

UCH-FC
MAG-EBE
A 663
C.1

NIVELES DE INTROGRESIÓN INTERRACIAL EN *Liolaemus monticola* (IGUANIDAE)

Tesis

Entregada a La

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en

Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

Nicolás Eduardo Aravena Muñoz

Enero, 2013

Directora de Tesis Prof. Madeleine Lamborot Ch.

Co-Director de Tesis: Dr. David Veliz



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



Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato: 10 de Septiembre del 2012

NICOLÁS EDUARDO ARAVENA MUÑOZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Master en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 10 de septiembre del 2012.

Directora de Tesis:
Prof. Madeleine Lamborot

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "M. Lamborot", written over a horizontal line.

Co-Director de Tesis
Dr. David Véliz

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "D. Véliz", written over a horizontal line.

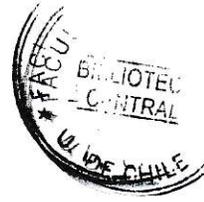
Comisión de Evaluación de la Tesis
Dr. Elie Pouline

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "E. Pouline", written over a horizontal line.

Dr. Marcelo Baeza

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "M. Baeza", written over a horizontal line.

Dedicado a mis tutores: Madeleine Lambrot y David Véliz



AGRADECIMIENTOS

Luego de tres años de emocionante trabajo, culmina una investigación que no estuvo exenta de eventos que difícilmente olvidaré en mi vida, construida gracias al aporte de personas valiosas en lo académico y afectivo.

Agradezco la oportunidad por ser su alumno tesista a la profesora Madeleine Lamborot y al Dr. David Véliz, quienes de forma particular y conjunta creyeron en mí y en esta tesis, la que en un comienzo parecía imposible, pero que juntos logramos salir adelante. Gracias profesora Lamborot por su infinita paciencia, el valioso apoyo académico y emocional; sus enseñanzas y experiencias fueron piedra angular para esta hazaña. David, muchas gracias, tengo una gran estima hacia a ti como guía, como científico y como amigo, estoy muy agradecido por tu ayuda y paciencia en momentos que más lo necesité.

A Sandra Brito, por su valiosa ayuda en lo técnico y afectivo, junto a Pablo Astete y Eduardo Páez, colegas de oficio docente y científico, gracias por su paciencia y amistad dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Irma Vila por sus aportes por el que hacer científico.

A Claudio Quezada por la disposición ante mis dudas y compartir junto a Juan Pablo, Caren, Pablo y Sergio conocimientos científicos, técnicos y por sobre todo su amistad.

A la Dra. Marcela Vidal, amiga y colega a quien estimo mucho por aquella "iluminación" hacia el camino científico que se fortalece aún más con esta etapa.

A mis tíos Guillermo y Nancy, junto a Fabián, Ignacia y Paola, por hacerme partícipe de su calor familiar, factor vital en los comienzos de este trabajo científico.

A Gabriel Castaño, simplemente gracias amigo por lo afortunado de habernos conocido y compartido penas y alegrías junto a Annia y Claudia.

Al apoyo otorgado por ICM P05-002 y PFB-23, del Instituto de Ecología y Biodiversidad, Universidad de Chile.

Por último, a las personas más valiosas para con mi vida: Dagoberto Aravena, Katia Muñoz, Camila Aravena y Camila Somos, pilares fundamentales de mi ser, quienes, tanto en vida o más allá de ella, son mis grandes maestros de vida, mi gratitud por lograr terminar esta tesis.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS y NOMENCLATURA	xii
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
Hibridación e Introgresión	2
Zonas de Hibridación	3
Rearreglos Cromosómicos: implicancias en la formación de nuevas especies	4
Marcadores cromosómicos, moleculares y morfológicos	6
El Complejo <i>Liolaemus monticola</i> como modelo de estudio	8
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
<i>Objetivo General</i>	11
<i>Objetivos Específicos</i>	11
MATERIALES Y METODOLOGÍA	12
<i>Obtención del material biológico</i>	12
<i>Obtención de tejidos para los diferentes análisis genéticos</i>	15
<i>Obtención de cromosomas</i>	15
<i>Extracción de ADN</i>	16
<i>Amplificación y Secuenciación de loci aloenzimáticos, loci de AFLP y del gen mitocondrial (cit-b)</i>	17
Loci Aloenzimáticos	17
Loci de AFLP	19
<i>Citocromo b (cit-b)</i>	21
<i>Morfología</i>	22
<i>Análisis Estadísticos</i>	23
<i>Citogenéticos y Aloenzimáticos</i>	23
AFLP	24
ADN _{mt}	24
<i>Morfología</i>	25
RESULTADOS	26
<i>Citogenéticos</i>	26
<i>Aloenzimas</i>	32
<i>Loci de AFLP</i>	37
ADN _{mt}	40
<i>Morfológicos (merísticos y morfométricos)</i>	49

DISCUSIÓN	54
CONCLUSIÓN	62
REFERENCIAS	63
ANEXOS	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de las muestras de <i>Liolaemus monticola</i> utilizadas en este estudio.	13
Tabla 2: Lista de las enzimas con la nomenclatura según los criterios de la IUBNC, sistemas de <i>buffers</i> y condiciones ideales utilizados en las corridas electroforéticas para la revelación de las proteínas.	18
Tabla 3: Índices de heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e), cálculo del número de alelos promedio por locus (A) e índice de deficiencia de heterocigotos (F_{is}) en base a los 7 pares cromosómicos para los 9 eco-demos de <i>Liolaemus monticola</i> .	28
Tabla 4: Índices de heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e), cálculo del número de alelos promedio por locus (A) e índice de deficiencia de heterocigotos (F_{is}) en base a los 7 pares cromosómicos para las razas cromosómicas de <i>Liolaemus monticola</i> .	28
Tablas 5: Índices de heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e), valores de P al 95% de confianza, cálculo del número de alelos promedio por locus (A) e índice de deficiencia de heterocigotos (F_{is}) en base a los 7 loci aloenzimáticos para los 8 eco-demos de <i>Liolaemus monticola</i> .	33
Tablas 6: Índices de heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e), valores de P al 95% de confianza, cálculo del número de alelos promedio por locus (A) e índice de deficiencia de heterocigotos (F_{is}) en base a los 7 loci aloenzimáticos para las razas de <i>Liolaemus monticola</i> .	33
Tablas 7: Índices de diversidad genética resultantes de las secuencias del <i>cit-b</i> del ADN _{mt} para los 8 eco-demos de <i>Liolaemus monticola</i> .	42
Tablas 8: Índices de diversidad genética resultantes de las secuencias del <i>cit-b</i> del ADN _{mt} para las razas parentales de <i>L. monticola</i> .	42
Tabla 9: Valores de las pruebas de neutralidad para el citocromo b: número de individuos, Tajima's D (Tajima, 1989) y F_u 's F_s (Fu, 1996) entre las zonas eco-geográficas propuestas para este gen en <i>Liolaemus monticola</i> .	43
Tablas 10: Valores de las pruebas de neutralidad para el citocromo b: Tajima's D (Tajima, 1989) y F_u 's F_s (Fu, 1996) para las razas cromosómicas de <i>Liolaemus monticola</i> .	43
Tablas 11: Valores de F_{st} obtenidos de la comparación de pares de haplotipos del gen citocromo b entre los eco-demos de <i>Liolaemus monticola</i> .	45

Tabla 12: Valores de <i>Fst</i> obtenidos de la comparación de pares de haplotipos del gen citocromo b razas de <i>Liolaemus monticola</i>	45
Tabla 13: Análisis Espacial de Varianza Molecular (<i>SAMOVA</i>) del cit b para <i>Liolaemus monticola</i> .	46
Tabla 14: variables morfométricas de <i>Liolaemus monticola</i> que mostraron diferencias significativas entre las localidades mediante morfometría merística.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa representativo de las 23 localidades analizadas para este estudio.	14
Figura 2: Dendograma de la Distancia Genética de Rogers Modificada (Wright 1978), obtenidos para la variación de los 7 pares cromosómicos de 21 localidades de <i>Liolaemus monticola</i>	29
Figuras 3 A y B: Detección del número de grupos basados en 7 pares cromosómicos.	30
Figura 4: Probabilidad del número de grupos individuales A) K=2 y B) K=3, para los 7 pares cromosómicos considerando 217 individuos, 9 eco-demos y un modelo de ancestralidad basado en el supuesto de mezcla entre las poblaciones, estimado con el programa <i>STRUCTURE</i>	31
Figura 5: Dendograma de la Distancia Rogers modificada (Wright, 1978) obtenidos para la variación aloenzimática de 7 loci entre 8 eco-demos de <i>L. monticola</i> .	34
Figura 6: Detección del número de grupos (K) basados en 7 loci aloenzimáticos y 8 eco-demos. (A) Promedio de L (K) \pm SD en función de K. (B) Δ K en función de K determinado a partir de Evanno y col. (2005).	35
Figura 7: Probabilidad del número de grupos individuales (K), considerando 357 individuos, 7 loci aloenzimáticos, 8 eco-demos y un modelo de ancestralidad basado en el supuesto de mezcla entre las poblaciones, mediante <i>STRUCTURE</i> 2.3.3. A) K= 2 y B) K=4, según Δ K en función de K determinado a partir de Evanno y col. (2005).	36
Figura 8: Detección del número de grupos basados en 547 loci de AFLP (A) Promedio de L (K) \pm SD en función de K. (B) Δ K en función de K determinado a partir de Evanno y col. (2005).	38
Figuras 9: Probabilidad del número de grupos individuales A K=2 y B K=4, considerando 59 individuos, 541 loci <i>AFLP</i> y un modelo de ancestralidad basado en el supuesto de mezcla entre las poblaciones, mediante <i>STRUCTURE</i> 2.3.3. Colorado Sur (COS), pertenece a la raza Norte Mod. 1.	39
Figura 10: Árbol de mínima expansión de haplotipos del gen mitocondrial <i>cit-b</i> para los eco-demos de <i>Liolaemus monticola</i>	44
Figura 11: Reconstrucción filogenética para el gen mitocondrial <i>citocromo b</i> , utilizando <i>Máxima Verosimilitud</i> .	47
Figuras 12: Reconstrucción filogenética para el gen mitocondrial <i>citocromo b</i> , utilizando <i>inferencia Bayesiana</i>	48

Figuras 13 A, B y C: Resultado del Análisis de Componentes Principales para A) todas las variables que no presentaron dimorfismo sexual y para aquellas que si presentaron B) en machos y C) hembras.	51
Figura 14: Ordenación bi-dimensional para las localidades de <i>Lioleamus monticola</i> utilizando Escalamiento Multidimensional.	52
Figura 15: Análisis Discriminante Lineal (ADL) para todas las variables morfológicas merísticas por individuo utilizadas en este estudio.	53
Figura 16: Porcentaje de los individuos bien y mal correspondidos por el ADL.	53

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS y NOMENCLATURA

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ANOVA	Analysis of Variance
BSA	Albúmina de Suero Bovino
Cit-b	Citocromo b
dH₂O	agua destilada
ddH₂O	agua bi-destila
EDTA	Ácido Etilen-Diamino-Tetra-Acético
IUBNC	International Union of Biochemical Nomenclature Committee
K	número de grupos
MCMC	Markov chain Monte Carlo
mg	miligramos
mA	mili amperes
mM	mili molar
msnm	metros sobre el nivel del mar
Nº de esc	número de escamas
ng	nano gramo
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SAMOVA	Análisis Espacial de Varianza Molecular
TAE	Tris Acetato EDTA
Tº	temperatura
U/ µL	unidades por micro litro
V	voltaje
vs.	versus
º C	grados Celsius
ng/µL	nano gramos por micro litro
µL	micro litro
µM	micro molar
τ	Tau
ΔK	delta K

RESUMEN

Hibridación e introgresión son fenómenos bastante documentados en plantas, pero limitada a unos pocos taxa animales. En poblaciones naturales, las zonas híbridas presentan la oportunidad de estudiar los efectos del flujo génico, selección y recombinación, proporcionando así una evaluación de los cambios genéticos y fenotípicos que ocurren en una especiación temprana. Otro punto a considerar es la variación cromosómica, la que suele producir un gran efecto al impedir o reducir la fertilidad de los híbridos, creando una barrera al intercambio genético e influyendo en la diferenciación de individuos de una población, los que eventualmente podrían alcanzar el estatus de especie.

Liolaemus monticola (von Müller y Helmich, 1932), especie endémica de Chile presenta diversas razas (a nivel cromosómico) y varias zonas de hibridación parapátricas, hechos que la convierten en un excelente modelo para caracterizar el nivel de hibridación e introgresión entre las razas cromosómicas. Esta tesis investigó dos razas de *L. monticola*: la raza Norte ($2n= 38$ a 40) y la raza Sur ($2n= 34$), más una estrecha zona de hibridación inter-racial considerada *de contacto secundario*, con gran variabilidad cromosómica y genéticas dada la presencia de híbridos cromosómicos, entre 24 localidades, repartidos en 9 eco-demos.

Mediante el empleo de un conjunto de marcadores independientes tales como polimorfismos cromosómicos, caracteres morfológicos y variantes genéticas (secuencias ADN_{mt}, loci aloenzimáticos y de *AFLP*) fueron analizados mediante estadísticos apropiados para cada marcador, por ejemplo Inferencia Bayesiana, Análisis de Componentes Principales, Análisis Discriminante Lineal, entre otros.

Es así como los análisis cromosómicos y morfológicos muestran claramente una estructuración geográfica, con la presencia de ambas razas y la zona híbrida circunscrita a una zona. Los análisis morfológicos muestran diferencias claras entre las razas cromosómicas y también con los híbridos, los cuales poseen formas intermedias. Por otro lado, los análisis del ADN_{mt} mostraron la presencia de las dos razas genéticamente muy diferentes, con la presencia de individuos de la zona híbrida con haplotipos de cada raza parental. De forma interesante, algunos individuos pertenecientes a una de las razas tienen haplotipos típicos de la otra raza, lo que indica un posible efecto de migrantes e hibridación en esa zona.

