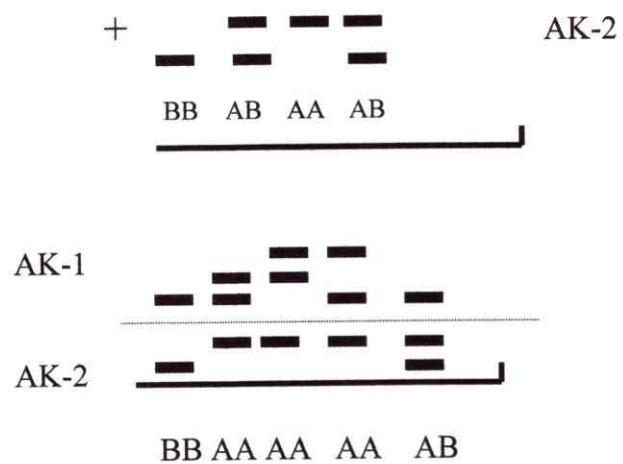
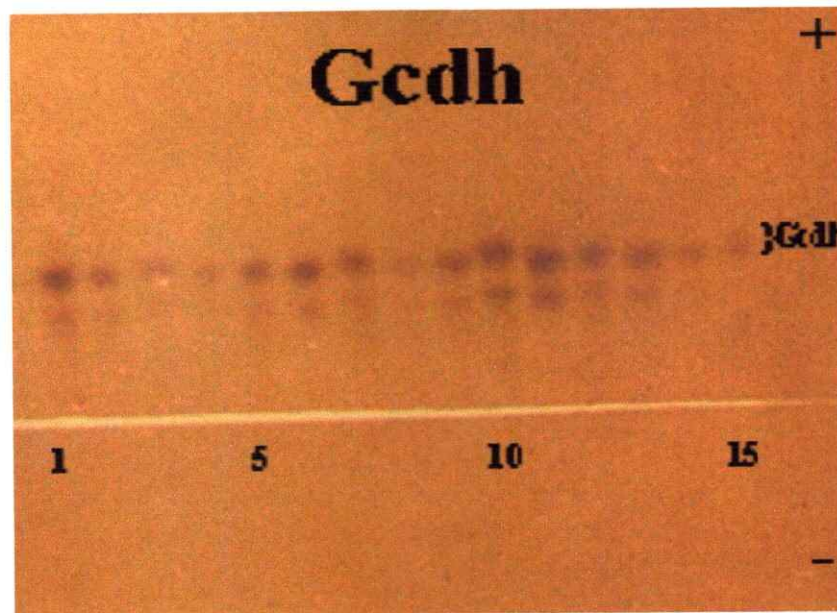


Figura 18: A= fotografía de gel de almidón revelado para Ak, B=. zimograma para Ak donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos

Glucosa dehidrogenasa (Gcdh)

Este marcador, en *Liolaemus*, dió 3 alelos claramente diferenciados (Figura 16A), de acuerdo a la nomenclatura establecida en los Materiales y Métodos, posee un gran polimorfismo alélico, donde la ausencia del alelo A se observó en las poblaciones correspondientes a la Raza Sur con excepción de Cantillana, la ausencia del alelo C sólo en Cabrería. Todas las restantes poblaciones presentaron todos los alelos en diferente frecuencia.

A



B

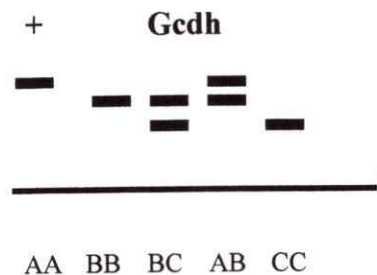


Figura 19: A= fotografía de gel de almidón revelado para Gcdh, B= zimograma para Gcdh donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos

Una forma de visualizar las frecuencias alélicas obtenidas en las poblaciones de *L. m. monticola*, es clasificar los alelos obtenidos para cada marcador enzimático de acuerdo con los criterios de Zanetto y Kremer, 1995 y Schnabel y Hamrick, 1990, así los alelos de acuerdo a sus frecuencias se clasifican en: Alelo frecuente, cuando su frecuencia alélica se encuentra entre 0.20 – 0.99; Alelo con frecuencia intermedia, cuando su frecuencia se encuentra entre 0.11 – 0.19; Alelo raro, cuando su frecuencia es menor al 10 % (bajo 0.10) y alelo privativos, cuando se encuentra presente sólo en una o unas pocas poblaciones, independiente de su frecuencia. Para las 19 poblaciones de *L. m. monticola* estudiadas se obtuvo un total de 41 alelos en 18 loci analizados, cuya clasificación se entrega en la Tabla 4.

TABLA 4
Resumen de los alelos evidenciados en 18 loci analizados en *L. m. monticola* y clasificados de acuerdo a su frecuencia.

Locus/Alelos	A	B	C	D
Aat	F	FI		
Pgm	P	R	F	R
Pgi	R	F		
α -Est	R	F	F	
β -Est	R	F	R	R
Pep-a	FI	F	R	
α -Man	FI	F		
Gr	R	F		
Sod	F	P		
Ldh-b	R	F		
Ck-1		F		
Ck.2	F	P		
Ak-2	F	F		
m-Mdh		F		
s-Mdh	F			
G-3-pdh		F		
Ldh-A	F			
Gcdh	FI	F	FI	

F= frecuente, F.I.= frecuencia intermedia, R= alelo raro y P= alelo privativo.

3.2. Resultados de análisis estadísticos

3.2.1. A nivel de equilibrio de Hardy-Weinberg

Los equilibrios de Hardy-Weinberg obtenidos por BIOSYS son presentados en el anexo 7 y resumidos en la tabla 5. Es importante destacar que las desviaciones de las frecuencias genotípicas observadas en relación a las frecuencias esperadas, bajo los supuestos de equilibrio de Hardy-Weinberg, para la mayoría de las poblaciones y en todos los loci analizados fueron no significativas ($P > 0.05$), salvo algunas excepciones muy puntuales con desviaciones significativas ($P < 0.05$) como: Cuesta la Dormida y Río Blanco para β -Est; Colorado Norte y Cabrería para Gcdh; Cantillana para Pgi; Colorado Sur y Río Lontué para s-Aat. Además hubo poblaciones que presentaron loci con desviaciones catalogadas como altamente significativa ($P < 0.01$) tales como Colorado Norte para α -Man y Ldh-b, Colorado Sur para β -Est - Pep-a - α -Man y La Campana para s-Sod.

Los equilibrios de Hardy-Weinberg obtenidos por el programa computacional GENEPOP son presentados en forma resumida en la tabla 6. Es importante destacar que en la mayoría de las poblaciones y para todos los loci analizados fueron no significativas ($P > 0.05$), salvo algunas excepciones muy puntuales donde las desviaciones fueron significativas ($P < 0.05$) como: Cuesta la Dormida, para β -Est; Río Colorado Norte para α -Man y Ldh-b; Colorado Sur para α -Man y Pep-a Cerro La Campana, para Sod y Río Lontué para s-Aat. De acuerdo a los valores obtenidos con este programa computacional hubo una sola población que presentó un locus con desviaciones catalogadas como altamente significativa ($P < 0.01$), corresponde a Colorado Sur, para β -Est.

TABLA 5

Tabla resumida de los equilibrios de Hardy Weinberg para 9 localidades de *Liolaemus monticola* con desequilibrio, en 13 marcadores polimórficos, obtenidas a través del programa computacional BIOSYS

LOCALIDADES	Aat	Pgm	Pgi	α Est	β Est	Pep	α Ma	Gr	Sod	Ldhb	CK2	AK2	Gcdh
Cta. DORMIDA					*								
RÍO BLANCO					*								
COLORADO NORTE							**			**			*
COLORADO SUR	*				**	**	**						
CABRERIA													*
CANTILLANA			*										
CAMPANA									**				
RIO LONTUE	*												

* Diferencias significativas ** Diferencias altamente significativas

Los espacios en blanco corresponden a desviaciones no significativas, para el resto de las poblaciones que no aparecen en el cuadro todos sus marcadores presentan desviaciones no significativas.

TABLA 6

Tabla resumen de los valores de equilibrios de Hardy Weinberg para 5 localidades de *Liolaemus monticola* con desequilibrio, en 5 marcadores polimórficos, obtenidos por el programa computacional GENEPOP

LOCALIDADES	Aat	β Est	α Man	Sod	Pep-A	Ldhb
Cta. DORMIDA		0.017*				
COLORADO NORTE			0.024*			0.025*
COLORADO SUR		0.001**	0.022*		0.017*	
CAMPANA				0.015*		
RIO LONTUE	0.036*					

* Diferencias significativas ** Diferencias altamente significativas

Los espacios en blanco corresponden a desviaciones no significativas, para el resto de las poblaciones que no aparecen en el cuadro todos sus marcadores presentan desviaciones no significativas.

3.2.2. Variabilidad genética.

Una vez asignados los genotipos (Anexo 5) y corrido el programa BIOSYS, las medidas de variabilidad genética obtenidas se dan en la Tabla 7. El número de alelos por locus va desde 1.3 en Salamanca y Río Lontué a 1.8 en Cuesta La Dormida y Colorado Norte; mientras que el porcentaje de loci polimórficos va de un 22,2 % en Salamanca a un 55.6 % en Colorado Norte, Cantillana y Cerro La Campana. Los índices más bajos del promedio de heterocigosidad observado (H_o) corresponden a Salamanca con 0.049 y los Queñes con 0.065 pertenecientes a la Raza Norte modificada 2 y la Sur respectivamente; en tanto que los más altos se dan para La Campana 0.200 y Yerba Loca 0.169 ambas pertenecientes a la Raza Norte. Las mayores diferencias entre la Heterocigosidad observada y esperada se presentan en las poblaciones de Cerrillo, Colorado Sur y Hierro Viejo.

3.2.3. Heterogeneidad poblacional.

La Tabla 8 proporciona los estimativos para F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} entre las poblaciones de *L. m. monticola*. El promedio de valores F_{ST} es de 0.120, equivalente a una moderada diferenciación (Hartl, 1987; Cuguen y col, 1988), esto indica que el 12% de la variación genética en *L. m. monticola*, es atribuible a la diferenciación entre las poblaciones, y de acuerdo a la fórmula $1-F_{ST}$ que corresponde 0.88 se puede establecer que el 88 % de la variación genética es atribuible a diferenciación dentro de las poblaciones. Los mayores aportes a esta diferenciación son entregados por los marcadores s-Aat (0.419), s-Sod (0.240), α -Est (0.143), β -Est (0.129) y Gr (0.124), todos altamente significativos con el

test de significación de Chi-Cuadrado (Tabla 8). El valor promedio de $F_{is} = -0.053$ sugiere que la heterogeneidad poblacional es debido en parte a panmixia. Sin embargo, el valor negativo de F_{is} indica la presencia de un ligero exceso de heterocigotos lo que es corroborado por 7 de los 13 marcadores polimórficos analizados (Tabla N°8).

TABLA 7
Variabilidad genética de 18 loci enzimáticos en 19 poblaciones de *Liolaemus monticola* estudiadas

PARAMETROS GENÉTICOS						
POBLACION	Mssl	A	P	Ho	He	
1. RIO LONTUE	7.8 (.4)	1.3 (.1)	27.8	0.071 (.031)	0.089 (.038)	
2. QUEÑES	19.7 (.4)	1.4 (.1)	38.9	0.065 (.024)	0.067 (.025)	
3. CANTILLANA	17.2 (.4)	1.7 (.2)	55.6	0.131 (.034)	0.135 (.032)	
4. MAIPO SUR	18.6 (.2)	1.4 (.1)	38.9	0.101 (.041)	0.086 (.032)	
5. FARELLONES	19.0 (.4)	1.6 (.2)	44.4	0.164 (.052)	0.158 (.049)	
6. YERBA LOCA	9.6 (.2)	1.5 (.2)	38.9	0.169 (.058)	0.155 (.052)	
7. CHACABUCO	23.8 (.4)	1.7 (.2)	50.0	0.154 (.047)	0.157 (.050)	
8. CTA. DORMIDA	24.2 (.6)	1.8 (.2)	50.0	0.167 (.048)	0.165 (.048)	
9. LA CAMPANA	12.8 (.4)	1.7 (.2)	55.6	0.200 (.062)	0.182 (.047)	
10. SALADILLO	25.0 (.4)	1.6 (.2)	44.4	0.148 (.051)	0.165 (.054)	
11. RIO BLANCO	4.7 (.2)	1.5 (.2)	33.3	0.136 (.054)	0.148 (.058)	
12. R. COLORADO N.	20.8 (.4)	1.8 (.2)	55.6	0.138 (.050)	0.139 (.043)	
13. R. COLORADO S.	24.6 (.6)	1.7 (.2)	50.0	0.114 (.044)	0.144 (.049)	
14. CABRERIA	6.7 (.1)	1.4 (.1)	38.9	0.123 (.045)	0.136 (.047)	
15. CERRILLO	11.7 (.1)	1.6 (.2)	44.4	0.142 (.053)	0.115 (.039)	
16. R. ROCIN	23.7 (.7)	1.7 (.2)	50.0	0.123 (.042)	0.117 (.038)	
17. HIERRO VIEJO	19.8 (.5)	1.7 (.2)	50.0	0.166 (.054)	0.138 (.043)	
18. CULIMO TILAMA	14.0 (.4)	1.6 (.2)	50.0	0.104 (.032)	0.095 (.028)	
19. SALAMANCA	7.6 (.3)	1.3 (.1)	22.2	0.049 (.029)	0.045 (.026)	
PROMEDIO	16.3 (.0)	1.5 (.0)	44.1	0.129 (0.00)	0.128 (0.00)	

Mssl: Tamaño medio de la muestra por locus, A: promedio de alelos por locus, P: promedio de porcentajes de loci polimórficos,

Ho promedio de heterocigosidad observada y He promedio de heterocigosidad esperada.

() Corresponden a los valores de desviación standard

TABLA 8

Presentación de los estadígrafos F para 13 loci variables, obtenidos para 19 poblaciones y análisis de razas de *Liolaemus monticola*.

LOCUS	19 poblaciones				Razas cromosómicas			
	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}	F _{ST}	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}	F _{ST}
s-Aat	0.162**	0.513	0.419**	0.199	0.398	0.248		
Pgm	-0.096ns	-0.031	0.059**	-0.044	-0.034	0.009		
Pgi	0.045ns	0.100	0.058**	0.101	0.115	0.016		
α-Est	-0.226**	-0.051	0.143**	-0.170	-0.021	0.128		
β-Est	0.032ns	0.157	0.129**	0.072	0.135	0.068		
Pep-a	-0.027ns	0.076	0.100**	0.082	0.139	0.061		
α-Man	-0.102**	-0.018	0.076**	0.064	0.099	0.037		
Gr	-0.189**	-0.041	0.124**	-0.155	-0.046	0.095		
Sod	1.000**	1.000	0.240**	1.000	1.000	0.016		
Ldh-b	0.014ns	0.052	0.039**	0.107	0.126	0.021		
Ck-2	-0.021ns	-0.002	0.018 ^{NS}	-0.009	-0.004	0.006		
Ak-2	0.031ns	0.097	0.068**	-0.006	0.031	0.037		
Gcdh	-0.107ns	-0.052	0.050**	-0.074	-0.058	0.015		
PROMEDIO	-0.053	0.073	0.120	-0.004	0.072	0.076		

(*) Representa aquellos estadígrafos significativos, (**) altamente significativos, NS representa aquellos no significativos según la fórmula de $X^2 = 2Nt F(ST) (K-1)$, gL (grados de libertad) = $(K-1)(s-1)$, siendo K= número de poblaciones.

3.2.4. Flujo génico

La Tabla 9 resume los valores de flujo génico calculados a partir de los estadígrafos F_{st} de cada uno de los loci polimórficos. De esta tabla se puede extraer que el locus Ck-2 presentaría el nivel más alto de flujo génico ($Nm_{F_{st}}=13.6$), mientras que los loci Aat-s y Sod mostraron los valores más bajos de flujo génico ($Nm_{F_{st}}= 0.34$ y 0.79 respectivamente). Los restantes loci fluctuaron su valor de $Nm_{F_{st}}$ entre los 1.49 a 6.16. El promedio general de los $Nm_{F_{st}}$ fue de 1.83 para todos los loci de acuerdo al valor promedio de los F_{st} .

TABLA 9

Valores de flujo génico para los 18 loci enzimáticos en 19 poblaciones de *Liolaemus monticola*

	s-Aat	Pgm	Pgi	α -Est	β -Est	Pep-a	α Man	Gr	s-Sod	Ldh-b	Ck-2	Ak-2	Gcdh	X
F_{st}	0.419	0.059	0.058	0.143	0.129	0.100	0.076	0.124	0.240	0.039	0.018	0.068	0.050	0.120
$Nm_{F_{st}}$	0.34	3.98	4.06	1.49	1.68	2.25	3.03	1.76	0.79	6.16	13.6	3.42	4.75	1.83

A través del programa computacional GENEPOP, se pudo estimar el valor del número de migrantes por generación, de acuerdo al uso de alelos privativos, dando un valor promedio de 0.330.

3.2.5. Distancia genética.

En *L. m. monticola* los valores más altos de distancia genética modificada de Rogers (Anexo 8) corresponden a 0.163 que separa a las poblaciones de Cerro

Cantillana y Queñes pertenecientes ambas a la Raza Sur y Farellones de Maipo Sur Raza Norte y Sur respectivamente (Zona al Sur y al Norte del Río Maipo). En general los valores más altos se dan entre las poblaciones de las Razas Norte con las de Raza Sur. El valor más bajo es 0.042 que enfrenta a las poblaciones de Río Rocín y Mina Cerrillos ambas de la Raza Múltiple Fisiones. En general los valores más bajos se dan al comparar las poblaciones dentro de cada Raza cromosómica.

3.2.6. Análisis de Cluster.

Las relaciones genéticas entre las poblaciones de *L. m. monticola* estudiadas se presentan en la Figura 20. El procedimiento de Cluster de UPGMA muestra el fenograma construido en base a la matriz de distancias genéticas modificada de Rogers, el que revela dos grupos principales que se separan con una distancia cercana a los 0.16 apartando a la Raza Sur y Norte Modificada 2 del resto de las tres razas cromosómicas antes mencionadas. En otro sub Cluster (distancia= 0.12) podemos encontrar a las poblaciones de la Raza Norte modificada 2 y Cantillana separadas del resto de las poblaciones de la Raza Sur. Un segundo sub Cluster (Distancia = 0.11) agrupa las poblaciones de la Raza Múltiple Fisiones que claramente se aparta de las poblaciones de la Raza Norte y Norte Modificada 1. Además cada uno de los sub cluster evidenciados, a su vez, presentan subdivisiones que van a ser coherentes con las ubicaciones geográficas de cada población.

Un segundo fenograma presentado en la figura 21 muestra la separación de las poblaciones agrupadas por Raza Cromosómica y ubicación geográfica, donde se

presenta nuevamente la separación en dos Cluster (Distancia= 0.125) que separa a la Raza Sur y Norte Modificada 2, del resto de las Razas Cromosómicas, a su vez las tres razas cromosómicas (Norte, Norte Modificada 1 y Múltiple fisiones) se ven más limpiamente separadas al analizarlas por razas.

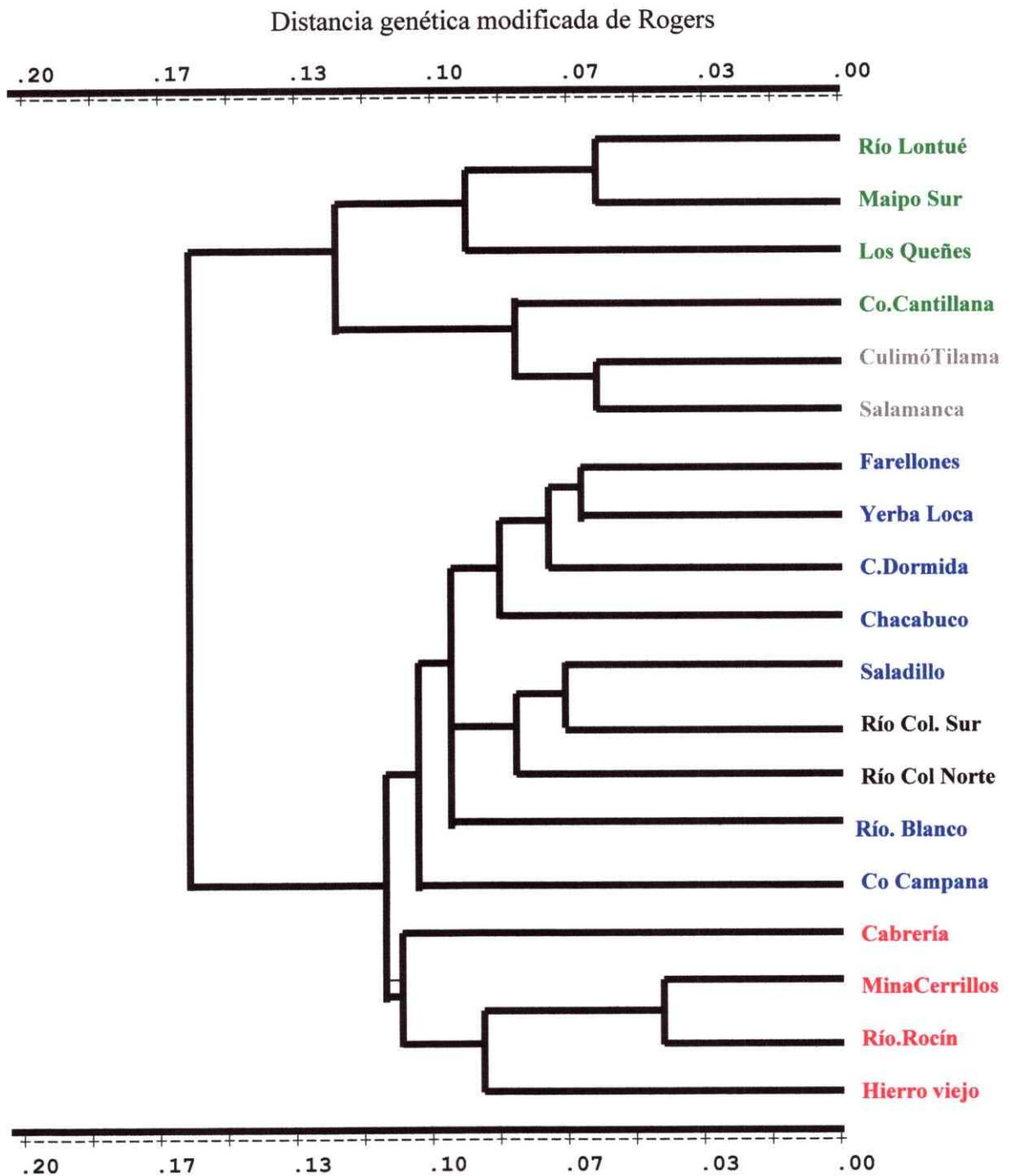


Figura 20: Fenograma generado por UPGMA a través de los análisis de Cluster, basados en las distancias genéticas modificada de Rogers, para 19 localidades de *Liolaemus monticola* pertenecientes a cinco Razas Cromosómicas.