Un resultado contrastante, fueron los análisis realizados con marcadores nucleares (aloenzimas y AFLP), quienes no muestran una segregación tan clara de las razas y la zona híbrida. Si bien, los loci de AFLP muestran una cierta diferencia entre la raza norte, la raza sur y la zona híbrida, mientras tanto las aloenzimas muestran cambios en el número de alelos (intermedia en la zona híbrida) y en las heterocigocidades (aumento del H_e) no es posible establecer claramente los grupos.

A la luz de los resultados, es posible indicar que las razas cromosómicas existen, la zona híbrida es geográficamente delineada y que es posible la existencia de introgresión posiblemente facilitada por la migración de machos. Además, la evidencia encontrada indica que los procesos de hibridación e introgresión son fenómenos que necesitan un análisis multidisciplinario, para una mejor comprensión de los límites entre especies y razas dentro de las especies, además de la permanencia de zonas híbridas en el tiempo.

SUMMARY

Hybridization and introgression are fairly documented phenomena in plants, but limited to a few animal taxa. In natural populations, hybrid zones have the opportunity to study the effects of gene flow, selection and recombination, thus providing an assessment of the genetic and phenotypic changes that occur in early speciation. Another point to consider is the chromosomal variation, which usually produces a great effect to prevent or reduce the fertility of hybrids, creating a barrier to genetic exchange and influencing the differentiation of individuals in a population, which could eventually reach the status species.

Liolaemus monticola (von Müller and Helmich, 1932), a species endemic to Chile has several races (at chromosome) and various areas of parapatric hybridization, facts that make it an excellent model to characterize the level of hybridization and introgression among chromosomal races. This thesis investigated two races of *L. monticola*: North race ($2n = 38$ to 40) and the South race ($2n = 34$) more a narrow area interracial hybridization secondary contact considered, with high chromosomal and genetic variability due to the presence of chromosomal hybrids between 24 sites spread over 9 eco-demos.

Through the use of a set of independent markers such as chromosomal polymorphisms, morphological and genetic variants ($_{mt}$ DNA sequences, allozyme and *AFLP* loci) were analyzed using appropriate statistical for each marker, for example Bayesian inference, Principal Component Analysis, Discriminant Analysis linear, among others.

Thus, chromosomal and morphological analyzes clearly show a geographic structure, with the presence of both breeds and hybrid zone confined to a zone. Morphological analyzes show clear differences between the races and also chromosomal hybrids, which have intermediate forms. Furthermore, the $_{mt}$ DNA analysis showed the presence of two genetically different races, with the presence of individuals in the area hybridizes with each race parental haplotypes. Interestingly, some individuals belonging to one of the races have haplotypes typical of the other race, indicating a possible effect of migrants and hybridization in that area.

A contrasting result, analyzes were performed with nuclear markers (allozymes and *AFLP*) who do not show such a clear segregation of the races and the hybrid zone. Although *AFLP* loci show a certain breed difference between the north, south race and the hybrid zone, while allozymes show changes in the number of alleles (hybrid intermediate zone) and in heterozigocidades (H_e increase) is not possible to pinpoint the groups.

In light of the results, it may indicate that chromosomal races exist, the hybrid zone is geographically delineated and it is possible that there may introgression facilitated by migration of males. Furthermore, evidence suggests that the processes found hybridization and introgression are phenomena that need Multidisciplinary analysis for a better understanding of the boundaries between species and strains within species, besides the hybrid zone residence time.

INTRODUCCIÓN

La formación de nuevas especies puede ser considerada como un proceso temporal mediante la cual algunas poblaciones se diferencian y alcanzan independencia evolutiva. Harrison (1998) ha propuesto que durante el proceso de especiación se van alcanzando varios grados de diferenciación que quedan reflejados por distintos conceptos de especie.

Aunque el concepto de *especie* es básico dentro de la biología, no hay un claro consenso para su definición, como se pone de manifiesto por el gran número de definiciones propuestas por especialistas de diversos campos de la genética, taxonomía, biogeografía, paleontología, entre otras, a lo largo de los años, ver De Queiroz (1998), y que no suelen ser aplicables a todos los seres vivos. *La elección del concepto de especie* en un estudio de delimitación de especies no es un asunto trivial, sin embargo, un consenso entre los biólogos evolucionistas es que las especies son reales y representan distintos linajes evolutivos (Sites y Moritz 1987; Wiens y Penkrot, 2002; de Queiroz, 2005).

El presente trabajo considera el concepto biológico de especie (Dobzhansky 1937, Mayr 1942, 1963) que, tal como lo plantea Noor y col. (2001), por ser general es más útil, a pesar de sus imperfecciones, debido a que todas las barreras reproductivas tienen un efecto similar en inhibir el flujo génico independiente de que se hayan originado mediante deriva, impulso meiótico, poliploidía, selección sexual o selección natural.

Un factor determinante del concepto biológico de especie es que no es aplicable cuando existe hibridación y rearrreglos cromosómicos de por medio en el proceso de especiación.

Hibridación e Introgresión

La hibridación es un importante mecanismo para la transferencia y/o de origen nuevos caracteres relacionados con adaptaciones ecológicas, y por lo tanto, juega un papel importante en la facilitación de la especiación en nichos cambiantes, homogeneizando las características únicas de las poblaciones geográficamente distintas y/o especies incipientes, lo que retardaría una eventual futura especiación (Perry y col. 2002; Olden y col. 2004; Irwin y col. 2009).

La fracción de especies que hibridan es variable, en promedio alrededor de 10% de los animales y 25% de las especies de plantas conocidas hibridan con al menos otra especie (Mallet, 2005, 2008, 2010). Especies estrechamente emparentadas tienen más probabilidades de hibridación, aunque a menudo pueden persistir durante millones de años después de la divergencia inicial (Mallet, 2005).

A pesar de que los híbridos son raros en la población, unos pocos pueden ofrecer un puente para permitir que un flujo de alelos pasen entre las especies, incluso bajas tasas de hibridación pueden tener importantes consecuencias evolutivas en una alta proporción de especies (Field y col. 2010). Las posibles consecuencias evolutivas de la hibridación son numerosas, como el origen de nuevas especies a través de la recombinación o el reforzamiento (Anderson, 1949; Stebbins 1959; Lewontin y Birch 1966; Grant, 1981, Arnold 1997; Dowling y Secor, 1997), que incluyen la transferencia y producción de adaptaciones novedosas.

Un efecto directo de la hibridación es la *introgresión* (Anderson, 1949), definida como el movimiento de genes entre las formas genéticamente diferenciadas, mediadas por cruzamiento (Avice, 1994). Esta puede ser uni o bidireccional, localizada o extensa, y por este medio las especies lograrían adquirir caracteres adaptativos que permitan colonizar nuevos hábitats. Por otra parte, puede ser altamente selectiva, afectando sólo a algunas partes del genoma, mientras que otras regiones genómicas pueden ser afectadas por la selección divergente, permaneciendo virtualmente aislados (Rieseberg y Wendel, 1993; Field y col. 2010).

Zonas de Hibridación

En condiciones naturales, las Zonas Híbridas (ZH) pueden definirse como la producción de descendencia a partir del cruzamiento entre individuos pertenecientes a poblaciones, razas o especies distinguibles, en al menos, un carácter heredable, independiente de su estatus taxonómico (Barton y Hewitt, 1989; Harrison, 1990, 1993; Arnold, 1992, 1997; Avise, 1994; Barton, 2001). Presentan una gran oportunidad para estudiar los efectos del flujo génico, selección y patrones de recombinación en poblaciones naturales proporcionando una visión de los cambios genéticos y fenotípicos que ocurren tempranamente en la especiación.

Este proceso ocurre de forma natural, y los híbridos generados son viables y al menos en parte fértiles (Arnold, 1997). En la mayoría de estas áreas, habitualmente estrechas, generan un amplio rango de genotipos sobre los que pueden actuar mecanismos selectivos que contrarrestan el flujo genético y mantienen las poblaciones como unidades diferenciadas a pesar de la hibridación.

Se han propuesto dos escenarios para explicar los patrones de variación en las ZH: *contacto secundario* y *contacto primario* (Mayr, 1942; 1963; Harrison, 1990). El primero sugiere que las ZH son el resultado del contacto entre poblaciones que estuvieron previamente aisladas geográficamente. Si el aislamiento reproductivo no se ha alcanzado completamente se puede producir hibridación. Según el escenario de contacto primario, las áreas aparecen *in situ*, es decir, en poblaciones que presentan una distribución continua en parapatría y que se diferencian a lo largo de un gradiente ecológico sin una separación inicial entre ellas.

Una característica de las zonas híbridas es que pueden moverse en el espacio y tiempo (Barton y Hewitt, 1981), con consecuencias importantes en la evolución de las poblaciones involucradas. Su estabilización puede resultar de una combinación entre la dispersión constante de individuos parentales en la ZH y la selección en contra de los híbridos (Haldane, 1948; Key 1968; Bazykin 1969; Endler, 1977; Barton y Hewitt, 1985, 1989).

El reconocer que las zonas híbridas son sitios de intercambio genético de manera parcial entre especies, poblaciones o razas cromosómicas, ha llevado a describirlas como "*barreras semipermeables al intercambio de genes*" a pesar que los rearrreglos cromosómicos y loci genéticos están bajo presión selectiva (Harrison 1990).

Rearreglos Cromosómicos: implicancias en la formación de nuevas especies

La variación cromosómica puede ser una fuente de información citotaxonómica, dada por diferentes mutaciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, así como su comportamiento durante la mitosis y meiosis (Lambrot, 2008; Astete 2011). Las mutaciones estructurales documentadas tales como: inversiones (Carson y col 1967), translocaciones robertsonianas (King 1993; Garagna y col. 2001), fusiones céntricas (Capanna y col 1976; Redi y Capanna, 1988) fisiones céntricas (Todd 1970; Lambrot 1991; Kolnicki 2000) entre otras, suelen producir un gran efecto al impedir o reducir la fertilidad de los híbridos, creando una barrera al intercambio genético e influyendo en la diferenciación de individuos de una población, los que eventualmente podrían alcanzar el estatus de especie (King 1993, Lambrot 1991).

Bajo el supuesto que las mutaciones o reordenamientos cromosómicos pueden jugar un papel importante en la especiación, diversos modelos de especiación cromosómica han sido formulados (Lewis 1966; White, 1978 a y b; Hall, 1973; Grant 1981; Templeton, 1981; Baker y Bickham 1986), logrando afectar las tasas y patrones de recombinación y, así, la cantidad y distribución de intercambios génicos (Noor y col. 2001; Navarro y Barton, 2003).

Una cantidad considerable de evidencia indirecta (White 1978a; Rieseberg 2001) llevó a la idea de que los rearrreglos cromosómicos (RC) juegan un papel en la especiación, con una resistencia entre investigadores dada la aceptación de modelos mal acompañados por un marco teórico formal. Además, la opinión predominante sobre la especiación debía ser con un aislamiento reproductivo total sin flujo de genes (Coyne y Orr 2004).

Tres son las evidencias que proponen que los RC pueden desempeñar un papel importante en la especiación: (1) el hecho de que la mayor parte de las plantas y animales presentan diferencias notables en sus cariotipos, incluso entre aquellas estrechamente relacionadas (King, 1993), (2) la observación de que algunos RC pueden causar problemas de fertilidad en híbridos (Orr, 1996), y (3) la asociación entre tasas de RC y tasas de especiación en diferentes phyla (Bush et al, 1977).

Para que los rearrreglos cromosómicos se fijen en poblaciones conectadas por el flujo de genes, deben cumplirse por lo menos tres condiciones: (1) los RC deben suprimir la recombinación; (2) la supresión del flujo de genes dentro de un RC debe haber jugado un papel fundamental en el aislamiento reproductivo, y (3) la existencia de diferencias entre los taxones hermanos. La probabilidad de que se fije en una población depende, en primer lugar, del origen del RC para luego el establecimiento del RC en alta frecuencia en el demo, seguido de la expansión y fijación en los demos

Pocos temas dentro de la biología evolutiva han sido debatidos con más pasión que los mecanismos específicos sobre el origen de las especies, y a menudo se han centrado en dos aspectos fundamentales y relacionados: (1) la importancia relativa de la selección natural frente a la deriva genética, y (2) cómo el aislamiento reproductivo se puede completar al frente de flujo de genes (Coyne y Orr, 2004). En general, se supone que las tasas de migración de uno o más individuos por generación son suficientes para impedir la diferenciación entre poblaciones (Wright, 1931).

La deriva genética y los eventos de extinción-recolonización son dos factores que influyen en los RC (Hedrick, 1981; Lande, 1985). Bajo extinción-recolonización, la probabilidad de fijación en demos semi-aislados se maximiza para un flujo genético intermedio (Michalakis y Olivieri, 1993). Otros dos factores relevantes son la consanguinidad, que retrasa el progreso de la fijación bajo deriva genética, y el impulso meiótico que disminuye o elimina la frecuencia de equilibrio (Hedrick, 1981).

Marcadores cromosómicos, moleculares y morfológicos

Los diferentes tipos de marcadores independientes (cromosomas, aloenzimas, AFLPs, ADN_{mt}, etc.) se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en diferentes *loci*. Tanto la divergencia genética como la acumulación de nuevas mutaciones pueden ser cuantificadas con análisis que facilitan la detección de hibridación e introgresión, aún cuando los híbridos pueden ser difíciles de distinguir entre sus parentales (Allendorf y col. 2001; Field y col. 2010).

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología evolutiva, ecología y genética de poblaciones, y se utilizan para rastrear e identificar genes de interés. Hoy en día, existen varias técnicas moleculares que permiten conocer las variantes alélicas de genes en poblaciones naturales (o razas), tanto de manera indirecta, e.g. con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN (Simpson, 1997).