En verde Raza Sur, en gris Raza Norte modificada 2, en rojo Raza Múltiple Fisiones, en azul la Raza Norte y negro Raza Norte Modificada 1

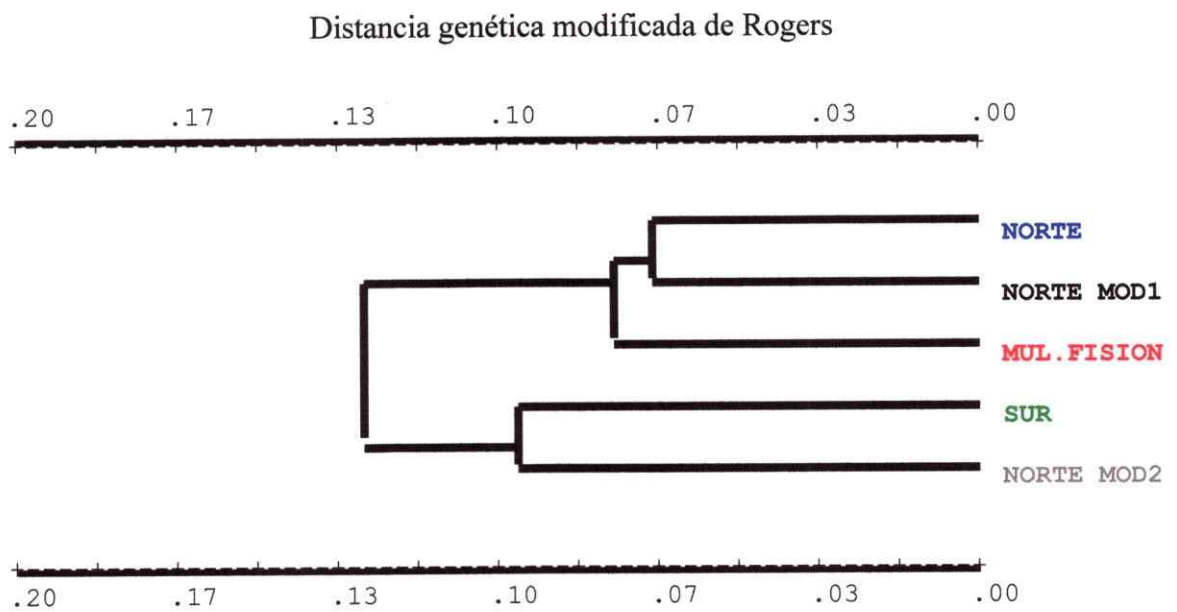


Figura 21: Fenograma generado por UPGMA a través de los análisis de Cluster, basados en las distancias genéticas modificada de Rogers, para cinco Razas Cromosómicas de *Liolaemus monticola*. (genotipos Anexo 5B)
 En verde Raza Sur, en gris Raza Norte modificada 2, en rojo Raza Múltiple Fisiones, en azul la Raza Norte y negro Raza Norte Modificada 1

4. DISCUSION

Variabilidad genética

La variación aloenzimática analizada para las 19 poblaciones de *L. m. monticola*, nos indica que el polimorfismo genético observado, es relativamente alto para la especie. Al analizar los niveles de heterocigosidad, tanto para los valores promedios observados ($H_o=0.129$) como los esperados ($H_e=0.128$) (Tabla 5), resultaron ser mucho mayor que los calculados por: Nevo en 1978, en 17 especies de lagartos del género *Lacerta* ($H_o= 0.04$), Gorman y col. en 1978, en especies de *Anolis* y Hall y Selander en 1973 y Sites y col. en 1988 para *Sceloporus grammicus*. Sólo los valores encontrados por Mendoza-Quijano y col. en 1998 para *Sceloporus variabilis variabilis*, resultaron ser más altos.

Las heterocigosidades obtenidas en los análisis por razas y mapeadas en la distribución geográfica de *L. m. monticola* (Figura 22 A), nos indica que la Raza Sur $2n=34$, considerada como ancestral (Lamborot, 1993), presenta una menor heterocigosidad comparada con las razas, consideradas como derivadas (Raza Norte $2n=34$, Raza Norte Modificada 1 $2n=38-40$ y Raza Múltiple Fisiones $2n= 42-44$), a excepción de la Raza derivada Norte Modificada 2 $2n=38-40$, que presento la menor heterocigosidad entre todas las razas incluidas en este estudio.

Estos estudios contrastan con los obtenidos a nivel cromosómico por Lamborot en 1993, 2001 y Lamborot y col. en 1993, los que muestran una tendencia de franco incremento de la variabilidad cromosómica de sur a norte.

El modelo de especiación cromosómica en “cascada” planteado por Hall en 1973 y 1988, predice que las especies (o razas) cromosómicas derivadas presentarían una menor variabilidad genética que las ancestrales. Este modelo sería compatible considerando la variación cromosómica en *L. m. monticola*, sin embargo, no sería coincidente desde el punto de vista molecular, especialmente para la Raza Sur y Norte; si para la Raza Norte en relación a las restantes razas derivadas (Modificada 1, Múltiple Fisiones y Modificada 2). Una posible explicación radicaría en el tiempo de divergencia y separación que sería mayor entre las razas Sur y Norte.

Un análisis más detallado de la heterocigosidad dentro de las razas Sur y Norte, separándolas en zonas costeras, transversal y andinas, de acuerdo a los diversos cordones geográficos. (Figura 22 B), nos permite observar que la tendencia general es de una mayor heterocigosidad en los cordones costeros, tanto para la raza Sur como para la Raza Norte. Así la raza Sur costa (Cerro Cantillana $H_o=0.131$) presenta una heterocigosidad intermedia entre la raza Sur andes y la Raza Norte, aspecto que coincide con los estudios cromosómicos realizados por Lamborot y col en 1993, donde además se postula una ruta de migración posible a través del rango costero. Así también las poblaciones de la Raza Norte del rango costero presentan una mayor heterocigosidad que las poblaciones del cordón transversal y rango andino. Luego las razas Norte Modificada 1 y Múltiple Fisiones mantienen una heterocigosidad levemente menor que la Raza Norte, y por último la Raza Norte Modificada 2 que presenta una heterocigosidad baja semejante a la Raza Sur.

Valores tan altos de heterocigosidad como los encontrados en *L. m. monticola* y la sustancial diferenciación entre las poblaciones locales estaría indicando la existencia de poblaciones bastante subdivididas en relación a los valores conocidos en otros lagartos evidenciados a través de los estudios realizados por Sites y col. en 1988 y 1993; Arévalo y col. en 1993 y Mindell y col., 1989.

A

B

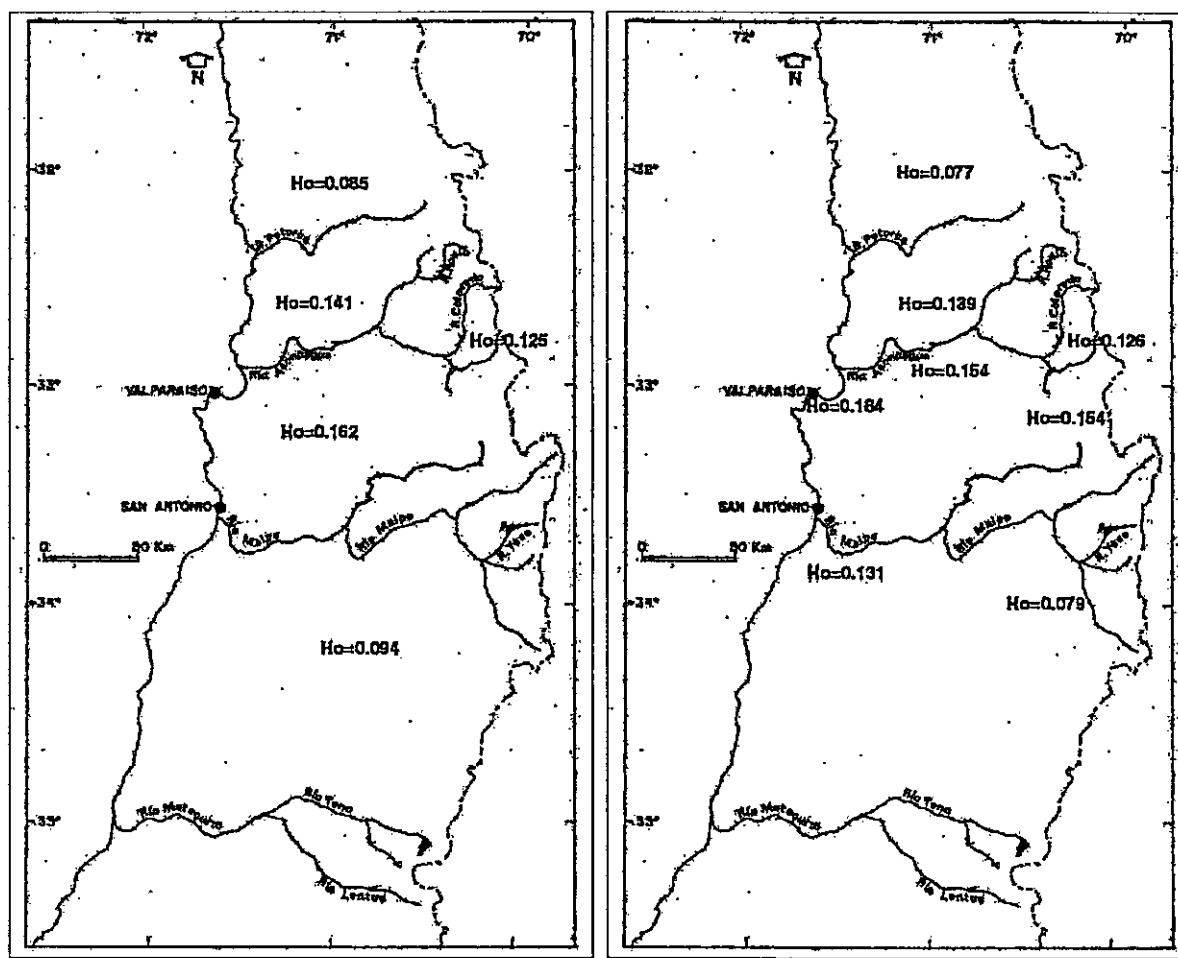


Figura 22: Valores de heterocigosidad observadas para cada raza cromosómicas de *Liolaemus monticola* analizadas, distribuyéndolas en un mapa de ubicación geográfica. A: Estudio por Raza. B: Estudio realizado separando poblaciones por cordones geográficos

Si bien los niveles de heterocigosidad están calculados para el conjunto de alelos y para todas las poblaciones, resulta de interés analizar las frecuencias alélicas para algunos loci en particular. Por ejemplo, para la Aspartato aminotransferasa (s-Aat) (Figura 8) donde se observa una mayor variabilidad para las poblaciones de la Raza Sur, con el alelo B en mayor frecuencia que el resto de las razas en estudio. Para este marcador enzimático en particular, se podría pensar en un posible efecto de deriva génica que involucra una reducción de la variabilidad genética en las poblaciones de las razas derivadas.

Sin embargo, otros marcadores como por ejemplo Gcdh, Gr, β -Est y Pep-a, se comportan en forma inversa, así, las poblaciones derivadas presentarían una mayor variabilidad genética que las postuladas razas ancestrales (Figura 14 y 23), de modo que las poblaciones de cada raza habrían adquirido un grado de variación genética importante a lo largo del tiempo. Lo anterior se ve corroborado por los análisis en las frecuencias alélicas obtenidos de los estudios por razas.

En base a los análisis de las frecuencias alélicas, se puede validar la hipótesis 3 propuesta en este trabajo, en relación al aumento de la variabilidad genética de las poblaciones de las Razas derivadas. Ya que en la mayoría de los marcadores se presenta un aumento de la variación, sólo en algunos casos en particular se podría postular algún efecto de deriva génica en la variación genética observada, permitiendo con esto descartar en alguna medida la hipótesis nula.

Heterogeneidad poblacional

La varianza estimada y estandarizada de los F_{ST} , para el total de las 19 poblaciones, resulta altamente significativa con un valor promedio de 0.120, siendo bastante más alta que los datos obtenidos para vertebrados en general, a excepción de los trabajos de Capula en 1994 y 1996, en *Lacerta* ($F_{ST}=0.460$). Así, basados en el promedio de los valores de F_{ST} , se puede establecer que en *L. m. monticola*, el 12 % de la diversidad genética se da entre las poblaciones, mientras que el 88 % de la variación corresponderían a cambios intrapoblacionales. Así también, los valores de los F_{IS} , que en su mayoría son negativos (7 de los 13 loci polimórficos), permitirían postular un exceso de heterocigotos en las poblaciones, y cuyo valor promedio tendientes a cero, permite proponer un grado de panmixia poblacional.