Inicialmente, la detección de polimorfismos genéticos se evidenció mediante variantes electroforéticas para proteínas. El principio básico de la técnica reside en el uso de electroforesis en gel de almidón (Smithies, 1955) y en la visualización del producto enzimático por métodos histoquímicos (Markert y Hunter 1957), aspecto que permitió la detección de zonas híbridas (Barton y Hewitt, 1985), y la revelación de electromorfos únicos, referidos a "*hybrizymes*" por Woodruff (1989), marcadores que no se encuentran en poblaciones parentales.

Los *marcadores de ADN* presentan ventajas frente a los de proteínas, por no afectarse por condiciones fisiológicas, ambientales o de crecimiento del individuo y no son específicos de ciertos tejidos (Frankham y col. 2004). Con el desarrollo de la amplificación en cadena de la polimerasa (*PCR*) (Saiki y col. 1988), se llega a la descripción de nuevas clases de marcadores moleculares, por ejemplo loci de *AFLP* (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Montaño-Pérez y col. 2006), entre otros.

Dentro de las particularidades de los *AFLP* tenemos que: i) no se requiere conocimiento previo de la secuencia genética; ii) existe especificidad en la resolución de la digestión con enzimas de restricción y iii) hay rapidez en la detección de polimorfismo vía *PCR* otros. La desventaja reside en la baja cantidad de información genética por *locus*, haciendo difícil discernir codominancia por ser un marcador dominante (Montaño-Pérez y col. 2006).

Los análisis más detallados de diferenciación genética pueden obtenerse secuenciando la región de interés para diferentes individuos. Actualmente la secuenciación es muy común, aplicándose en estudios de genética de poblaciones y para resolver problemas taxonómicos. La secuenciación de ADN mitocondrial (ADN_{mt}), es otra forma de detectar polimorfismos genéticos. Es altamente variable, no recombina, de herencia materna (a excepción de *Mytilus*, Zouros *et al.* 1994, y en humanos, Ankel-Simons y Cummins, 1996) y con alta tasa de mutación. Aunque, por sí solo, el ADN_{mt} ofrece muy poca información acerca de la hibridación, sin embargo, junto con la información de otros loci o de datos geográficos a menudo ha proporcionado pruebas convincentes de introgresión entre especies (Carr *et al.* 1986; Dowling y DeMarais, 1993).

Los métodos de análisis basados en la morfología (morfométricos y merísticos) ampliamente utilizados en sistemática, ofrecen ventajas sobre los métodos moleculares, en particular cuando estos no pueden aplicarse, e.g. a falta de tejidos vivos (Pounds y Jackson 1981; Ferreira y Grattapaglia, 1998; Frankham y col. 2004). Sin embargo, no todas las variaciones morfológicas poseen una base genética clara, y a menudo una gran variación morfológica intrapoblacional, puede suponer la presencia de individuos híbridos fenotípicamente intermedios a los parentales (Smith, 1992).

El Complejo *Liolaemus monticola* como modelo de estudio

El género *Liolaemus* con más de 225 especies descritas (Lobo y col. 2010) restringido al cono sur de Sudamérica, ocupa una amplia área geográfica (entre los 14° a 52° lat. S y 70° a 71° long. W, y altitudes que varían desde el nivel del mar hasta los 4500 m). Está presente en variados regímenes climáticos, incluyendo el árido desierto de Atacama o los lluviosos bosques templados de *Nothofagus* en Tierra del Fuego (Cei, 1986, 1993; Donoso-Barros, 1966; Etheridge y De Queiroz, 1988; Lobo, 2001).

Liolaemus monticola (von Müller y Helmich, 1932), especie montañosa endémica de Chile, posee un tamaño corporal mediano, logra formar comunidades relativamente numerosas y mantiene hábitos alimentarios insectívora (Donoso-Barros, 1966; Lamborot, 2008). Distribuída entre los 30° a 40° Lat. S y 70° a 71° long. W y altitudes que van desde los 400 a 1600 m (Donoso-Barros, 1966; Peters y Donoso - Barros, 1970; Lamborot y col. 2003).

Constituye una especie única en el género y en la herpetofauna de Chile (Lamborot, 1993), por presentar cualidades especiales tales como: un gradiente latitudinal de diversidad cariotípica de complejidad creciente de sur a norte ($2n=32$ a $2n=46$), variadas mutaciones cromosómicas intra e inter razas; numerosos polimorfismos cromosómicos y varias zonas de hibridación parapátricas, entre otras (Lamborot, 2008).

Hasta la fecha, se han reportado siete razas cromosómicas: "*Primitiva* ($2n= 32$)"; "*Sur* ($2n= 34$)"; "*Norte* ($2n= 38$ a 40)"; "*Norte modificado 1* ($2n= 38$ a 40)" y "*Norte modificado 2* ($2n= 38$ a 40)", además de "*Múltiples Fisiones 1* ($2n= 42$ a 44)" y "*Múltiples Fisiones 2* ($2n= 44$ a 46)"; (Lamborot 1991, 1998, 2001; Lamborot y col. 1981, 2012) y varias zonas de hibridación (Lamborot 2008). Este estudio se centró en dos razas cromosómicas: "*Sur*, $2n=34$ " y "*Norte*, $2n=38$ a 40 " y una zona híbrida interracial descrita por Lamborot 1991.

El número diploide para la raza Sur, para ambos sexos, se compone en 12 macrocromosomas y 22 microcromosomas (Lamborot, 1991). Es así como los pares 1, 3, 4, 5 y 6 son metacéntricos; el par 2 submetacéntrico que lleva un satélite en el extremo de su brazo largo. Los pares microcromosomales 7, 8 y 9 son metacéntricos, pero la morfología de los microcromosomas restantes es difícil de establecer (Lamborot, 1991). En cambio, la raza Norte, el cariotipo oscila 38 a 40 para ambos sexos con diferentes variantes. Todas presentan una sustitución conservada del par macrocromosómico 4, más la condición polimórfico para el par macrocromosoma 3, y cerca de 24 microcromosomas.

El Río Maipo, y uno de sus afluentes el Río Yeso, separan las razas "Sur, $2n=34$ " y "Norte, $2n=38$ a 40 ". Sin embargo, en la ribera sur del Río Yeso, Lamborot, (1991) describe una estrecha zona de hibridación inter-racial de aproximadamente 10.000 m^2 (200m de largo por 50m de ancho) considerada *de contacto secundario*, con gran variabilidad cromosómica y genéticas dada la presencia de híbridos cromosómicos (Lamborot 1991; Lamborot y col. 2003; Vásquez y col. 2007; Páez, 2010; Astete, 2011), los que suelen poseer un grado de aneuploidía cromosómica, mitóticas y meióticas, mayor que las razas parentales (Lamborot, 1991).

El reconocimiento del cariotipo de los híbridos, machos o hembras, se basa en la disposición cromosómico diploide; cuando los híbridos son machos, este diagnóstico se hace fácilmente a partir de espermatozoides en diacinesis, los cuales son reconocidos por presentar combinaciones cromosómicas que no están presentes en ninguna de las dos razas parentales.

Diversos estudios, que van desde los citogenéticos (Lamborot 1991, 1993, 1998, 2001; Lamborot y Álvarez-Sarret, 1993; Lamborot y col. 2012), morfológicos (Lamborot y Eaton, 1992, 1997; Lamborot y col. 2003), biogeográficos, genéticos (Lamborot y Vásquez 1998; Vásquez y col. 2007, Páez 2010) y filogeográficos (Torres-Pérez y col. 2007, 2009), avalan la hipótesis de una complejidad cromosómica creciente de sur a norte, concomitante a una evolución desde ambientes más húmedos a más xéricos (Lamborot, 2008).

El conocimiento acumulado para esta particular lagartija, tanto en distribución como en los diversos estudios mencionados, deja de manifiesto la necesidad de una información comparada de los procesos de introgresión genética cromosómica interracial con sus alcances y consecuencias evolutivas, mediante el empleo de marcadores independientes nucleares, citoplasmáticos y morfológicos. Por tal motivo, en este trabajo, se basa en la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

“La existencia de dos razas cromosómicas “Norte, $2n= 38-40$ ” y “Sur, $2n= 34$ ” para *Liolaemus monticola*, más una zona de hibridación producto del contacto de ambas razas geográficamente delimitadas, presumen que los niveles de introgresión entre las razas parentales son mínimos o nulos.”

OBJETIVOS

Objetivo General

Estimar el grado de introgresión inter racial y la zona de hibridación descrita para dichas razas, utilizando diferentes aproximaciones tanto cromosómicas, moleculares y morfológicas.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la variabilidad y estructura genética mediante análisis: citogenéticos, ADN_{mt} (cit-b), loci de AFLP y aloenzimáticos, y caracteres morfológicos (merísticos) en y entre las razas Sur ($2n=34$) y Norte ($2n=38-40$) de *L. monticola* más la zona de hibridación interracial Sur x Norte.
2. Caracterizar el nivel de hibridación de dos razas de *Liolaemus monticola* en la zona central de Chile con énfasis en una zona de hibridación.
3. Establecer límites y relaciones espaciales entre razas parentales y zona de hibridación.

MATERIALES y MÉTODOS

Obtención del material biológico

La mayoría de las muestras utilizadas en este estudio corresponden a material preservado durante tres décadas (1980, 1990 y 2000), ya sea preparaciones citogenéticas, tejidos almacenados a -85°C o de individuos etiquetados y preservados en alcohol 70%, en las dependencias del Laboratorio de Citogenética, Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile.

La recolección de los ejemplares se realizó mediante lazos corredizos, y trasladados vivos al laboratorio para su sacrificio con el propósito de efectuar análisis citogenéticos, moleculares y morfológicos. Las referencias geográficas, así como el tamaño de muestra se muestran en la Tabla 1 y Fig. 1. Con el propósito de aumentar el número muestral para los análisis estadísticos, las localidades fueron agrupadas mediante eco-demos, tal como lo establecido en la Tabla 1.

Este estudio incluyó varias muestras de las razas cromosómicas de *Liolaemus monticola* Sur y Norte, más una Zona de Hibridación interracial, además algunas localidades de la Raza Norte Modificada I ($2n=38-40$) (ver Tabla 1 y Fig. 1) con algunos análisis previos como los de Lamborot y Eaton 1997; Lamborot 2001; Lamborot y col. 2003; Torres-Pérez y col. 2007 y 2009; y de Vásquez y col. 2007; tesis de Páez 2010 y Astete 2011.

Tabla 1. Lista de las muestras de *Liolaemus monticola* utilizadas en este estudio, indicando número en el mapa (NM), localidad y abreviatura entre paréntesis, Rango Geográfico, coordenadas geográficas, Altitud (msnm) y número de ejemplares. Trans.: Transversal.

NM	Localidad	Rango Geográfico	Posición Geográfica	Altitud	N
1	Siete Tazas (STA)		35°27'31" S, 71°01'34" E	960-970	3
2	Río Lontué (RLO)	Sur Andes	35°18'16" S, 70°58'17" E	1200	11
3	Los Queñes (QÑS)		35°06'18" S, 70°48'58" E	1200-1450	36
4	C ^o Cantillana (CAN)	Sur Costa	33°58'46" S, 70°59'14" E	1300-1600	18
5	El Volcán (VOL)		33°49'01" S, 70°10'00" E	1415-1450	3
6	El Ingenio (ING)	Sur Andes	33°46'33" S, 70°16'40" E	1200-1400	9
7	Río Clarillo (RCL)	(Cajón del Maipo)	33°43'47" S, 70°28'05" E	950-1300	8
8	Maipo Sur (MAS)		33°38'49" S, 70°21'37" E	980	22
9	Yeso Sur (YES)	Zona Híbrida	33°47'14" S, 70°13'40" E	1300-1320	45
10	Yeso Norte (YEN)		33°47'09" S, 70°13'38" E	1300-1320	24
11	San Gabriel (SGA)		33°46'45" S, 70°14'47" E	1100-1250	14
12	El Manzano (MAN)		33°31'29" S, 70°24'19" E	1350-1500	11
13	El Alfalfal (ALF)	Norte Andes	33°30'16" S, 70°11'48" E	1330	27
14	El Arrayán (ARR)	(Cajón del Maipo)	33°19'20" S, 70°28'20" E	1300-1500	4
15	Farellones (FAR)		33°20'47" S, 70°21'41" E	1400-1500	16
16	Yerba Loca (YLO)		33°20'16" S, 70°19'58" E	1800	8
17	Saladillo (SAL)		32°54'35" S, 70°18'02" E	1400-1500	16
18	Río Blanco (RBL)	Norte Mod. 1	32°54'29" S, 70°18'19" E	1400-1450	8
19	Colorado Sur (COS)	Andes	32°51'44" S, 70°25'00" E	1550	26
20	Colorado Norte (CON)		32°51'44" S, 70°25'01" E	1550	22
21	C ^{ta} Chacabuco (CHA)	Norte Trans.	32°57'46" S, 70°42'40" E	1000-1200	9
22	C ^o La Campana (CAM)		32°57'31" S, 71°07'26" E	1350-1500	14
23	C ^o El Roble (ROB)	Norte Costa	33°00'39" S, 71°00'34" E	800-1650	37
24	C ^{ta} La Dormida (DOR)		33°03'43" S, 71°00'37" E	900-1350	30



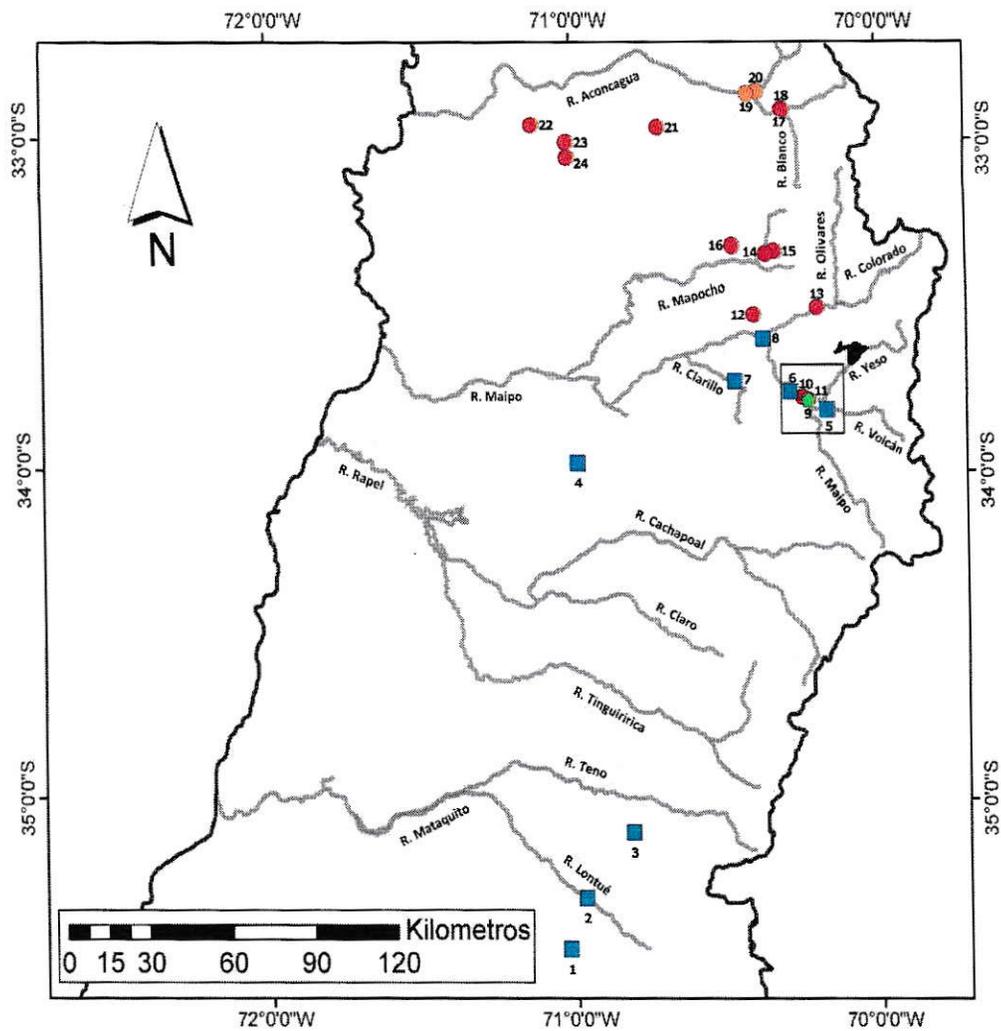


Figura 1: Mapa representativo de las 23 localidades analizadas para este estudio. **Naranja:** Raza Norte Modificada I (2n=38-40), **Rojo:** Raza "Norte" (2n= 38-40), **Verde:** Zona de Hibridación, **Azul:** Raza "Sur" (2n= 34). 1) Siete Tazas; 2) Río Lontué; 3) Los Queñes; 4) Co Cantillana; 5) El Volcán; 6) El Ingenio; 7) Río Clarillo; 8) Maipo Sur; 9) Yeso Sur; 10) Yeso Norte; 11) San Gabriel; 12) El Manzano; 13) El Alfalfal; 14) El Arrayán; 15) Farellones; 16) Yerba Loca; 17) Saladillo; 18) Río Blanco (se encuentra solapada con la localidad de Saladillo); 19) Colorado Sur; 20) Colorado Norte; 21) Cta. Chacabuco; 22) Cta. La Campana; 23) Co El Roble; 24) Cta. La Dormida.

Obtención de tejidos para los diferentes análisis genéticos

Cada *L. monticola* se sacrificó con una sobredosis de uretano en el ojo pineal, previa inyección de colchicina, dos horas antes de su procesamiento. Luego, se disectó y se extrajo el bazo, médula ósea (de un fémur) y testículos para la obtención de placas cromosómicas y tejidos de: hígado, intestino, músculo esquelético y corazón, los que fueron almacenados a -85° C para las electroforesis de proteínas en geles de almidón o conservadas en alcohol al 70% para la obtención de ADN y posterior secuenciación de *AFLP* y del citocromo b del ADN_{mt}.

Obtención de cromosomas: Técnica del goteo de Lambrot y Vásquez (1998).

A partir de muestras frescas de testículo, médula ósea y bazo, disgregadas en placas de Petri con una solución isotónica (*Ringer para reptiles*) se obtuvo una suspensión celular que se depositó en tubos de centrifugación rotulados, luego centrifugados a 800 rpm durante 8 min. El sobrenadante se descartó y se reemplazó por una solución hipotónica de *Citrato de sodio* al 0,8%, reposando aproximadamente por 17 min.; luego se centrifugó y descartó el sobrenadante, para adicionar el fijador (*metanol - acético* 3:1) y agitación manual. Se centrifugó nuevamente por 8 min. y se repitió el paso anterior con el fijador nuevo. Posteriormente, se dejó caer una gota de la suspensión sobre un portaobjeto limpio, que se seca en una plancheta termoeléctrica (Thermolyne HP-A 191), se tiñó con *solución Giemsa* al 4% ajustado a pH 7,2 por 25 min. y se dejó secar.

Se observaron las preparaciones al microscopio registrando y diagnosticando las metafases mitóticas y meióticas. Finalmente, estas preparaciones fueron montadas en DEPEX, cubiertas con un cubre objeto y secadas en una plancheta las que fueron fotografiadas con una cámara fotográfica *Nikon Optiphot FX 35^a*, adicionada al microscopio. Las fotografías fueron ampliadas para el montaje de los cariotipos mitóticos y meióticos y su posterior diagnóstico.

Una vez reconocidos los siete primeros pares cromosómicos, se diagnosticó la condición de polimorfismo (Lambrot, 1998) de los pares que podían presentar alguna modificación en su estructura producto de algún rearrreglo cromosómico y puestos en una matriz de datos. Para el análisis de los polimorfismos cromosómicos, se procedió con los mismos parámetros establecidos en Lambrot 1998, quien asigna la morfología: "AA" al par cromosómico no fisionado, metacéntrico o submetacéntrico; "BB" al par fisionado (par 3 y/o 4); "CC" al par con inversión pericéntrica (par 7); "EE" al cromosoma alargado del par 6.

Extracción de ADN

Una pequeña porción de tejido (aprox. 1 mg), ya sea corazón, hígado o músculo, fue usado para la extracción de ADN. Este proceso fue llevado a cabo mediante una modificación del protocolo de *extracción salina* descrito por Aljanabi y Martínez (1997), y su concentración fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro de la marca Nanodrop.

Caracterización del polimorfismo de loci Aloenzimáticos y de *AFLP*, y secuenciación del gen mitocondrial (*cit-b*)

Loci Aloenzimáticos

Para la visualización de alelos aloenzimáticos se utilizó el protocolo descrito por Vásquez (2002) y Páez (2010) (Tabla 2). Los tejidos, previamente almacenados a -85° C, fueron descongelados y macerados manualmente en un mortero a baja T° adicionando un *buffer de extracción*, Tris Base 0,01 M, EDTA pH 6,8 0,01 M, NaCl 0,03 M y dH_2O , ajustado a pH 6,8 con HCl. La mezcla se traspasó a tubos *Eppendorf* rotulados.

Los geles de almidón hidrolizado al 11%, con *buffers*, enzimas y cofactores necesarios para visualizar las enzimas requeridas (Tabla 2), se prepararon siguiendo el protocolo del Laboratorio de Citogenética Evolutiva y el de Vásquez y col. (2007). La corrida electroforética se efectuó con el voltaje y el amperaje apropiados para la migración correcta de cada enzima (Tabla 2). Transcurrido el tiempo de corrida, se procedió a la visualización de las migraciones de las enzimas reveladas por su tinción específica (Vásquez 2002), y se incubó a 37° C, durante un tiempo relativo para cada proteína (Tabla 2). Cada gel teñido, se secó en estufa de secado (Memmert B40) a 60° C y fue fotografiado con el fin de registrar los patrones de bandas. La interpretación de patrones de bandas se llevó a cabo en base a diagramas acorde a las sub-unidades que conforman a cada proteína asignando un "*genotipo putativo*", basado en la migración electroforética, descrito en Vásquez (2002).

Tabla 2: Lista de las enzimas con la nomenclatura según los criterios de la IUBNC, sistemas de *buffers* y condiciones ideales utilizados en las corridas electroforéticas para la revelación de las proteínas.

Enzima	Sigla	IUBNC	Sistema <i>Buffers</i> y condiciones ideales
Glucosa – 6 fosfato isomerasa	PGi	EC 5.4.2.2	
Lactato Deshidrogenasa	LDH	EC 1.1.1.40	Tris Citrato
Peptidasa-A	Pep-A	EC 3.4.11.4	pH 8,0; 75 mA; 90 V; 7 hrs
Superóxido Dismutasa	Sod	EC 1.15.1.1	
Aspartato Aminotransferasa	Aat	EC 2.6.1.1	
α -Manosidasa	α -Man	EC 3.2.1.24	Tris Borato EDTA
α -Esterasa	α -Est	EC 3.1.1.1	pH 8,6; 17-20 mA; 90 V; 5-6 hrs
β -Esterasa	β -Est	EC 3.1.1.1	
Fosfoglucomutasa	Pgm	EC 5.4.2.2	Tris HCl
α -Esterasa	α -Est	EC 3.1.1.1	pH 8,2; 60 mA; 130 V; 5-6 hrs
β -Esterasa	β -Est	EC 3.1.1.1	
Adenilato Kinasa	AK	EC 2.7.4.3	Tris Borato EDTA
Creatina Kinasa	CK	EC 2.7.3.2	pH 8,0; 35 mA; 140V; 7-8 hrs

Loci de AFLP

La amplificación de fragmentos de *AFLP* fue llevada mediante el protocolo de Vos y col. (1995), el cuál consta de tres etapas:

I) **Digestión enzimática y Ligamiento de adaptadores**, cuyo propósito es cortar el ADN en lugares específicos con enzimas de restricción y pegar adaptadores específicos al extremo de cada fragmento formado por la digestión enzimática, la que constó de una reacción de 12 μL de solución final, formado por *buffer T4 10X*, los adaptadores: *EcoRI* 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'; 3'-TACTCAGGACTCAT-5' y *MseI* 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'; 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5', NaCl 0,5 M, BSA 10 ng/ μL , 50 ng/ μL ADN, y una mezcla de enzimas, en un *buffer T4 10X*, ADN *T4 DNA ligasa* 1U, las enzimas *EcoRI* 5U y *MseI* 1U (Invitrogen ®), NaCl 0,5 M, BSA 10 ng/ μL , y ddH₂O. Completada la reacción, se incubó a T° ambiente toda la noche y después almacenada a 4° C. Para cerciorarse sobre la calidad de la digestión, se efectuó una electroforesis con 4 μL de la reacción enzimática en gel de agarosa al 1,5%, luego, a cada tubo de reacción se le suministró 50 μL de ddH₂O.

II) **PCR Pre-Selectivo**: se llevó a cabo en una reacción de 25,5 μL de solución final, formado por *Taq DNA polimerasa Platinum*, *buffer* 10X sin NH₃ (SO₄)₂ y de MgCl₂ 2 mM, y de los oligonucleótidos *Mse-presel* y *Ecori-presel* Los cuatro desoxinucleótidos fueron diluidos a una concentración de 5 mM, más dH₂O, para luego ser todo agregado a la disolución de la digestión-ligación. La mezcla se amplificó en un termociclador *Multigen Labnet*, cuyo perfil térmico constó en un precalentado de 72° C, 29 ciclos de: 30 seg. de denaturación a 94° C, 30 seg. de alineamiento a 56° C y 2 min. a 72° C, luego una extensión a 60° C y se almacenó a 4° C. Al igual que el paso anterior, se efectuó una electroforesis con 4 μL del producto PCR pre-selectivo en un gel de agarosa al 1,5%, luego se adhirió 100 μL de dH₂O a cada producto PCR.

III) **PCR Selectivo:** que consta de la amplificación de fragmentos de ADN con primers específicos, y utilizó los mismos reactivos del paso anterior salvo en los oligonucleótidos a utilizar (MseI-CAC – EcoRI-ACA; MseI-CTA – EcoRI-AAC; MseI-CTT – EcoRI-ACT y MseI-CTC – EcoRI-ACC). Esta reacción fue mezclada con el producto PCR de la reacción pre- selectiva y amplificadas utilizando el mismo termociclador descrito anteriormente, cuyas condiciones térmicas se dividieron en dos partes: 1) *Touch-down:* con un precalentado a 94° C por 2 min., seguido de 12 ciclos de: 30 seg. a 94° C, 65° C por 30 seg., reduciendo en 1° C por ciclo, seguida de una elongación a 72° C, y 2) una *PCR normal* con 23 ciclos de 94° C por 30 seg., 30 seg. a 56° C, 72° C durante 2 min. y de 10 min. a 72° C. El producto final se almacenó en freezer a 4° C. La genotipificación de *AFLP* se realizó en un secuenciador automático de la empresa MACROGEN Inc. (www.macrogen.com).

La estimación de los tamaños alélicos para los fragmentos de los loci de *AFLP* se realizó mediante el estándar LIZ500, usando el software *GeneMarker* 1.91 (SoftGenetics LLC). Sólo los peaks claros y consistentes de entre 75 a 500 pares de bases fueron usados en el análisis, codificado como 1/0 para indicar la presencia/ausencia de cada fragmento en cada individuo. Sólo se utilizaron los loci que presentaron más del 1% y menos del 99% de polimorfismo, para evitar errores de conteo.