Basado en los análisis por razas para los F_{ST} , podemos establecer que a nivel interpoblacional, la diversidad genética alcanza a un 7.6 %. En definitiva al comparar los valores de los F_{ST} a nivel poblacional y por razas (12 % y 7.6% respectivamente) la diferencia existente entre ellos nos entrega un valor aproximado de la diversidad genética de un 4.4% el cual es atribuible a la diversidad genética existente dentro de cada una de las razas, este último valor al igual que los obtenidos a nivel poblacional y por razas es bastante alto, lo que de alguna forma estaría reforzando la independencia de los demos locales.

Flujo génico

A nivel genético, los resultados permiten estudiar el flujo génico, a través de los análisis del número de migrantes por generación (Nm), tanto basados en los F_{ST} , como por la presencia de alelos privativos con valores promedios, considerados bajos, de 1.83 y 0.330 respectivamente, lo que hace pensar en una eficiente limitación al flujo génico dado en parte por las barreras geográficas antes mencionadas y la fragmentación poblacional. Asimismo, al comparar a nivel de razas cromosómicas los valores de Nm también son bajos, permitiendo con lo anterior aceptar la última de las hipótesis propuestas, la que establece una efectiva limitación del flujo génico por estas barreras geográficas. Sin embargo, la variación propia de cada una de estas razas, producto de posibles mutaciones nuevas a través del tiempo, establece que las razas derivadas no necesariamente presenten una menor variabilidad genética.

En resumen, la estructura genética de *L. m. monticola* aparece más subdividida que otros lagartos estudiados hasta la fecha por Aguilars y col. en 1988 y Sites y col. en 1993. El patrón de variabilidad genética observada y la aparente variación clinal de los alelos para algunos loci, sugerirían que la estructura genética de *L. m. monticola* se ha modelado por la interacción de procesos estocásticos como: aislamiento geográfico, barreras biogeográficas al flujo génico, deriva génica y agentes selectivos como regímenes bioclimáticos locales cuyo conjunto podría estar favoreciendo algunos alelos de algunas localidades. En este estudio, existen cambios en las frecuencias alélicas para s-Aat, s-Sod, Pep-a, Gr, α y β Est, por ejemplo (Figura 8, 14 y 23).

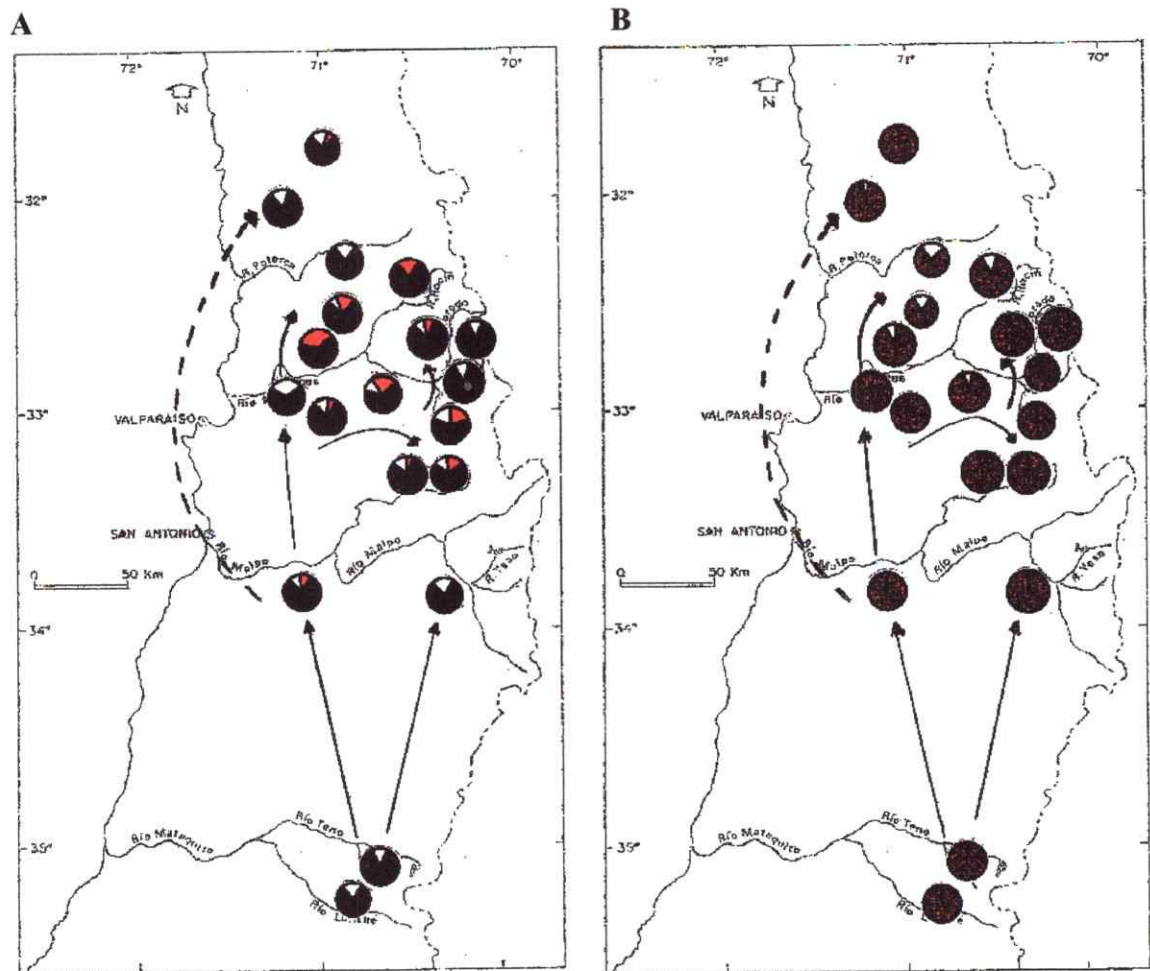


Figura 23 Valores de las frecuencias alélicas para cada población de *Liolaemus monticola*, mapeadas de acuerdo a su ubicación geográfica. A: Gcdh, en naranja el alelo A, negro alelo B y blanco alelo C. B: Gr, en blanco el alelo A y rojo alelo B. Las fechas indican las posibles rutas de migración postuladas para *L. m. Monticola*

Distancias Genéticas

Los datos de distancia genética tanto de Nei como de Rogers (Anexo 8) y los estadígrafos F de Wright, obtenidos en este estudio, tanto a nivel de poblaciones como a nivel de raza, nos permiten distinguir que la divergencia genética se distribuye en dos grupos principales coincidentes, en gran medida, con las razas cromosómicas ancestral v/s derivadas. Esta divergencia aloenzimática encontrada es coincidente con los datos cromosómicos proporcionados por los trabajos de: Lamborot, 1993, 1991, 2001; Lamborot y col, 1979; 1981; Lamborot y Alvarez, 1993 y Lamborot e Eaton, 1997, y también son coincidentes con los datos morfológicos encontrados por Lamborot y Eaton en 1997. Así mismo, las agrupaciones obtenidas a nivel aloenzimático, son coincidentes con la distribución geográfica, dada en particular por barreras geográficas de importancia como son el Río Maipo y el Río Aconcagua, y algunos de sus afluentes, siendo evidenciadas también como barreras geográficas a nivel cromosómico y morfológico.

Sin embargo, las poblaciones de la Raza Norte modificada 2 se ven agrupadas con la Raza Sur lo cual no concuerda con la agrupación general esperada, de acuerdo a los antecedentes cromosómicos y morfológicos descritos por Lamborot y col., esto puede ser explicado por algunas limitaciones del método electroforético que impide diagnosticar variantes alélicas que no difieren en su carga neta, generando con esto que cambios a nivel genético con cargas similares pero no iguales tiendan a diagnosticarse como idénticos. Otra posible explicación puede estar dada por procesos de migración (colonización y recolonización) producidos en el tiempo.

Lo anterior permitiría validar algunas de las hipótesis propuestas, en relación a la evolución ligada y congruente de la variabilidad genética con la cromosómica y morfológica en *L. m. monticola*, descartando, en parte, las hipótesis nulas.

La coherencia, a nivel genético, con la distribución geográfica y barreras geográficas, se ve afianzada al determinar la presencia de alelos privativos para algunas de las poblaciones, en diversas razas cromosómicas (Tabla 4), estos alelos privativos son sugerentes de una variabilidad independiente en las diversas zonas geográficas, coincidentes con las razas cromosómicas encontradas.

Análisis de Cluster

El Fenograma obtenido del análisis de "Cluster", basado en las distancias genéticas de Rogers (anexo 8), cuyos valores aunque bajos, ayuda a validar las hipótesis 1 y 2 propuestas en este estudio, donde los Ríos aparecen como barreras geográficas, permitiendo visualizar una correspondencia entre las Razas cromosómicas y la divergencia genética. Nuevamente la Raza Norte Modificada 2 se observa próxima a la Raza Sur, aspecto que se discutió en párrafos anteriores.

Valores tan bajos de distancia genética entre las Razas cromosómicas no alcanzan a los valores obtenidos para estudios a nivel de especies en lagartos, reafirmando así el estatus de "raza" dada para poblaciones de *L. m. monticola* estudiadas.

Los valores de distancias genéticas de Rogers y/o de Nei muestran valores comparativamente más bajos que los obtenidos en los estudios de divergencia

cromosómica por Lamborot, 2001 y/o los morfológicos de Lamborot e Eaton, 1992, 1997 y Lamborot y col (en preparación). Así por ejemplo, la diferenciación cromosómica de las razas de *L. m. monticola* (Lamborot, 2001), expresada en distancias genéticas de Rogers son bastante grandes al comparar las razas Sur, Norte y Múltiple Fisiones; donde, un primer cluster, a una distancia de 0.60, separa la Raza Múltiple Fisiones de las restantes, mientras que a una distancia de 0.45 se presenta la separación de las Razas Norte y Sur. Esta agrupación también fue observada por Lamborot e Eaton, 1992; 1997 a nivel de diferenciación morfológica, donde se mantiene la tendencia general, separando a las razas Sur y Norte con distancias bastante elevadas (separación 3.6 distancia de Sokal).

La baja divergencia a nivel aloenzimático encontrado en *L. m. monticola*, contrasta con la alta divergencia a nivel cromosómico y morfológico que podría ser explicada, dado que se sabe que las aloenzimas evolucionan a tasas menores que los ADN mitocondriales o Cromosómicos (nuclear) dada la alta tasa de mutaciones cromosómicas de esta especie.

Más aún, cabe hacer notar que a nivel genético dentro de las razas cromosómicas, se presentan distancias genéticas, que aunque pequeñas, permiten diferenciar entre localidades, por ejemplo, dentro de la Raza Sur distinguimos el rango Cordillera de la Costa y Cordillera de los Andes; dentro de la raza norte modificada 1 es posible distinguir las poblaciones Colorado Norte y Colorado Sur, geográficamente separadas solo por el Río Colorado afluente de importancia del Río Aconcagua (Figura 3).

Varias condiciones podrían estar influyendo en la estructuración genética y diferenciación en la tan fragmentada distribución de *L. m. monticola*, cuya coincidencia con los datos cromosómicos y las barreras geográficas que las separan hace difícil discriminar entre ambas. Los ríos pueden ser barreras importantes a la dispersión del flujo génico de algunas especies terrestres, esto es especialmente válido para aquellos ríos que no cambian su curso con el paso del tiempo (Mayr, 1963; Lamborot 1993). En ciertos casos, los ríos pueden separar Razas o especies emparentadas (Pound y Jackson, 1981). Este aspecto se demostró a nivel cromosómico para *L. m. monticola* a través de los estudios realizados por Lamborot en 1993 y 2001.