Citocromo b (cit-b)

La amplificación del gen mitocondrial *cit-b*, se realizó con una reacción de 25 μ L de solución final, formado por *Taq DNA polimerasa* a 5 U/ μ L, de *buffer* 10X sin $\text{NH}_3(\text{SO}_4)_2$ y de MgCl_2 2 mM, todos Invitrogen®, más 25 μ M de cada oligonucleótido: LGLUD: 5`-TGACTTGAARAACCAAYCGTTG-3 (Palumbi, 1996) y HCB3: 5`-GGCAAATAGGAARTATCATTC-3` (Palumbi 1996). Los cuatro desoxinucleótidos a 200 mM, dH_2O y 10 ng de ADN genómico se amplificaron en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler MJ Research®, con 35 ciclos con 90 seg. de desnaturalización a 94° C; 25 seg. de alineamiento a 52° C y 90 seg. de extensión a 72° C, con un precalentado de 5 min. a 95° C, culminando con una extensión de 5 min. a 72° C.

Los productos de PCR, fragmentos de 700 pares de bases, se analizaron mediante electroforesis de gel de agarosa al 1 %, en TAE 1% y teñido con *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen®), usando como estándar de tamaño molecular, un ladder de 100 pb Winkler (rango 100–1000 pb), a un voltaje constante de 100 volts durante aproximadamente 1 hr.

Morfología

Para detectar diferencias morfológicas entre las razas se utilizó treinta y siete caracteres merísticos descritos para *L. monticola* (Lambrot y Eaton 1992, 1997). Para cada carácter sólo se midió el lado derecho del cuerpo, pues análisis previos demostraron que la asimetría bilateral no es apreciable (Lambrot y Eaton 1992). La cuantificación y caracterización de las escamas se realizó bajo lupa binocular (*Nikon Stereo Photo SMZ-10*), según protocolo descrito en Lambrot y Eaton 1992, utilizando los siguientes caracteres: COR A: Circumorbitales; COR B: circumorbitales más superciliares y supraorbitales; SOR: dentro del semicírculo del circumorbital; SCI: superciliares; SOC: suboculares; TEM: temporales, entre margen posterior del ojo y la mitad del oído; CATEM: cantus temporal; SAP: bordean el parietal; POSPA: post parietales; FRON: frontales; SAF: bordean la frontal; POPR: post frontales; LOR A: loreales, entre cantales, supralabial y subocular; LASUP 1B: labial superior, segunda mitad del ojo hasta final de comisura labial; LASUP 2A: labial superior A, desde rostral hasta primera mitad del ojo (en contacto con SOC); LASUP 2B: labial superior B, segunda mitad del ojo hasta final de comisura labial; LAINF A: infralabial A, desde mental hasta primera mitad del ojo (en contacto con LASUP 1); LAINF B: infralabial B, desde mental hasta el final de comisura labial;; AURS: auriculares; TIPS: timpánicas; SARO: rodean escama rostral; SAME: rodean escama mental; INA: Internasales; SANA: rodean escama nasal; SBRF: entre frontal y rostral; INCA: intercantales; GUS: gulares; DOS: dorsales; VES: ventrales; SAB: alrededor del cuerpo; FEM: femorales, desde el codo hasta el torso (siguiendo escamas grandes); DORCA: dorsal largo de la cabeza;; AVCO: al rededor del 15º verticilo de la cola, desde el nivel de la cresta genital; LAMA: lámelas subdigitales del cuarto dedo de la pata derecha de la extremidad anterior; LAPA: lámelas subdigitales del cuarto dedo de la pata derecha de la extremidad posterior; LARCAB: largo de la cabeza (cm); LARESCA: cuociente entre LARCAB y DORCA.

Análisis estadísticos

Citogenéticos y Aloenzimáticos: Las variantes cromosómicas fueron tratadas como "alelos", por lo que se realizó el mismo análisis de frecuencias que en aloenzimas. Por ejemplo, se estimó la proporción de loci polimórficos (P); el promedio de heterocigosidades observadas (H_o) y esperadas (H_e), y el número de alelos por locus (A) usando el programa Genetix 4.05 (Belkhir y col. 2004). Además se analizó si estas frecuencias se encontraban bajo equilibrio Hardy-Weinberg usando un test de permutaciones de alelos implementado también en el programa Genetix.

Un análisis de cluster fue esbozado mediante el software *Biosys-1* (Swofford y Selander 1981) para ambos marcadores, utilizando la Distancia de Rogers Corregida (Wright 1978) basados en la metodología *UPGMA*, aplicando la corrección de Levene (1949) para tamaños poblacionales pequeños en el análisis citogenético.

Para determinar el número de poblaciones posibles y la presencia de zona híbrida se utilizó un análisis Bayesiano descrito por Pritchard y col. (2000) e implementado en el programa *Structure* 2.33 (Falush y col. 2007). Este procedimiento no requiere conocer a priori el origen de las muestras, estimando el número más probable de poblaciones maximizando el equilibrio Hardy Weinberg entre los grupos aleatorios realizados. Siguiendo las recomendaciones de los autores, el proceso se ejecutó desde $K = 1$ (un grupo) a $K = 10$ (10 grupos) para todos los individuos, repitiendo cinco veces cada análisis, utilizando una inferencia de Lambda (λ) de la frecuencia alélica de cada individuo luego de 1.000.000 de interacciones de MCMC, después de un período de estabilización de 500.000 interacciones, bajo el modelo de ancestralidad basado en el supuesto de *mezcla entre las poblaciones*. La detección del número de grupos (K) fue determinada bajo los criterios de Evanno y col. (2005) empleado por el programa computacional *Structure Harvester* (Earl y von Holdt 2011).

AFLP. Para analizar las razas estudiadas, los análisis estadísticos con loci AFLP fueron realizados utilizando el análisis Bayesiano implementado en el programa *Structure* 2.33 (Falush y col. 2007) con los mismos criterios del análisis cromosómico, siguiendo las recomendaciones para marcadores moleculares dominantes.

ADN_{mt}. Las diferentes secuencias se editaron manualmente y se alinearon con el programa *ProSeq* 2.9 (Filatov, 2002). Para este marcador, debido al bajo número muestral por localidades, se decidió a formar grupos según eco-demos, lo que resultó en 8 grupos diferentes (ver Tabla 1) y, a su vez, mediante razas cromosómicas (ladera norte y sur del río Maipo, y la Zona de Hibridación). Con ello se estimaron sus frecuencias haplotípicas (h), diversidad haplotípica (H), el número de sitios polimórficos (S), la diversidad nucleotídica (n), y el número promedio de diferencia entre pares de secuencias (II) utilizando el programa *DNAsp* 5.0 (Rozas y col. 2003). Con el fin de ordenar los haplotipos resultantes, se construyó una red de haplotipos con el algoritmo "median joining" del programa *Network* 4.61 (Bandelt y col. 1999), donde todas las redes de expansión mínima son combinados dentro de una red, siguiendo un algoritmo análogo al propuesto por Excoffier y Smouse (1994). A su vez, la búsqueda de neutralidad selectiva en la historia evolutiva de *L. monticola* fue determinada mediante las pruebas de *Tajima's D* (Tajima, 1989) y *Fu's Fs* (Fu, 1996). Para detectar una estructuración genética, se utilizó el programa *SAMOVA* 1.0 (Dupanloup y col. 2002), que aplica una estrategia para definir los grupos de poblaciones que son están geográficamente homogéneos y con un máximo de diferenciadas unas de otras, a objeto de maximizar el porcentaje de la varianza genética total debido a las diferencias entre los grupos de la población.

Los análisis filogenéticos se realizaron mediante: Máxima Verosimilitud implementado por el software *RAxML* 7.0.4 (Stamatakis, 2006) e inferencia Bayesiana a través del programa *MrBayes* 3.2 (Ronquist y col, 2012). Además, ambos alcances utilizaron los mismos grupos externos lo que fueron: *Liolaemus nigromaculatus*, *L. nigroviridis* y *L. tenuis*.

El análisis Bayesiano se realizó bajo el modelo de Tiempo Reversible General (GTR) de evolución de secuencias genéticas, más el modelo de tasa de heterogeneidad de distribución gamma (GTR + I+ G), con cuatro cadenas de Markov Montecarlo (MCMC) simultáneas con cinco millones de generaciones, y un soporte nodal mediante una metodología bootstrap no-paramétrico con 100 pseudoréplicas. Los árboles de consenso y la probabilidad a posteriori de los nodos para cada enfoque se estimó con el software *FigTree* Ver. 1.3.1 (Rambaut, 2009).

Morfología. Para un total de 37 variables morfológicas (morfométricas y merísticas), se efectuó un primer análisis paramétrico para estimar el posible dimorfismo sexual en adultos de *L. monticola* aplicando la *prueba t* para muestras independientes y la prueba de Levene como test de homogeneidad de las variables del software *STATISTICA 8* (StatSoft, Inc. 2004). En aquellas variables que presentaron una alta co-linealidad, se efectuó un Análisis de Componentes Principales (ACP), tanto para variables con o sin sesgo entre los sexos. Este análisis permite determinar el peso de cada variable en la varianza total sin considerar la procedencia de las muestras y obtener las variables realmente importantes en la segregación de los individuos en los nuevos componentes formados. Un Análisis de Escalamiento Multidimensional (EMD) se llevó a cabo entre las localidades, para detectar patrones disimilares, mediante el software *SPSS 20* (IBM SPSS Statistic 20.0, 2011) basado en Distancia Euclidiana. A su vez, se efectuó un Análisis Discriminante Lineal (ADL) para encontrar una combinación lineal de variables que permita discriminar entre los grupos previamente asignados dentro del análisis, estos son: la raza norte, sur y zona híbrida.

RESULTADOS

Citogenéticos

De los 218 individuos cromosómicamente analizados, (anexo 1), 41 corresponden a la raza Sur $2n= 34$, monomórfica para los siete primeros pares (codificados AA), a excepción de algunos individuos: un individuo de MAS (2768) que resultó ser híbrido interracial para el par 4 (BB/AB); y otro del ING (3342) que resultó ser mosaico para un polimorfismo de fisión en el par 2 (anexo 1). De 21 lagartos de la localidad YES (zona híbrida), 11 individuos (52.3%) fueron diagnosticados como raza sur (AA), y 10 individuos (47.7%) como híbridos cromosómicos interraciales (AB) en los pares 3 y/o 4 (Anexo 1). Ciento cincuenta y cinco individuos coinciden con un número diploide $2n= 38$ a 40 de la raza Norte, todos monomórficos para los pares 1 y 2 (AA), polimórficos para el par 3 (AA, AB y BB), y fijos para la fisión del par 4 (BB), a excepción de un individuo de SGA (3322), híbrido cromosómico interracial (F_3St_4 ó P_3P_4) y un individuo de CHA (2083) polimórfico para el par 6 (Anexo 1).

Tanto la heterocigocidad observada (H_o) y Heterocigocidad esperada (H_e) más alta entre eco-demos, correspondió al Norte Transversal (0.0952 y 0.0864), siendo monomórficos en Sur Costa y Sur Andes (Tabla 3). La mayoría de los eco-demos no presentaron desviaciones significativas al equilibrio Hardy Weinberg, excepto por los déficit en heterocigotos significativos en los eco-demos Norte Mod. 1 y Sur Cajón (Tabla 3, Anexo 2).

Al agrupar los eco-demos en los tres grandes grupos Norte, Sur y Zona Híbrida, se observan valores desviaciones significativas al Equilibrio Hardy Weinberg con déficit de heterocigotos en la zona Norte y Sur y exceso en la Zona Híbrida (Tabla 4, anexo 3).

El dendograma (Fig. 2) muestra dos grandes clusters, el primero con los eco-demos Norte y el segundo con los eco-demos Sur más la Zona de Hibridación. El primer cluster comprende dos sub clusters: el primero contiene al eco-demo Norte Mod. 1, y el segundo a los eco-demos del Norte, divididos en dos sub-cluster: uno con Norte Costa y Norte Andes, y el otro por Norte Transversal y Norte Cajón. El segundo cluster presenta dos subcluster: el primero con la Zona de Hibridación (YES) y el segundo con los eco-demos Sur, los cuales se separan en dos sub-cluster: primero el Sur Cajón y el segundo conformado por Sur Costa y Sur Andes.

El análisis bayesiano de estructuración poblacional mostró como resultado un $K=3$ como la división más probable entre todas las muestras analizadas, determinado por la mayor diferencia para el cálculo del promedio de $L(K) \pm SD$ en función de K (Fig. 3 A) (según el programa Harvester). A su vez, $K=2$ fue el más probable según el ΔK en función de K propuesto por Evanno y col. 2005 (Fig. 3 B). Esta última agrupación ($K=2$) es consistente con la separación de las razas Norte y Sur, incluyendo en esta última la Zona de Hibridación (Fig. 4 A), y el $K = 3$ permite además reconocer y separar a la raza Norte Mod. 1 ($2n=38-40$).

Tabla 3: Índices de heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), cálculo del número de alelos promedio por locus (A) e índice de deficiencia de heterocigotos (F_{is}) en base a los 7 pares cromosómicos para los 9 Eco-demos de *Liolaemus monticola*.

Eco-demo	n	Ho ± SD	He ± SD	A	F_{is}
N COS	27	0.0582 ± 0.1540	0.0573 ± 0.1517	1.1429	0.00348
N TRANS	9	0.0952 ± 0.2072	0.0864 ± 0.1865	1.2857	-0.04348
N MOD I	48	0.1310 ± 0.1674	0.1626 ± 0.2043	1.4286	0.20462*
N AND	38	0.0639 ± 0.1691	0.0654 ± 0.1731	1.1429	0.03675
N CAJ	33	0.0649 ± 0.1718	0.0798 ± 0.1866	1.2857	0.20133
ZH	21	0.0748 ± 0.1600	0.0727 ± 0.1330	1.2857	-0.00457
S CAJ	9	0.0317 ± 0.0542	0.0582 ± 0.0789	1.4286	0.50000**
S COS	17	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	1.000	-
S AND	15	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	1.000	-

*P= 0,001; **P= 0,004

Tabla 4: Índices de heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), cálculo del número de alelos promedio por locus (A) e índice de deficiencia de heterocigotos (F_{is}) en base a los 7 pares cromosómicos para las razas cromosómicas de *Liolaemus monticola*. Destacados en **negrita** indican exceso de individuos heterocigotos. No se incluyó la raza Norte Mod. 1.

Raza	n	Ho ± SD	He ± SD	A	F_{is}
Norte	107	0.065 ± 0.178	0.071 ± 0.177	1.428	0.097*
ZH	21	0.074 ± 0.136	0.072 ± 0.133	1.285	-0.004*
Sur	41	0.007 ± 0.021	0.015 ± 0.020	1.428	0.500*

*P= 0,02

Distancia de Rogers modificada, Wright (1978)

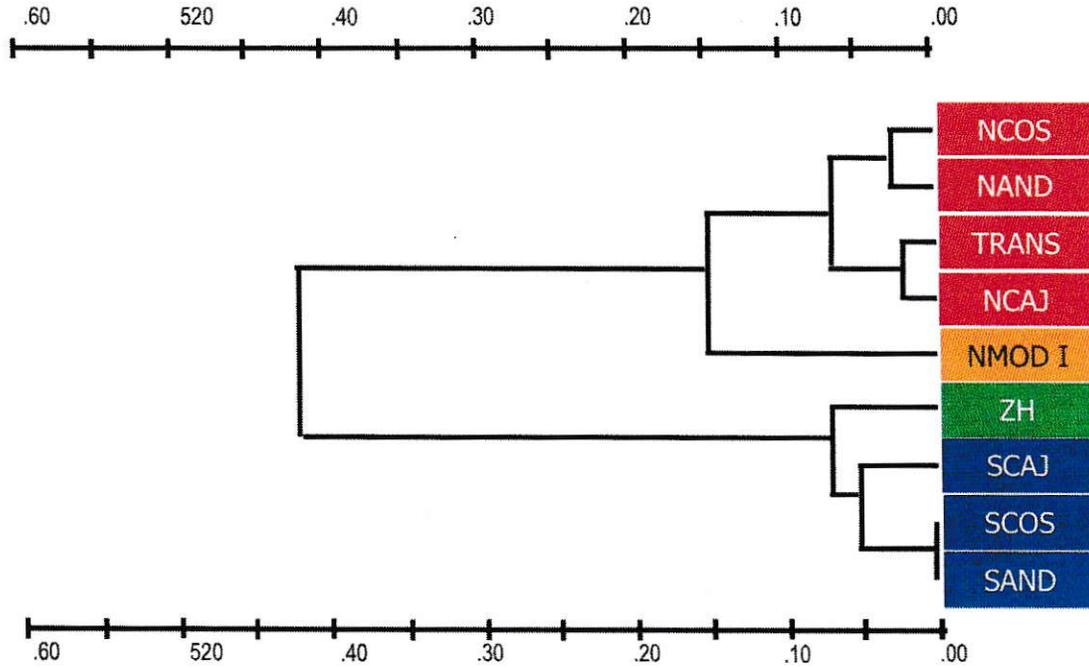
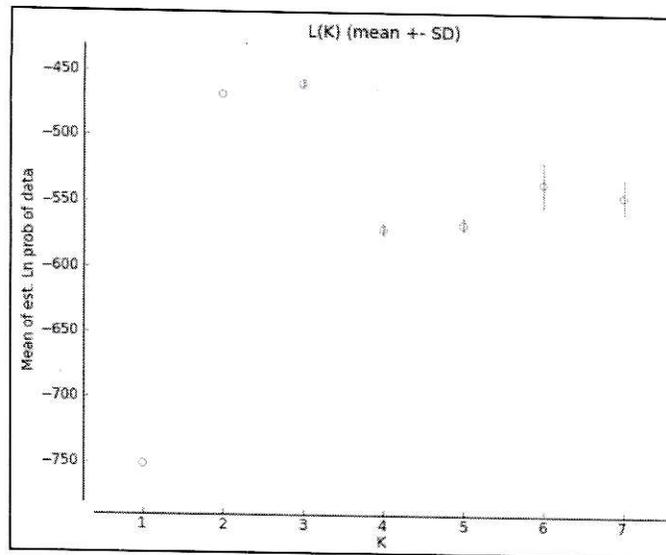
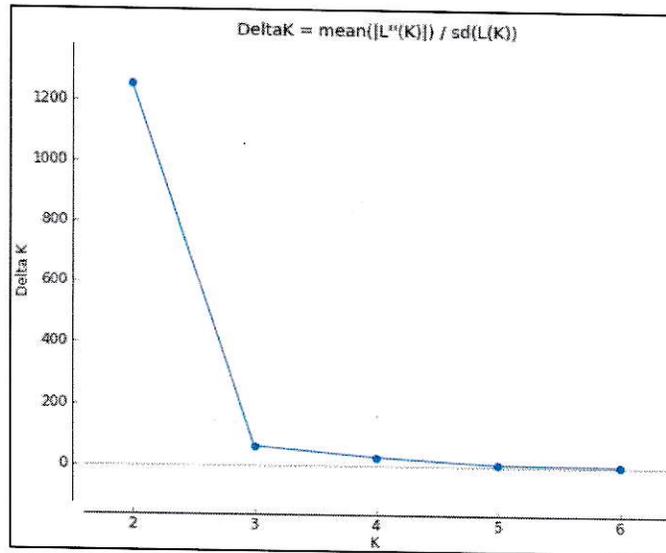


Figura 2: Dendrograma de la Distancia Genética de Rogers Modificada (Wright 1978), obtenidos para la variación de los 7 pares cromosómicos entre 9 eco-demons de *Liolaemus monticola*.



A**B**

Figuras 3 A y B: Detección del número de grupos basados en 7 pares cromosómicos. **(A)** Promedio de $L(K) \pm SD$ en función de K . **(B)** ΔK en función de K determinado a partir de Evanno y col. (2005).

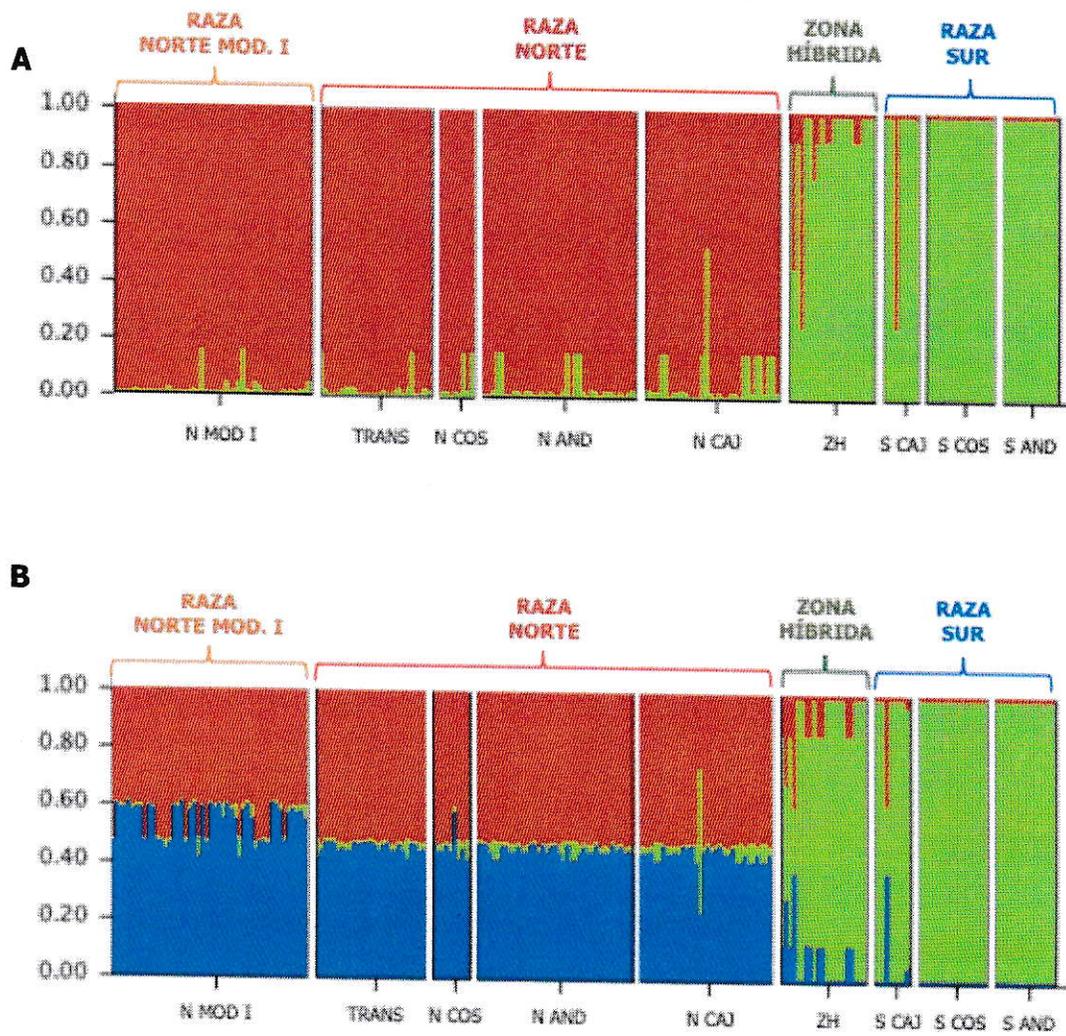


Figura 4: Probabilidad del número de grupos individuales **A** $K=2$ y **B** $K=3$, para los 7 pares cromosómicos considerando 217 individuos, 9 eco-demos y un modelo de ancestralidad basado en el supuesto de mezcla entre las poblaciones, estimado con el programa *STRUCTURE*

Aloenzimas

De 14 loci aloenzimáticos analizados para 357 individuos repartidos en 19 localidades, siete loci (AAT, LDHa, aMAN, PEP, PGI, PGM y SOD) resultaron ser polimórficos e informativos para todas las localidades (1.66 a 2.83 alelos por loci), y a partir de estos se efectuaron los análisis. Los valores de H_o y H_e por eco-demo muestran una tendencia al déficit de heterocigotos siendo esta significativa en la mayoría de ellos (Tabla 5).

Los valores de H_o y H_e por razas cromosómicas aumentan desde la raza Sur hacia la Norte, siendo más altas en ZH, (Tabla 6). Los valores de polimorfismo entre las razas cromosómicas (Tabla 6) se incrementó de Sur a Norte, alcanzando la Zona de Hibridación un valor intermedio. El F_{is} global para las razas cromosómicas (Tabla 14) evidenció un déficit altamente significativos de heterocigotos ($p < 0.0001$) para ambas razas y la ZH.

El dendograma (Fig. 5) muestra la separación parcial de las razas cromosómicas, reconociéndose tres cluster: un primer cluster para el eco-demo Norte Mod. 1. El segundo cluster, el que se subdivide en dos ramas: una corresponde al eco-demo Norte Cajón y la otra a la ZH. Un tercer y último cluster compuesto por cuatro subcluster: el primer eco-demo en divergir es Norte Cajón, el segundo eco-demo Norte Andes, el tercero Sur Costa, y por último, el cuarto subcluster, lo conforman los eco-demos Sur Andes y Sur Cajón.

La inferencia bayesiana para los loci aloenzimáticos tuvo como resultado, a partir del cálculo del promedio de $L(K) \pm SD$ en función de K (Fig. 6 A), que el número más probable de poblaciones es de $K=4$. A su vez, el ΔK en función de K propuesto por Evanno y col. 2005 (Fig. 6 B) confirma la mejor agrupación $K=4$, y además hace mención de una agrupación $K=2$. Los respectivos gráficos para K (Fig. 7 A y B) muestran una nula estructuración entre las razas parentales y la ZH, sólo se evidencia una separación clara de la raza Norte Mod. 1 ($2n=38-40$).

Tabla 5: Índices de heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e), cálculo del número de alelos promedio por locus (A) e índice de deficiencia de heterocigotos (F_{is}) en base a los 7 loci aloenzimáticos para los 8 eco-demos de *Liolaemus monticola*.

Localidad	n	$H_o \pm SD$	$H_e \pm SD$	A	F_{is}
N COS	53	0.173 \pm 0.171	0.250 \pm 0.200	2.833	0.316*
N MOD. 1	48	0.059 \pm 0.079	0.087 \pm 0.077	2.000	0.333*
N AND	44	0.097 \pm 0.126	0.115 \pm 0.146	2.000	0.169
N CAJ	45	1.000 \pm 0.160	0.386 \pm 0.211	2.833	0.383*
ZH	16	0.833 \pm 0.299	0.355 \pm 0.211	2.666	0.306*
S CAJ	38	1.000 \pm 0.153	0.276 \pm 0.149	2.500	0.280*
S COS	18	0.226 \pm 0.166	0.252 \pm 0.163	2.166	0.138
S AND	32	0.125 \pm 0.164	0.162 \pm 0.155	1.666	0.242*

* $P= 0.000$

Tabla 6: Índices de heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e), cálculo del número de alelos promedio por locus (A) e índice de deficiencia de heterocigotos (F_{is}) en base a los 7 loci aloenzimáticos para las razas de *Liolaemus monticola*. Se excluyó la raza Norte Mod. 1.