¿Cómo se dispersaron las razas cromosómicas de *Liolaemus monticola* ?

Estudios previos en *Liolaemus monticola* basados en datos biogeográficos, cromosómico poblacionales, tanto mitóticos como meióticos de Lamborot, 1993, 2001 y por análisis morfológicos de Lamborot e Eaton, 1992, 1997, plantean la hipótesis que la Raza Norte $2n=38-40$ se habría originado de la Raza Sur $2n=34$, probablemente en el rango costero, pues tanto para el valle del Maipo como el valle Aconcagua, ambos habrían escapado a la acción de los glaciares del Pleistoceno (Brüggen, 1950; Huesser, 1966; Vuilleumier, 1971; Caviedes, 1972; Formas, 1979).

Las lenguas de los glaciares habrían actuado como mayores barreras en la Cordillera de los Andes que en la Cordillera de la Costa, debido a que en el rango

costero, durante la glaciación, debieron quedar refugios de individuos que desde allí colonizan.

Actualmente los Ríos Maipo y Yeso actúan como barrera al flujo génico de las razas Sur y Norte de *L. m. monticola*, a excepción de una zona de hibridación secundaria reciente descrita por Lamborot, 1991; Lamborot y col, 1993; en tanto que el Río Aconcagua separa las razas Norte y Múltiple Fisiones (Lamborot, 1993, 2001). Cabe señalar que en ambas laderas del Río Colorado, importante afluente del Río Aconcagua, se presenta la raza Norte modificada 1, cromosómicamente intermedia entre las razas Norte y Múltiple Fisiones (Lamborot y col, en preparación), quedando como una raza aislada en el rango Andino, y que de acuerdo a los datos genéticos obtenidos, es probable que la Raza Norte Modificada 1 corresponde a una zona de contacto del pasado.

Varios episodios de migración y colonización pueden estar dando cuenta de la situación actual de *L. m. monticola*. Si partimos antes o durante del Pleistoceno reciente, es probable que individuos del “tipo raza Sur” ocupasen la actual distribución geográfica de *L. m. monticola*. Un primer evento de colonización probablemente ocurrió en el rango costero concomitante con el establecimiento de los rearrreglos cromosómicos propios de la raza Norte ejemplo: fisión del cromosoma 4 en homocigosis y polimorfismo para la fisión del par cromosómico 3 (Figura 3). Estos rearrreglos se habrían expandido probablemente en toda el área comprendida al norte del Río Maipo. Luego, sobre estos reordenamientos, habría ocurrido un cambio en los pares cromosómicos 6 y 7 típicos de la raza Norte modificada 1, al norte del Río Aconcagua;

seguidos por una nueva ola de cambios probablemente en el sector costero, como fisiones del par 1 y 2 que colonizan el sector comprendido entre los Ríos Aconcagua y Petorca. La raza Norte modificada 2, habría adquirido cambios cromosómicos leves que la diferencian de las razas Norte por una parte y Norte modificada 1 por otra. (Lamborot, 2001).

Los estudios aloenzimáticos estarían aportando información que apoyaría las eventuales rutas de migración propuestas para *L. m. monticola*, y congruentes con los estudios cromosómicos (Lamborot, 2001) y morfológicos (Lamborot y Eaton, 1992; 1997) descritos anteriormente. Basándose en las frecuencias alélicas de algunos loci en particular, por ejemplo Gcdh cuyas frecuencias alélicas están mapeadas en la Figura 23 A, es posible observar que el alelo A no está presente en ninguna de las poblaciones de la raza Sur Andes y sólo aparece en baja frecuencia en la raza Sur Costa, manteniendo su presencia en la mayoría de las poblaciones de las razas derivadas, las flechas permiten visualizar las eventuales rutas de migración y colonización aportado por este loci.

Una situación similar se ilustra para β -Est (Figura 14 B); en este caso en la Raza Sur Andes, el alelo B está fijo, apareciendo el alelo C en la Raza Sur Costa, y a su vez presente en casi todas las poblaciones de las razas derivadas a excepción de Farellones y Yerba Loca, lo que permitiría establecer que la migración se prolongó hasta ese lugar. A esto se suma la posibilidad de cambios genéticos locales, zonas de aislamiento geográfico, con cambios genéticos particulares.

De la misma forma Gr podría estar dando cuenta de las eventuales rutas de migración, especialmente a través del Río Aconcagua (Figura 23 B), aportando importante información junto con otros loci analizados en este estudio.

Este trabajo forma parte de un estudio más amplio de exploración de la variación presentada por *L. m. monticola*, a nivel cromosómico, morfológico y molecular. En último término se espera poder correlacionar estas diferentes bases de datos en vista de una mejor comprensión de la divergencia poblacional acoplada a la divergencia cromosómica y las posibles asociaciones evolutivas para esta especie elejida como modelo de estudio.

5. CONCLUSIONES

1. La variabilidad genética intra e interracial obtenida sugiere que ésta evolucionaría a tasas menores que la variabilidad cromosómica y morfológica encontrada para esta especie.
2. *L. m. monticola* presenta en general un alto polimorfismo genético de acuerdo a los valores de heterocigosidad tanto observada como esperada, siendo estos valores mucho más altos que los encontrados para otras especies de lagartos.
3. Los análisis de cluster realizados a partir de distancias genéticas en 19 poblaciones de *L. m. monticola*, establece una separación primaria de las poblaciones, la que es coincidente con las razas cromosómicas sur (ancestral) y las restantes cuatro razas cromosómicas consideradas como derivadas.
4. Los valores de F_{st} resultaron ser altos, en comparación con otras especies de lagartos, representando una elevada diferenciación interpoblacional, lo que sugiere la existencia de demos locales altamente subdivididos. Sin embargo, la divergencia genética observada no es lo suficientemente alta como para el estatus de especie.
5. De los datos obtenidos se puede señalar que para la mayoría de los marcadores genéticos aloenzimáticos, no presentarían los efectos de la deriva génica, reflejada principalmente por la independencia de la variabilidad genética en las poblaciones consideradas como derivadas; sin embargo, existen otros marcadores donde se evidencia un aumento de la variabilidad en las poblaciones derivadas, posiblemente por un efecto de deriva génica

6. La agrupación de las poblaciones de *L .m. monticola* a nivel genético, coincide con la distribución geográfica y la eventual existencia de barreras geográficas como son los Ríos Maipo y Aconcagua y algunos de sus afluentes más importantes.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aguilars-S., M. A., Sites, J. W. And Murphy W. (1988):** Genetic variability and population structure in the lizard genus *Petrosaurus* (Iguanidae). *J. Herp.* 22: 135-145.
- Arévalo, E., Casas, G., Scott, K., Lara, G. And Sites, J.W. (1993):** Parapatric Hybridization between Chromosome Races of the *Sceloporus grammicus* Complex (Phrynosomatidae) : Structure of the Ajusco Transsect. *Copeia* 1993(2) : 352-372.
- Ayala FJ, Gilpin ME (1974):** Gene frequency comparisons between taxa : Support for the neutral theory of protein polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 : 4847- 4849.
- Brüggen, J., (1950):** Fundamentos de la Geología de Chile. Santiago. Instituto Geográfico Militar.
- Capula, M. (1994a):** Genetic variation and differentiation in the lizard, *Podarcis wagneriana* (Reptilia : Lacertidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 52 : 177-196.
- Capula, M. (1996):** Evolutionary genetics of the insular lacertid lizard *Podarcis tiliguerta* : genetic structure and population heterogeneity in a geographically fragmented species. *Heredity* 77 : 518-529.
- Caviedes, C. (1972):** Geomorfología del cuaternario del valle del Aconcagua , Chile central. Mi selbstverlag der Geographischen Institute der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, I, República Federal de Alemania, 153 pp.
- Coyne JA (1982):** Gel Electrophoresis and Cryptic Protein Variation. *Isozymes : Current Topics in Biological and medical Resaarch* 6 : 1-32.

Cuguen J., Merzeau D. and Thiebaut B. (1988): Genetic structure of european beech stans (*Fagus salvatika L.*): F-statitics and importance of mating systems characteritics in their evolution. *Heredity* 60: 91-100.

Donoso-Barros, R (1964): Reptiles de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago-Chile.

Fisher R., (1997): Dispersal and evolution of the pacific basin gekkonid lizard *Gehyra oceanica and Gehyra mutilata*. *Evolution* 51(3):906-921.

Formas J. R., (1979): La Herpetofauna de los bosques temperados de Sudamérica. In Duellmann W. (ed), *The South American Herpeto-fauna: Its Origin, Evolution and Dispersal*. Monograph Museum of Natural History, N7. Kansas: University of Kansas. pp 341-369.

Frost, D.R and Etheridge, R. (1989): A phylogenetic analysis and taxonomy of iguanian lizards (Reptilia : Squamata). Misc. Publ. N° 81 Univ. Kansas Mus. Nat. Hist.

Gorman, G. C., Y. J. Kim, and S. Y. Yang. (1978): The Genetics of colonization: loss of variability among introduced populations of *Anolis* lizard (Reptilia, Lacertilia, Iguanidae). *J. Herp* 12:47-51.

Hafez, R. (1980): Etudes sur la Cytogenétique et l'Evolution génétique chez quelques cyprinides de la region Midi-pyrenées. Tesis Doctorado, L'Institut National Polytechnique de Toulouse.

Hall W.P., and R. K. Selander (1973): Hibridization of Karyotypically diferentiated populations in the *Sceloporus grammicus* complex (Iguanidae). *Evolution* 22: 226-242.

Hartl, D. (1987):A primer of population genetics. Sinauer Associates Inc. Publisher, Massachusetts.

Harrison RG (1979): Speciation in North American field crickets : Evidence from electrophoretic comparisons. *Evolution* 33: 1009-1023.

Harris H. And Hopkinson D.A. (1976):Handbook of enzyme electrophoresis in human Genetics. North-Holland, Ansterdam.

Hillis, D.M., Moritz, C. And Mable, B.K. (1996): Molecular Systematic (second edition). Edited by Sinauer Associates, Inc. USA.

Hoelzel, A.R. (1992) : Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach. Edited by Oxford University Press, New York , USA.

Hubby, J.L. and Lewontin, R. C. (1966): A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54 : 577-594.

Huesser, C.J. (1966): Late-Pleistocene pollen diagrams from the province of Llanquihue, Southern Chile. *Proc. Amer. Philos. Soc* 110: 269-305.

Lamborot, M. (1991) : Karyotypic Variation among populations of *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) separated by Riverine Barriers in the Andean Range. *Copeia* 1991(4) : 1044-1059.

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

- Lamborot M., (2001):** Karyotypic polymorphism and evolution within and between the *Liolaemus monticola* (Iguanidae) "northern $2n=38-40$ " chromosome race populations in central Chile. *Rev Chilena de Hist. Natural* 74:121-138.
- Lamborot, M., Espinosa, A. And Alvarez, E. (1979):** Karyotypic Variation in Chilean lizards of the genus *Liolaemus* (Iguanidae). *Experientia* 35 : 593-594.
- Lamborot, M., Alvarez, E., Campos, I. And Espinoza A. (1981):** Karyotypic characterization of three Chilean subspecies of *Liolaemus monticola* . *The Journal of Heredity* 72 : 328-334.
- Lamborot, M., Espinosa, A. And Alvarez, E. (1989):** Karyotypic characterization of some *Liolaemus* Lizard in Chile (Iguanidae). *Genome* 32:393-403.
- Lamborot, M., Eaton, LC. (1992):** Concordance of morphological and chromosomal races in *Liolaemus monticola* (*Tropiduridae*) separated by riverine barrers in the Andes. *Zeitschrift fur Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 30: 189-200.
- Lamborot, M., and Alvarez, E. (1993) :** Karyotypic variation within and between population of *Liolaemus monticola* (*Tropiduridae*) separated by the Maipo River in the costal range of Central Chile. *Herpetologica* 49(4) : 435-449.
- Lamborot, M., and Eaton, L. (1997):** The Maipo River as a biogeographical barrier to *Liolaemus monticola* (*Tropiduridae*) in the mountain ranges of Central Chile. *J. Zoo. Syst. Evol. Research* 35: 105-111.
- Lamborot M. and Vasquez M:, (1998):** A triploid lizard of *Liolaemus gravenhorsti* (*Tropiduridae*) in central Chile. *Journal of Herpetology* 32: 617-620.

- LI C. And Hordvitz D. (1953):** Some methods of estimating the inbreeding coefficient. Am. J. Hum: Genet. 5: 107-117.
- Mayr, E. (1963):** Animal Species and Evolution. Cambridge, Belknap.
- Mendoza-Quijano F., O. Flores Villela, and J. W. Sites Jr (1998):** Genetic variation, Species status, and Phylogenetic Relationships in Roso Bellied Lizards (*Variabilitis* Group) of the Genus *Sceloporus* (Squamata: Phrynosomatidae). Copeia 2: 354-366.
- Mindell, D., Sites, J.W. and Graur, D. (1989) :** Speciation Evolution : A Phylogenetic test with allozymes in *Sceloporus* (Reptilia). Cladistics 5 : 49-61.
- Müller VL and Hellmich W (1932):** Beitrag zur Kenntnis der Herpetofauna Chiles. IV. *Liolaemus monticola* , ein weiterer neuer. Rassenkreis aus den Hochanden Chiles. Zool. Anzeiger Bd. 99 : 177-192.
- Nei, M. (1972):** Genetic distance between populations. Am. Nat., 106 : 283-292.
- Nei, M. (1978):** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
- Nevo, E. (1978):** Genetic variation in natural populations : patterns and theory. Theor. Pop. Biol. 13 : 121-177.
- Pounds, J.A. and Jackson, J.F. (1981):** Riverine Barriers to geneflow and differentiation of fence lizard population. Evolution 35 : 516-528.
- Pretorius, A.M.G, Kolb, H.J., Grosse-Wilde, H. And Albert, E. (1975) :** Preliminary evidence for a fourth phosphoglucumutase (PGM) locus in the dog. Transplant. Proc. 8 : 567-570.

Raymond M., Rousset F. (1995): Genepop, Population genetic software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86:248-249.

Richardson, B.J., Baverstock, P.R. and Adams, M. (1986): Allozyme Electrophoresis : A Handbook for Animal Systematic and population Studies. Edited by Academic Press.

Rogers, J. F. (1972): Measures of genetic similarity and genetics distances. Univ. Texas Publ. 721: 145-153.

Sites, J.W., Camarillo, J.L., Gonzalez, A., Mendoza, F., Javier, L., Mancilla, M. And Lra-Gongora, G. (1988): Allozyme variation and genetic divergence within and between three cytotypes of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria : Iguanidae) in Central Mexico. *Herpetologica* 44(3) : 297-307.

Sites, J.W., Scott, K., Delbert, D., Hutchison, W., Maurer, B. And Lara, G. (1993): Parapatric Hybridization between Chromosome Races of the *Sceloporus grammicus* Complex (Phrynosomatidae) : Structure of the Tulancingo Transect. *Copeia*, 1993 (2) : 373-398.

Soltis, D.E. and Soltis, P.S. (1989): Isozymes in Plant Biology. Editions Dioscorides Press, SW Wilshire Portland, Oregon 97225.

Swofford, D.L. and Selander, R.B. (1981): BIOSYS-1. A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics.

J. Hered., 72 :281-283.

Thompson, M., Hodgskiss, P.D., Nunnally, L.B. and Hunter, S.C. (1982) : Starch Gel Electrophoresis of Conifer Seeds : a laboratory manual. Pacific Southwest, Forest and Range, Experiment Station.

Vuilleumier, B. S. (1971): Pleistocene changes in the fauna and flora of south America. Science 173: 771-780.

Workman P., and Niswander J. (1970): Population studies on southwenstern indian tribes. II.Local genetics differentiation in the Papago. Am. J. Hum. Genet. 22: 24-49

Zanetto, A. Kremer, A. (1995):Geographical structure of gene diversity in *Quercus petraea (Matt) Liebl.* I Monolocus paterns of variation. Heredity 75: 506-517.

ANEXOS

ANEXO N° 1

COMPOSICION QUIMICA DEL BUFFER DE EXTRACCION

Trizma Base	(0,01 M)	1,21 gr/litros
EDTA ph 6,8	(0,001 M)	0,37 gr/litros
NaCl	(0,03 M)	1,75 gr/litros
Agua destilada		1000 ml

Ajustado a Ph 6,8 con HCl

ANEXO N° 2

SISTEMAS BUFFER UTILIZADOS EN LAS CORRIDAS ELECTROFORETICAS

Tris Citrato Ph 8,0

Solución stock

Trizma Base	(0.687 M)	83.2 g/L
Acido cítrico monohidrat.	(0.157 M)	33.0 g/L
Ajustar a pH 8.0.		

Solución electrodo:

Sin diluir la solución stock.

Solución gel:

Dilución de 1:29 de la solución stock.

Tris Borato EDTA pH 8,0

Solución Stock:

Trizma Base	(0.50 M)	60.6 g/L
Acido Bórico	(0.65 M)	40.2 g/L
EDTA	(0.02 M)	6.7 g/L
Ajustar a pH 8.0		

Solución electrodo:

Sin diluir la solución stock.

Solución gel:

Diluir 1: 9 de la solución stock.

Tris Citrato EDTA pH 8,0

Solución stock:

Trizma Base	(0.135 M)	16.4 g/L
Acido cítrico	(0.045 M)	9.46 g/L
EDTA	(1.3 mM)	0.44 g/L
Ajustar a pH 8.0		

Solución electrodo:

Sin diluir la solución stock.

Solución gel:

Diluir 1 : 14 de la solución stock.

ANEXO N° 3

RECETAS DE TINCIÓN ESPECIFICA PARA DIVERSOS MARCADORES ENZIMAS

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (Aat)

Buffer fosfato (0.2 M) pH 7.5	25	ml
Piridoxal-5-fosfato (solución 0.5 %)	0.8	ml
Albúmina de bovino	750	mg
Acido L-Aspártico pH 7.5 (0.2 M)	6.8	ml
Fast Garnet GBC	6.0	mg

FOSFOGLUCOMUTASA (Pgm)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 8.0	50	ml
MgCl 2 (0.1 M)	5.0	ml
a-D-glucosa-1-fosfato	0.1	g
Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa	40	U
NAD (10 mg / ml)	2.0	ml
MTT (5 mg / ml)	1.0	ml
PMS (5 mg / ml)	1.0	ml

GLUCOSA -6-FOSFATO ISOMERASA (Pgi)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 7.0	50	ml
MgCl 2 (0.1 M)	5.0	ml
D-fructosa 6 fosfato	0.04	g
Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa	40	U
NADP (10 mg / ml)	2.0	ml
MTT (5 mg / ml)	1.0	ml
PMS (5 mg / ml)	1.0	ml

α -ESTERASA (α -Est)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 7.0	50	ml
α -Naphthyl Acetato solución	3.0	ml
Fast blue BB salt	0.05	g

β -ESTERASA (β Est)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 7.0	50	ml
b-Naphthyl Acetato solución	3.0	ml
Fast blue BB salt	0.05	g

PEPTIDASA (Pep-A)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 8.0	50	ml
Valina-Leucina	0.04	g
Veneno de serpiente	0.01	g
Peroxidasa	0.02	g
o-dianisidine dihydrochloride	0.01	g

α -MANOSIDASA (α -Man)

Buffer fosfato citrato pH 4.0 (0.1M)	5.0	ml
4-methylumberyfery- α -Dmanopyranosido	0.01	g

GLUTATION REDUCTASA (Gr)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 8.0	13	ml
2,6 indofenol (2 mg / ml)	1.0	ml
Glutación oxidado	0.02	g
Flavina adenina	0.002	g
NADH	0.01	g
MTT (5 mg / ml)	1.0	ml

SUPEROXIDO DISMUTASA (Sod)

Buffer Tris HCl (0.005M)	50	ml
Riboflavina	0.002	g
EDTA	0.001	g
MTT	0.01	g

LACTATO DEHIDROGENASA (Ldh)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 8.0	50	ml
Solución de Lactato de Litio (0.1 M) pH 8.0	8.0	ml
NAD (10 mg / ml)	1.0	ml
MTT (5 mg / ml)	1.0	ml
PMS (5 mg / ml)	1.0	ml

CREATINA KINASA (Ck)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 7.0	50	ml
MgCl ₂ (0.1 M)	1.0	ml
ADP	0.03	g
D(+) glucosa	0.05	g
Hexoquinasa	200	U
Fosfocreatina	0.05	g
Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa	40	U
NAD (10 mg / ml)	1.0	ml
MTT (5 mg / ml)	1.0	ml
PMS (5 mg / ml)	1.0	ml

ADENILATO KINASA (Ak)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 8.0	50	ml
MgCl ₂ (0.1 M)	6.0	ml
ADP	0.03	g
D(+) glucosa	0.1	g
hexoquinasa	200	U
Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa	40	U
NAD (10 mg / ml)	2.0	ml
MTT (5 mg / ml)	1.0	ml
PMS (5 mg / ml)	1.0	ml

MALATO DEHIDROGENASA (Mdh)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 8.0	50	ml
D-l-ácido malico (2.0 M)	5.0	ml
NAD (10 mg / ml)	1.0	ml
MTT (5 mg / ml)	1.0	ml
PMS (5 mg / ml)	1.0	ml

GLICEROL-3-FOSFATO DEHIDROGENASA (G-3-pdh)

Buffer Tris HCl (0.2 M) pH 8.0	50	ml
DI- α -Gliceraldehido fosfato pH 8.0	1.0	g
NAD (10 mg / ml)	2.0	ml
MTT (5 mg / ml)	1.0	ml
PMS (5 mg / ml)	1.0	ml

GLUCOSA DEHIDROGENASA (Gcdh)

Buffer fosfato de potasio (0.05 M) pH 7.0	50	ml
D(+) Glucosa	9.0	g
NAD (10 mg / ml)	2.0	ml
MTT (5 mg / ml)	1.0	ml
PMS (5 mg / ml)	1.0	ml

ANEXO N° 4

METODOLOGIA DE FIJACION Y PRESERVACION DE GELES DE ALMIDON

Una vez los geles de almidón teñidos son expuestos a la siguiente metodología de trabajo :

- 1.- Aplicar una solución fijadora (Metanol-acético en proporción 3 : 1) por aproximadamente 5 a 10 minutos, en la cubeta de tinción una vez sacada la tinción y enjuagado el gel.
- 2.- Lavar con abundante agua en lo posible destilada.
- 3.- Dejar el gel durante toda la noche en Glicerina al 10 %
- 4.- Depositar el gel entre dos hojas de papel celofán bien estirado, poniéndole un vidrio como soporte.
- 5.- Dejar secar el gel por unas 2 horas a 40° C en una estufa de cultivo.
- 6.- Dejar secar el gel por unas 4 horas más pero a 60° C.