Raza	n	$H_o \pm SD$	$H_e \pm SD$	A	F_{is}
NORTE	169	0.157 \pm 0.134	0.251 \pm 0.196	3.142	0.376*
ZH	19	0.248 \pm 0.295	0.352 \pm 0.193	2.857	0.315*
SUR	90	0.149 \pm 0.126	0.200 \pm 0.141	2.571	0.259*

* $P < 0.0001$

Distancia de Rogers modificada (Wright, 1978)

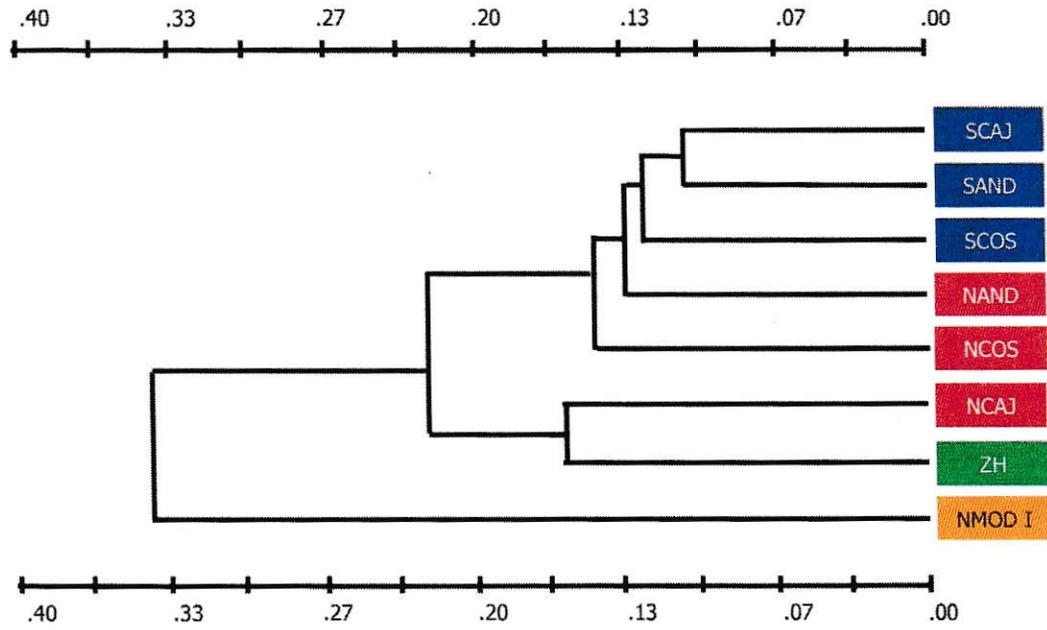
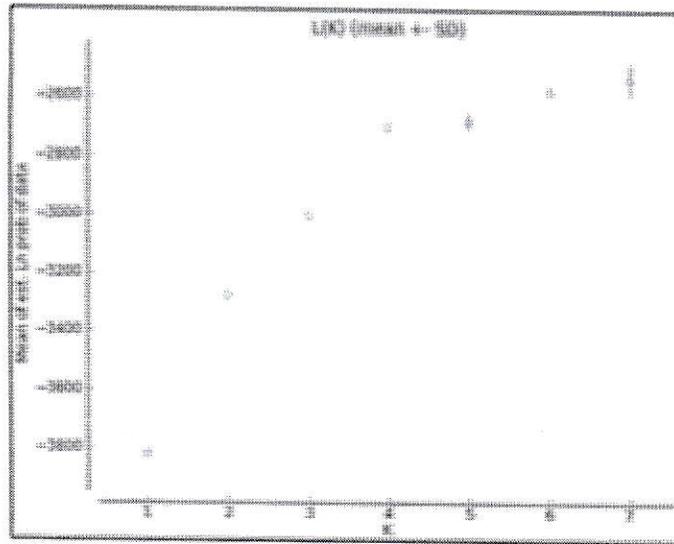
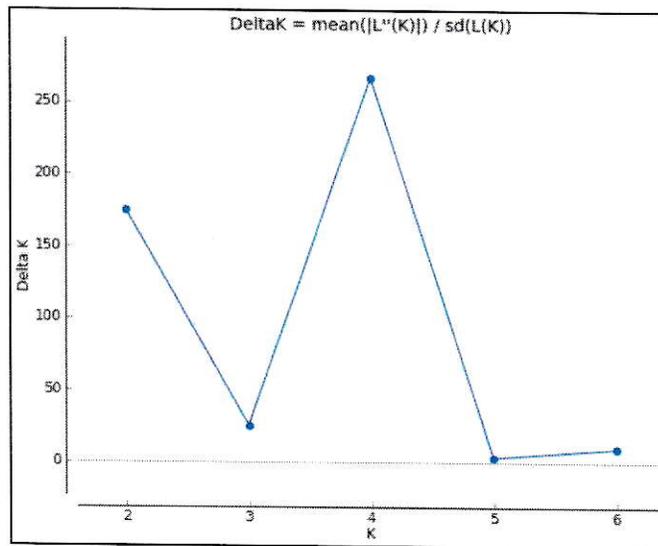
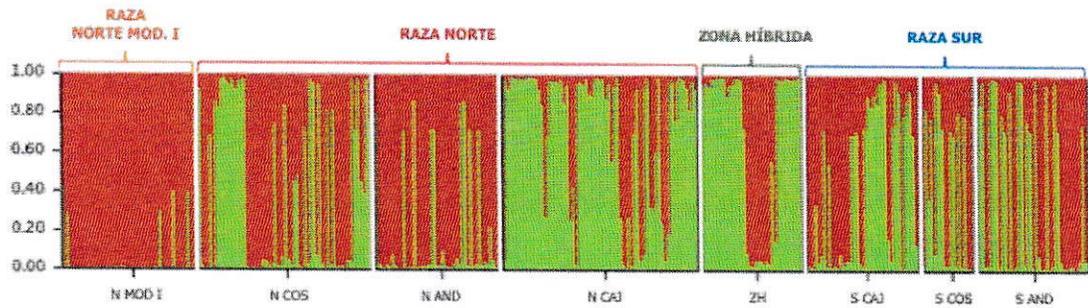
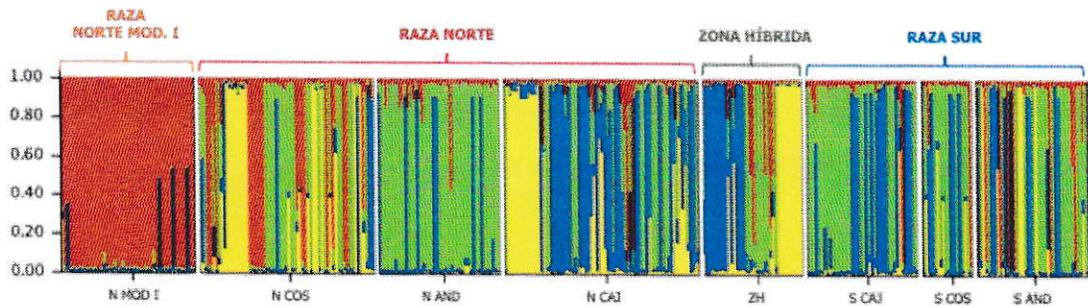


Figura 5: Dendrograma de la Distancia Rogers modificada (Wright, 1978) obtenidos para la variación aloenzimática de 7 loci entre 8 eco-demos de *L. monticola*.



A**B**

Figuras 6 A y B: Detección del número de grupos (K) basados en 7 loci aloenzimáticos y 8 eco-demos. (A) Promedio de L (K) ± SD en función de K. (B) ΔK en función de K determinado a partir de Evanno y col. (2005).

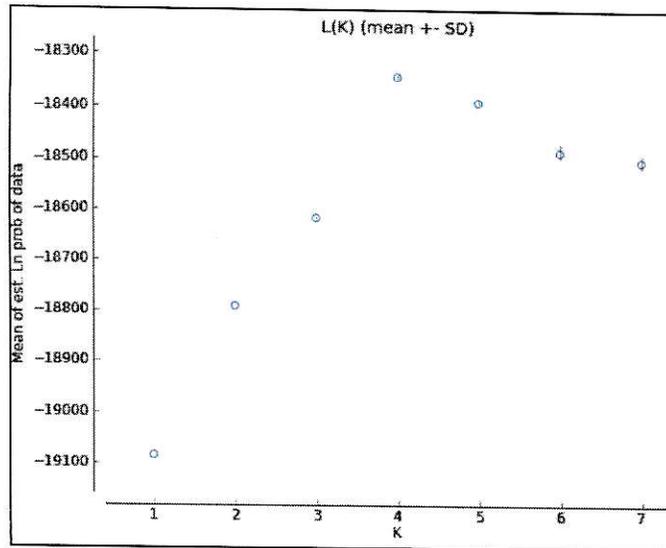
A**B**

Figuras 7 A y B: Probabilidad del número de grupos individuales (K), considerando 357 individuos, 7 loci aloenzimáticos, 8 eco-demos y un modelo de ancestralidad basado en el supuesto de mezcla entre las poblaciones, mediante *STRUCTURE* 2.33. **A)** K= 2 y **B)** K=4, según ΔK en función de K determinado a partir de Evanno y col. (2005).

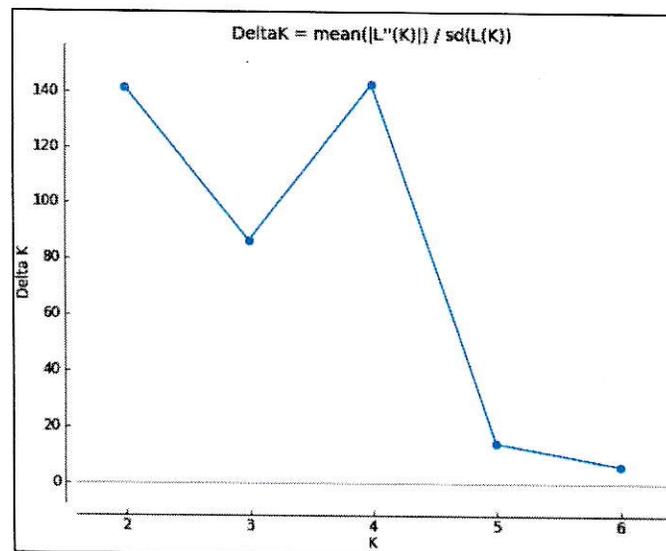
Loci de AFLP

De un total de 801 loci de AFLP en 59 individuos, se seleccionaron 547 loci polimórficos (68.3%), usando el criterio de loci con 1% a 99% de polimorfismo, para los análisis. El análisis bayesiano, implementado por el software Structure 2.33 y revisado por el programa *Structure Harvester*, arrojó como resultado un K=4 como número más probable de poblaciones, determinado por la mayor diferencia encontrada por el cálculo del promedio de $L(K) \pm SD$ en función de K (Fig. 8 A), y a su vez K=2 debido a lo encontrado por el ΔK en función de K propuesto por Evanno y col. 2005 (Fig. 8 B). Los respectivos gráficos para dichos resultados de K muestran una nula estructuración entre las razas parentales y la Zona Híbrida (Fig. 9 A) y una estructuración poco notable entre las localidades de *Liolaemus monticola* entre la raza Norte (2n=38-40) y la raza Sur (2n=34) más ZH (Fig. 9 B).

A



B



Figuras 8 A y B: Detección del número de grupos basados en 547 loci de AFLP. **(A)** Promedio de $L(K) \pm SD$ en función de K . **(B)** ΔK en función de K determinado a partir de Evanno y col. (2005).

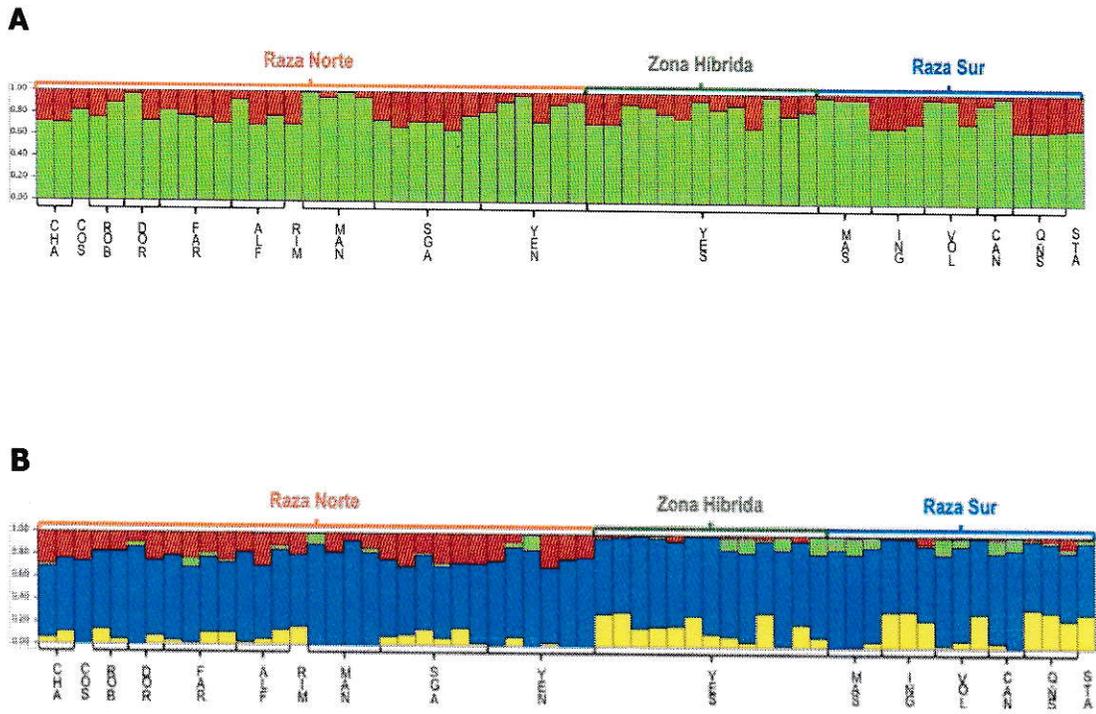


Figura 9: Probabilidad del número de grupos individuales **A** K=2 y **B** K=4, considerando 59 individuos, 541 loci *AFLP* y un modelo de ancestralidad basado en el supuesto de mezcla entre las poblaciones, mediante *STRUCTURE* 2.33. Colorado Sur (COS), pertenece a la raza Norte Mod. 1.

ADN_{mt}

Cuarenta y un haplotipos (h) distintos se detectaron entre 98 secuencias del *cit b*, de *Liolaemus monticola* con una diversidad haplotípica (H) total de 0,930 entre 131 sitios polimórficos (S), con una diversidad nucleotídica (π) de 0.062 y con un número promedio entre pares de secuencias (Π) de 43.165.