ANEXO N° 5
MATRIZ DE GENOTIPOS ASIGNADOS POR INDIVIUO PARA CADA MARCADOR ELECTROFORETICO

	AAT	PGM	PGI	aES1	bES	PEP	aMAN	GR	SOD	LDHb	CK1	CK2	AK2	MMDH	SMDHG3PDH	LDHa	GCDH	
1. Rio Lontue																		
2108,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AB	BB	AA	BB	AA	BB
2109,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	00	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2383,	AA	CC	BB	CC	BB	AB	00	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2382,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	AB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BC
2384,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	AB	00	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BC
2385,	BB	00	BB	CC	BB	00	BB	BB	AA	BB	BB	AA	00	BB	AA	BB	AA	00
2386,	BB	00	BB	CC	BB	00	BB	BB	AA	BB	BB	AA	00	BB	AA	BB	AA	00
2387,	BB	00	BB	CC	00	00	AB	BB	AA	BB	BB	AA	00	BB	AA	BB	AA	00
2388,	BB	00	BB	CC	00	00	BB	BB	AA	BB	BB	AA	00	BB	AA	BB	AA	00
2. Queñes																		
1464,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	00	BB	AA	BB	AA	00
1459,	BB	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
1460,	BB	CC	BB	CC	BB	AB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2583,	BB	BC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2585,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	00	AA	BB	BB	AA	AB	BB	AA	BB	AA	BC
2644,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	00	00	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2640,	BB	CC	BB	CC	BB	BB	00	BB	00	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2639,	BB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	00	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BC
2642,	BB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	BB	AA	BC
2641,	BB	CC	BB	CC	BB	BB	00	BB	00	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BC
2645,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	00	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2636,	BB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	00	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2646,	BB	CC	00	CC	BB	AB	BB	00	00	00	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2586,	BB	CC	BB	CC	BB	BB	00	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2638,	BB	CC	BB	CC	00	BB	BB	BB	AA	AB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	00
2637,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AB	BB	AA	BB	AA	00
2643,	AA	BC	BB	CC	BB	00	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BC
2635,	BB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BC
1468,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AB	BB	AA	BB	AA	00
2584,	BB	CC	BB	CC	BB	BB	00	BB	00	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2312,	AB	CC	BB	CC	BB	AB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB

3. Cantillana

1315,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	AA	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	AB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AB
1311,	AB	BC	AB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
1318,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
1310,	AA	CC	AA	BC	AA	AB	BB	AA	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
1312,	AA	AC	BB	00	BB	AB	00	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
1313,	AA	BC	BB	BC	BB	BB	00	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	00
1314,	AA	BC	AB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	00
1316,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	AB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AB
1333,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BC
1335,	AB	CC	BB	CC	BB	AB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	00
1336,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	00
1322,	AA	BC	BB	CC	BB	BB	AB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BC
1323,	AB	AC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BC
1327,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	00	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
1326,	AA	BC	BB	CC	BB	BB	00	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
1331,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
1332,	BB	CC	BB	CC	BB	BB	00	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
1341,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	AB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB

4. MaipoSur

2666,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2661,	AA	CC	00	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2667,	AB	CC	00	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2662,	AB	CC	AB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	00
2663,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	AB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	00
2664,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	00	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BC
2665,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2765,	AB	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2766,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2767,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2768,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	00	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2769,	AB	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2770,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	AB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2771,	BB	CC	AB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2772,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2773,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	AB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2774,	AA	CC	AB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2654,	AB	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB

2655,	AB	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	BB	BB	AA	BB	AA	BC
5. Farellones																		
1679,	AA	CC	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	BB	BB	AA	BB	AA	AB
1691,	AA	CC	BB	BC	BB	AA	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BC
1681,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1686,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AB
1678,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	00
1677,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1682,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AB
1684,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BC
1670,	AA	CC	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	00
1671,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AB
1672,	AA	CD	BB	AC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	00
1675,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	00
1676,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	00
1683,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1685,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1422,	AA	BC	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BC
1442,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AB
1448,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1449,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BC
1439,	AA	CC	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB

6. Yerba loca																		
1669,	AA	CC	BB	AC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BC
1428,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1435,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1660,	AA	CC	BB	AC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1661,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1662,	AA	CC	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	00
1663,	AA	CC	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BC
1668,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	00
1425,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BB
1438,	AA	CC	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AB
7. Chacabuco																		
2279,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	00
2078,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	BC

2468, AA CC BB AC BC AB BB BB 00 BB BB BB BB AA BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2449, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2450, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2460, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2459, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2467, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2448, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2457, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2458, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2287, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2285, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2286, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2288, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2289, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2290, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2453, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2455, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC

11. R. blanco

2446, AA CC BB BC AB BB BB BB 00 BB BB BB BB AA BB BB AA AB BB AA AA BC
 2443, AA CC BB AC BB BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2137, AA CC BB CC DD AB BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2138, AA CC BB BC BB BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2139, AA CC BB BC AC BB BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC

12. R. Colorado Norte AC

2618, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2544, AB CD BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2615, AA CC BB CC AC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2613, AB CC BB AB BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2555, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2557, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2552, AA CC BB CC BB CC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2551, AB CC BB CC AC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2543, AA CC BB BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2556, AA CD BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2553, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2620, AA CC BB BC BC BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC
 2617, AA CC BB AC BB BB BB BB AA BB BB BB AA AB AB BB AA AA BB BB AA AA BC

2622, AA CC BB AB BB BC BB BB AA AA BB AA BC AA BB
2621, AB CC BB BC BB BC BB BB AA AA BB AA BB AA BB
2619, AA CC BB BC BB BC BB BB AA AA BB AA BB AA BB
2616, AB BC AB BC BB BC BB BB AA AA BB AA BB AA BB
2545, AB CC BB BC BB BC BB BB AA AA BB AA BB AA BB
2546, AA CD BB BC BB BC BB BB AA AA BB AA BB AA BB
2554, AA CC BB CC CC CC BB BB AA AA BB AA BB AA BB
2558, AA CC BB CC CC CC BB BB AA AA BB AA BB AA BB
2539, AB CC 00 AB BC BB BB AA AA BB AA BB AA BB

13. Colorado Sur BD

2570, AA CC BB CC BB AA BB AA BB AA BB AA BB AA CC
2573, AA CC BB AC BB BB BC BB AA BB AA BB AA BB AA BB
2574, AA CC BB CC CC BC BB CC CC CC CC CC CC CC CC
2568, AB CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2565, AA CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2560, AA CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2592, AB CC BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2561, AA CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2582, AA CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2581, AA CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2579, AA CC BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2580, AA CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2572, AA CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2571, AA CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2562, AB CC BB BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2559, AA CC BB AC BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2567, AA CC BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2578, AA CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2599, AA CC BB 00 BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2600, AA CC BB 00 DD BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2601, AA CC BB AC BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2563, BB CC BB BC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2591, AA CC BB BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2540, AA CC BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2541, AA CC BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC
2542, AA CC BB CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC CC

14. Cabreria

2379,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	AB	BB	AA	AB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2373,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2376,	AA	CC	BB	CC	AA	BB	AB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2378,	AA	CC	BB	CC	CC	BB	00	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2377,	AA	CC	BB	BC	CC	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2374,	AA	CC	BB	BC	AB	BB	AB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2375,	AA	CC	BB	BC	AB	BB	BB	BB	AA	AB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB

15. Cerrillos

2365,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	00	AB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2362,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2367,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2360,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2361,	AA	CC	BB	BC	AB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2357,	AA	CC	BB	BC	BC	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2363,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2358,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2359,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2366,	AA	CD	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2364,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2368,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB

16. R. Rocin

2177,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2180,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2176,	AA	CC	BB	BC	CC	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2182,	AA	CC	BB	BC	BD	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2178,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2185,	AA	CC	BB	BC	BC	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2183,	AA	CC	BB	BB	AB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2175,	AA	CC	BB	CC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2174,	AA	CC	BB	BC	BC	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2090,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2093,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2094,	AA	CC	BB	CC	BC	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2095,	AA	CC	BB	CC	BC	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2092,	AA	CC	BB	BC	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB
2099,	AA	CC	BB	BB	AB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB

2184, AA CC BB BC AB BB BB 00 BB AA AA AA AA BB AA BB AA
 2096, AA CC BB CC BB BB 00 AB BB AA 00 AA 00 BB AA BB AA BB
 2097, AA CC BB CC BB BB 00 AB BB AA AB AA BB AA BB AA BB AA
 2091, AA CC BB BC BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA 00
 2100, AA CC BB BB BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA AB
 2181, AA CC BB BB BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA BB
 2170, AA CC BB BB BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA 00
 2171, AA CC BB CC BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA AB
 2172, AA CC AB AB BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA BB
 2173, AA CC BB BC BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA BB
 2179, AA CC BB BC BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA BB

17. Hierro viejo

1813, AA CC BB CC AB BB BB AA BB AA BB AA BB AA BC
 1807, AA BC BB BC 00 BB BB AA AB AA BB AA BB AA BC
 1356, AA CC AB BC AB BB BB AA BB AA BB AA BB AA AB
 1359, AA BC AB BC BB BB AA BB AA BB AA BB AA BB AA
 1357, AA CC BB CC BB BB AB AA BB AA BB AA BB AA BB AA
 1358, AA CC AB CC BB BB 00 AA BB AA AB AA BB AA BB AA
 1360, AA CC BB CC BB BB 00 AA BB AA AB AA BB AA BB AA
 1811, AA CC CC BB BB AB AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA
 1812, AA CC BB CC BB BB AB AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA
 1814, AA BC BB BC AB BB BB AB AA BB AA AA BB AA BB AA
 1815, AA CC BB CC BB BB 00 AB AA BB AA AB AA BB AA BB AA
 1816, AA CC BB CC BB 00 BD AA BB AA AB AA BB AA BB AA
 1817, AA CC BB BC BB BB AB AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA
 1808, AA CC BB CC BB BB CC BB AB AA BB AA AA BB AA BB AA
 1809, AA CC BB BC AB BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA
 1810, AA CC BB BC AB BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA
 1818, AA CC BB BC BB BB 00 AA BB AA AA BB AA BB AA BB AA
 1354, AA BC BB CC BB BB 00 AB AA BB AA AB AA BB AA BB AA
 1355, AA CC BB BC AB BB BB 00 AB AA BB AA AB AA BB AA BB AA
 1361, AA CC BB BC BD BB BB 00 BB AA BB AA AB AA BB AA BB AA
 1362, AA CC BB BC BC BB BB 00 BB AA BB AA AB AA BB AA BB AA

18. Cul-Til

2233, AA CC BB BC AB BB AA BB AA BB AA BB AA BB AA
 2232, AB CC BB BC BB AB 00 BB AA BB AA BB AA BB AA
 2229, AA BC BB CC BB BB AA BB AA BB AA BB AA BB AA

ANEXO N° 6

FRECUENCIAS ALELICAS DETERMINADAS PARA CADA POBLACION DE
Liolaemus monticola.

Locus	Población								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AAT									
(N)	9	21	18	19	20	10	25	26	14
A	.500	.238	.861	.632	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
B	.500	.762	.139	.368	.000	.000	.000	.000	.000
PGM									
(N)	5	21	18	19	20	10	25	26	13
A	.000	.000	.056	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.048	.139	.000	.025	.000	.000	.000	.077
C	1.000	.952	.806	1.000	.950	1.000	.940	.923	.923
D	.000	.000	.000	.000	.025	.000	.060	.077	.000
PGI									
(N)	9	20	18	17	20	10	24	25	12
A	.000	.000	.111	.088	.000	.000	.000	.060	.083
B	1.000	1.000	.889	.912	1.000	1.000	1.000	.940	.917
aES1									
(N)	9	21	17	19	20	10	24	24	14
A	.000	.000	.000	.000	.050	.150	.104	.083	.107
B	.000	.024	.118	.105	.400	.450	.458	.375	.393
C	1.000	.976	.882	.895	.550	.400	.438	.542	.500
bES									
(N)	7	20	18	19	17	10	24	24	14
A	.000	.000	.000	.000	.265	.150	.083	.146	.143
B	1.000	1.000	.944	1.000	.735	.850	.833	.688	.750
C	.000	.000	.056	.000	.000	.000	.083	.104	.107
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.063	.000
PEP									
(N)	5	20	18	19	19	10	25	22	14
A	.100	.075	.083	.053	.105	.250	.320	.250	.179
B	.900	.925	.917	.947	.895	.750	.640	.705	.821
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.040	.045	.000
aMAN									
(N)	8	17	13	17	15	9	24	24	13
A	.188	.000	.192	.059	.267	.333	.063	.208	.231
B	.813	1.000	.808	.941	.733	.667	.938	.792	.769
GR									
(N)	7	20	17	19	19	6	20	19	9
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.075	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.925	1.000	1.000
SOD									
(N)	9	14	14	17	18	9	22	19	8
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.750
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.250
LDHb									
(N)	9	18	18	19	20	10	22	24	13
A	.000	.056	.111	.000	.150	.100	.068	.083	.077
B	1.000	.944	.889	1.000	.850	.900	.932	.917	.923

CK1									
(N)	9	21	18	19	20	10	25	26	13
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
CK2									
(N)	9	21	18	19	20	10	25	26	13
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
AK2									
(N)	5	19	18	19	19	10	24	26	13
A	.900	.895	.833	.921	.658	.650	.729	.788	.846
B	.100	.105	.167	.079	.342	.350	.271	.212	.154
MMDH									
(N)	9	21	18	19	20	10	25	26	14
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SMDH									
(N)	9	21	18	19	20	10	25	26	14
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
G3PDH									
(N)	9	21	18	19	20	10	25	26	14
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
LDHa									
(N)	9	21	18	19	20	10	25	26	14
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
GCDH									
(N)	5	18	15	17	15	8	20	20	11
A	.000	.000	.100	.000	.167	.063	.225	.075	.000
B	.800	.861	.800	.794	.700	.813	.650	.800	.682
C	.200	.139	.100	.206	.133	.125	.125	.125	.318

Population

Locus	□							
	10	11	12	13	14	15	16	17
AAT								
(N)	26	4	22	26	7	12	26	21
A	1.000	1.000	.841	.904	1.000	1.000	1.000	1.000
B	.000	.000	.159	.096	.000	.000	.000	.000
PGM								
(N)	26	5	22	26	7	12	26	21
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.019	.000	.023	.000	.000	.000	.000	.095
C	.981	1.000	.909	1.000	1.000	.958	1.000	.905
D	.000	.000	.068	.000	.000	.042	.000	.000
PGI								
(N)	26	5	21	26	7	12	26	21
A	.000	.000	.024	.000	.000	.000	.019	.071
B	1.000	1.000	.976	1.000	1.000	1.000	.981	.929
aES1								
(N)	25	5	22	24	7	11	26	18
A	.100	.100	.091	.063	.000	.000	.000	.000
B	.480	.300	.409	.313	.286	.500	.442	.306
C	.420	.600	.500	.625	.714	.500	.558	.694

GCDH								
(N)	24	4	17	20	7	12	18	17
A	.208	.000	.088	.225	.357	.167	.194	.059
B	.604	.875	.824	.675	.643	.750	.778	.735
C	.188	.125	.088	.100	.000	.083	.028	.206

Population

Locus	18	19
-------	----	----

AAT		
(N)	14	8
A	.893	1.000
B	.107	.000
PGM		
(N)	15	8
A	.000	.000
B	.033	.000
C	.967	1.000
D	.000	.000
PGI		
(N)	14	8
A	.000	.000
B	1.000	1.000
aES1		
(N)	15	8
A	.000	.000
B	.133	.063
C	.867	.938
bES		
(N)	15	8
A	.033	.000
B	.833	1.000
C	.133	.000
D	.000	.000
PEP		
(N)	14	8
A	.107	.000
B	.893	1.000
C	.000	.000
aMAN		
(N)	14	8
A	.036	.063
B	.964	.938
GR		
(N)	10	3
A	.050	.000
B	.950	1.000
SOD		
(N)	13	8
A	1.000	1.000
B	.000	.000
LDHb		
(N)	15	8
A	.000	.000
B	1.000	1.000

CK1		
(N)	15	8
A	.000	.000
B	1.000	1.000
CK2		
(N)	15	8
A	1.000	1.000
B	.000	.000
AK2		
(N)	11	8
A	.909	.938
B	.091	.063
MMDH		
(N)	15	8
A	.000	.000
B	1.000	1.000
SMDH		
(N)	15	8
A	1.000	1.000
G3PDH		
(N)	15	8
A	.000	.000
B	1.000	1.000
LDHa		
(N)	15	8
A	1.000	1.000
GCDH		
(N)	12	6
A	.042	.083
B	.792	.750
C	.167	.167

POBLACIONES: 1. Río Lontué, 2. Los Queñes, 3. Cerro Cantillana, 4. Maipo Sur, 5. Farellones, 6. Yerba Loca, 7. Cta Chacabuco, 8. Cta Dormida, 9. Cerro La Cmpaña, 10. Saladillo, 11. Río Blanco, 12. Río Colorado Norte, 13. Río colorado Sur, 14. Cabrería, 15. Mina Cerrillos, 16. Río Rocín, 17. Mina Hierro Viejo, 18. Culimo Tilama y 19. Salamanca.

ANEXO 7

TEST DE CHI CUADRADO PARA LAS DESVIACIONES DEL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.

CUESTA LA DORMIDA

LOCUS	CLASE GENOTIPICA	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA	CHI CUADRADO	GRADO LIBERTAD	PROBABILIDAD
bES	A-A	1	.447			
	A-B	1	4.915			
	A-C	3	.745			
	A-D	1	.447			
	B-B	14	11.234			
	B-C	2	3.511			
	B-D	2	2.106			
	C-C	0	.213			
	C-D	0	.319			
	D-D	0	.064			
				13.251	6	.039*

RIO BLANCO

bES	A-A	0	.111			
	A-B	1	1.111			
	A-C	1	.222			
	A-D	0	.444			
	B-B	2	1.111			
	B-C	0	.556			
	B-D	0	1.111			
	C-C	0	.000			
	C-D	0	.222			
	D-D	1	.111			
				13.000	6	.043*

RIO COLORADO NORTE

aMAN	A-A	1	.024			
	A-B	0	1.951			
	B-B	20	19.024			
				41.026	1	.000**
LDHb	A-A	1	.026			
	A-B	0	1.949			
	B-B	19	18.026			
				39.027	1	.000**

GCDH	A-A	1	.091			
	A-B	1	2.545			
	A-C	0	.273			
	B-B	12	11.455			
	B-C	3	2.545			
	C-C	0	.091			
				10.500	3	.015*

RIO COLORADO SUR

AAT	A-A	22	21.196			
	A-B	3	4.608			
	B-B	1	.196			
				3.888	1	.049*

bES	B-B	11	8.286			
	B-C	6	6.510			
	B-D	1	5.918			
	C-C	2	1.122			
	C-D	1	2.245			
	D-D	4	.918			
				16.734	3	.001**

PEP	A-A	2	.294			
	A-B	2	5.412			
	B-B	22	20.294			
				12.188	1	.000**

aMAN	A-A	1	.022			
	A-B	0	1.956			
	B-B	22	21.022			
				45.023	1	.000**

CABRERIA

GCDH	A-A	2	.769			
	A-B	1	3.462			
	B-B	4	2.769			
				4.267	1	.039*

CANTILLANA

PGI	A-A	1	.171			
	A-B	2	3.657			
	B-B	15	14.171			
				4.804	1	.028*

CERRO LA CAMPANA

SOD

A-A	6	4.400
A-B	0	3.200
B-B	2	.400

10.182	1	.001**
--------	---	--------

RIO LONTUE

AAT

A-A	4	2.118
A-B	1	4.765
B-B	4	2.118

6.321	1	.012*
-------	---	-------

ANEXO N° 8

MATRIZ DE SIMILITUD GENÉTICA Y/O COEFICIENTE DE DISTANCIA PARA OCHO POBLACIONES DE *Liolaemus monticola monticola*.

Poblacion	1	2	3	4	5	6	7	8
1 Rio Lontue	*****	.002	.007	.000	.032	.035	.038	.029
2 Queñes	.080	*****	.026	.009	.058	.063	.061	.055
3 Cantillana	.110	.163	*****	.005	.011	.015	.018	.010
4 MaipoSur	.056	.101	.087	*****	.026	.029	.029	.022
5 Farellones	.185	.233	.118	.163	*****	.000	.005	.001
6 Yerba loca	.195	.245	.138	.177	.063	*****	.002	.000
7 Chacabuco	.197	.236	.139	.168	.092	.086	*****	.002
8 C.Dormida	.177	.226	.112	.152	.069	.068	.069	*****
9 La campana	.184	.234	.126	.157	.096	.099	.106	.081
10 .Saladillo	.205	.248	.145	.180	.086	.095	.083	.074
11 .R.blanco	.189	.235	.137	.169	.083	.099	.122	.082
12 .R.Colorado Nort	.159	.190	.110	.125	.093	.112	.099	.083
13 .Colorado Sur BD	.168	.205	.119	.140	.100	.124	.096	.087
14 .Cabrería	.185	.234	.129	.165	.086	.134	.135	.112
15 .Cerrillos	.182	.224	.122	.147	.106	.122	.108	.106
16 .R.Rocin	.176	.217	.111	.140	.092	.116	.099	.092
17 .Hierro viejo	.170	.212	.108	.135	.102	.132	.115	.106
18 .Cul-Til	.111	.163	.072	.078	.128	.147	.127	.108
19 .Salamanca	.126	.184	.081	.092	.142	.164	.153	.137

Population	9	10	11	12	13	14	15	16
1 Rio Lontue	.030	.042	.028	.023	.026	.029	.030	.030
2 Queñes	.057	.068	.053	.037	.044	.055	.052	.050
3 Cantillana	.012	.020	.011	.010	.012	.011	.012	.010
4 MaipoSur	.022	.033	.022	.014	.019	.023	.020	.019
5 Farellones	.004	.004	.000	.006	.007	.000	.007	.005
6 Yerba loca	.002	.004	.000	.008	.011	.010	.009	.009
7 Chacabuco	.007	.004	.007	.008	.007	.013	.008	.008
8 C.Dormida	.001	.002	.000	.004	.005	.006	.008	.006
9 La campana	*****	.005	.003	.007	.010	.009	.007	.008
10 .Saladillo	.099	*****	.000	.006	.002	.010	.010	.007
11 .R.blanco	.118	.096	*****	.000	.000	.001	.011	.005
12 .R.Colorado Nort	.107	.091	.095	*****	.002	.008	.005	.002
13 .Colorado Sur BD	.118	.068	.085	.069	*****	.007	.011	.005
14 .Cabrería	.132	.124	.118	.118	.114	*****	.005	.003
15 .Cerrillos	.115	.114	.142	.092	.117	.111	*****	.000
16 .R.Rocin	.112	.096	.117	.069	.086	.096	.042	*****
17 .Hierro viejo	.117	.120	.105	.090	.097	.110	.093	.078
18 .Cul-Til	.123	.136	.126	.095	.096	.125	.111	.096
19 .Salamanca	.143	.163	.152	.127	.128	.133	.120	.111

Population	17	18	19
1 Rio Lontue	.027	.008	.011
2 Queñes	.048	.026	.034
3 Cantillana	.009	.001	.002
4 MaipoSur	.017	.003	.006
5 Farellones	.007	.013	.016

6 Yerba loca	.014	.018	.022
7 Chacabuco	.011	.014	.020
8 C.Dormida	.009	.008	.015
9 La campana	.009	.010	.014
10 .Saladillo	.013	.017	.024
11 .R.blanco	.002	.007	.014
12 .R.Colorado Nort	.005	.006	.013
13 .Colorado Sur BD	.007	.006	.013
14 .Cabrería	.006	.009	.011
15 .Cerrillos	.005	.009	.011
16 .R.Rocin	.003	.007	.010
17 .Hierro viejo	*****	.005	.008
18 .Cul-Til	.089	*****	.000
19 .Salamanca	.110	.057	*****

Sobre la diagonal : distancia genética aleatoria de Nei (1978)

Bajo la diagonal : distancia modificada de Rogers (Wright, 1978)

POBLACIONES: 1. Río Lontué, 2. Los Queñes, 3. Cerro Cantillana, 4. Maipo Sur, 5. Farellones, 6. Yerba Loca, 7. Cta Chacabuco, 8. Cta Dormida, 9. Cerro La Cmpaña, 10. Saladillo, 11. Río Blanco, 12. Río Colorado Norte, 13. Río colorado Sur; 14. Cabrería, 15. Mina Cerrillos, 16. Río Rocín, 17. Mina Hierro Viejo, 18. Culimo Tilama y 19. Salamanca.