De la diversidad haplotípica, por eco-demo indica que Norte Andes fue el más alto (0.923, Tabla 5). A su vez, el mayor número de haplotipos se da en el Norte Cajón con 14 secuencias diferentes. El número de haplotipos exclusivos (hu) por agrupación varió entre uno en la Zona Híbrida (Yeso Sur) a 13 para Norte Cajón (Tablas 5 y 9). La mayor cantidad de sitios polimórficos se detectaron tanto en el Norte Cajón (97 sitios), Zona de Hibridación (92 sitios) y Sur Cajón (88 sitios). Dentro de la Zona Híbrida se detectó la máxima diversidad nucleotídica (0.063) y muy seguida el Sur Cajón (0.060). Con igual resultado el número promedio de diferencia entre pares de secuencias (Π) resultaron ser altas en Zona Híbrida (44.147) y en el Sur Cajón (42.061) (Tabla 5).

A nivel de razas cromosómicas, los índices de diversidad genética resultaron ser similares entre las razas parentales raza y más bajos en la ZH (Tabla 6). Entre los índices de diversidad genética (Tabla 6) tanto el número de haplotipos (h) y la cantidad de sitios polimórficos (S) fueron mayores de norte a sur, con los menores valores en la ZH; en cambio la diversidad nucleotídica (n) y el número promedio entre pares de secuencias (Π), la situación resultó lo inverso: mayores en la ZH, intermedio en el Sur y bajos en el Norte, (Tabla 6).

Tanto las pruebas de *D* de *Tajima*, como la de *Fu's Fs* (Tabla 7 y 8), para buscar neutralidad selectiva en la historia evolutiva de *L. monticola*, detectaron a lo menos una señal de expansión poblacional. Sólo *D* de *Tajima* mostró resultados significativos para la localidad de Río Lontué (-1.224) y para la raza "Norte" (-1.534).

El árbol de mínima expansión de los haplotipos muestra dos grupos correspondientes a las dos razas parentales (Sur y Norte), separadas por cuarenta pasos mutacionales (Fig. 5). Ambas razas e individuos de la zona de hibridación comparten cuatro haplotipos, H17, H18, H30 y H32. Una mirada más detallada de los haplotipos, muestra sub-agrupaciones bien definidas dentro de las razas parentales (haplotipos coloreados) correspondiendo, en gran medida, a su rango geográfico (Tabla 1), con distancias entre dos haplotipos que oscilan entre 2 a 17 pasos mutacionales.

Los valores de F_{st} entre eco-demos resultaron en diferenciaciones altamente significativas entre la mayoría de ellos, desde una escasa diferenciación entre los eco-demos del norte (tabla 10) y una gran diferenciación entre los eco-demos Sur. La Zona de Hibridación presenta una gran estructuración entre los eco-demos Norte, Norte Mod. 1 y con la mayoría de los del Sur, no así con el eco-demo Sur Cajón, con el cual evidenció una nula estructuración (ver Tabla 10). Entre razas (Tabla 11), los valores de F_{st} resultaron significativos en todas las comparaciones. El análisis de *SAMOVA* (Tabla 12) estimó un 56.05 % de la varianza entre grupos lo que equivale a la formación de dos grupos. Esta agrupación es congruente a la separación de los dos eco-demos mayores: uno sur y otro norte del Río Maipo. Al igual que otros análisis la Zona de Hibridación está incluida junto al eco-demo Sur.

Las reconstrucciones filogenéticas realizadas con Máxima Verosimilitud (Fig. 6) e inferencia Bayesiana (Fig. 7), con similares topologías, ponen de manifiesto la separación de las dos razas. A su vez, se evidencia la ubicación de individuos pertenecientes a la Zona de Hibridación en ambos clusters de las razas parentales más individuos de la raza "Sur" (MAS, ING y VOL) asociados a clusters de la raza "Norte", así como individuos de la raza "Norte" (YEN) en cluster "Sur".

Tablas 7: Índices de diversidad genética resultantes de las secuencias del *cit-b* del ADN_{mt} para los 8 ecodemos de *Liolaemus monticola*. Número de individuos (*n*); número de sitios polimórficos (*S*), número de haplotipos (*h*); número de haplotipos únicos (*hu*); diversidad haplotípica (*H*); diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencia entre pares de secuencias (Π).

Zona	n	S	h	hu	H	π	Π
Norte Costa	8	19	6	6	0.893 ± 0.111	0.008 ± 0.005	5.679 ± 3.045
Norte Mod. 1	3	15	3	3	1.000 ± 0.272	0.014 ± 0.011	10 ± 6.324
Norte Andes	13	48	7	6	0.923 ± 0.05	0.021 ± 0.011	14.692 ± 7.039
Norte Cajón	29	97	14	13	0.894 ± 0.039	0.021 ± 0.011	14.679 ± 6.722
Zona Híbrida	20	92	5	1	0.653 ± 0.076	0.063 ± 0.032	44.147 ± 19.989
Sur Cajón	12	88	6	2	0.803 ± 0.959	0.060 ± 0.032	42.061 ± 19.663
Sur Costa	4	1	2	1	0.667 ± 0.204	0.001 ± 0.001	0.667 ± 0.626
Sur Andes	9	19	5	4	0.806 ± 0.119	0.007 ± 0.004	4.556 ± 2.470
TODOS	98	131	41	-	0.930 ± 0.016	0.062 ± 0.029	43.165 ± 18.881

Tablas 8: Índices de diversidad genética resultantes de las secuencias del *cit-b* del ADN_{mt} para las razas parentales de *L. monticola*. Número de individuos (*n*); número de sitios polimórficos (*S*), número de haplotipos (*h*); número de haplotipos únicos (*hu*); diversidad haplotípica (*H*); diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencia entre pares de secuencias (Π). Se excluyó la raza Norte Mod. 1.

Raza	n	S	h	hu	H	π	Π
NORTE	53	122	31	25	0.962 ± 0.013	0.021 ± 0.010	15.258 ± 6.927
ZH	20	92	5	1	0.653 ± 0.075	0.063 ± 0.031	44.147 ± 19.989
SUR	25	96	12	8	0.920 ± 0.029	0.040 ± 0.020	28.360 ± 12.841
TODOS	98	131	41	-	0.930 ± 0.015	0.061 ± 0.029	43.165 ± 18.881

Tablas 9: Valores de las pruebas de neutralidad para el citocromo b: n: número de individuos, Tajima 's D (Tajima, 1989) y Fu's Fs (Fu, 1996) entre las zonas eco-geográficas propuestas para este gen en *Liolaemus monticola*. Valores de P entre paréntesis, y en negrita valores significativos. Casillas en blanco se debe al bajo número muestral.

Zona	n	D	Fs
Norte Costa	7	-1.169 ± 3.899 (0.139)	-0.221 ± 1.24 (0.391)
Norte Mod. 1	3	-	-
Norte Andes	12	-0.962 ± 0.883 (0.166)	2.315 ± 1.524 (0.857)
Norte Cajón	29	-1.573 ± 0.878 (0.035)	1.912 ± 2.479 (0.7959)
Zona Híbrida	20	2.881 ± 0.878 (1.000)	23.404 ± 1.588 (1.000)
Sur Cajón	12	2.062 ± 0.880 (0.995)	9.918 ± 1.063 (0.999)
Sur Costa	4	1.633 ± 0.734 (0.963)	0.540 ± 0.751 (0.478)
Sur Andes	9	-1.708 ± 0.898 (0.024)	0.987 ± 1.341 (0.681)
TODOS	98	2.326 ± 0.887 (0.992)	4.817 ± 4.608 (0.885)

Tablas 10: Valores de las pruebas de neutralidad para el citocromo b: Tajima 's D (Tajima, 1989) y Fu's Fs (Fu, 1996) para las razas cromosómicas de *Liolaemus monticola*. Valores de P entre paréntesis, y en negrita valores significativos.

Raza	n	D	Fs
NORTE	33	-1.612 ± 0.884 (0.028)	-3.011 ± 3.223 (0.201)
ZH	20	2.881 ± 0.879 (0.999)	23.404 ± 1.608 (1.000)
SUR	27	0.454 ± 0.879 (0.742)	6.626 ± 2.113 (0.984)

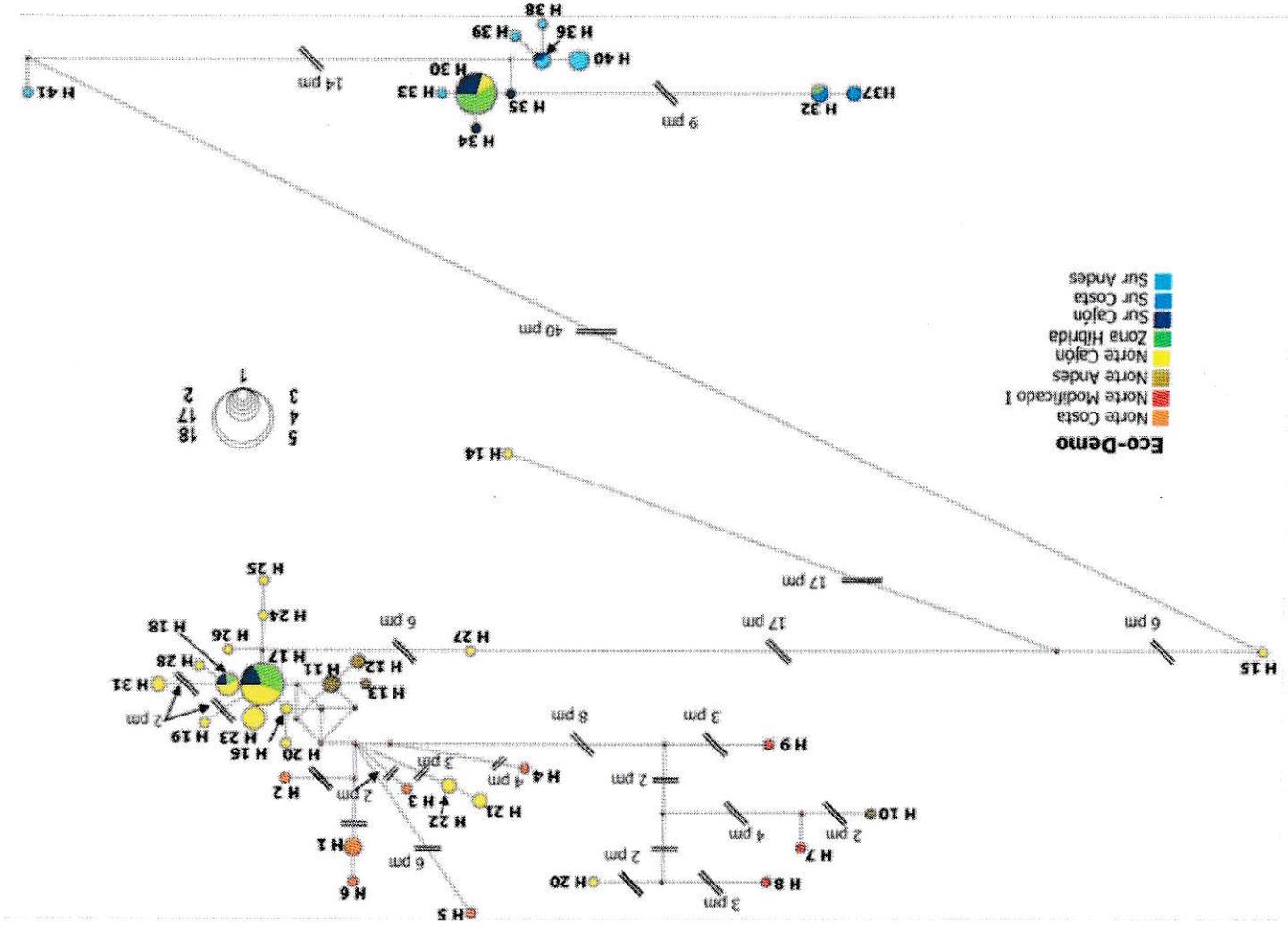


Figura 10: Arbol de mínima expansión de haplotipos del gen mitocondrial *ct-b* para los distritos eco-demos formados en *L. monticola*. El tamaño de los haplotipos es aproximadamente proporcional a sus frecuencias. Norte Costa, Norte Cajón, Norte Andes y Sur Andes individuos que pertenecen a la raza Norte (Zn=38-40); Norte Modificado I a la raza que lleva el mismo nombre; Sur Cajón, Sur Costa y Sur Andes individuos que forman parte de la raza Sur (Zn=36). Zona Híbrida, individuos que resultan en el contacto secundario entre las razas Sur (Zn=36) y Norte (Zn=38-40).

Tablas 11: Valores de *Fst* obtenidos de la comparación de pares de haplotipos del gen citocromo b entre los eco-demos de *Liolaemus monticola* (bajo la diagonal) y valores de P significativos (sobre la diagonal) para 1023 permutaciones y $\alpha = 0,05$.

	Norte Costa	Norte Mod. I	Norte Andes	Norte Cajón	Zona Híbrida	Sur Cajón	Sur Costa	Sur Andes
Norte Costa	-	0.0671	0.0909	0.1064	0.2480	0.1553	0.1988	0.1518
Norte Mod. I		-	0.0499	0.0714	0.2473	0.1304	0.1864	0.1253
Norte Andes	0.0045 ± 0.001		-	0.0925	0.2218	0.1362	0.1722	0.1323
Norte Cajón	0.0049 ± 0.001		0.0008 ± 0.000	-	0.1000	0.0470	0.1822	0.1436
Zona Híbrida	0.0012 ± 0.000	0.0285 ± 0.002	0.0001 ± 0.000	0.0035 ± 0.001	-	-0.0369	0.3262	0.2832
Sur Cajón	0.0049 ± 0.001		0.0001 ± 0.000			-	0.2463	0.1806
Sur Costa	0.0205 ± 0.002		0.0099 ± 0.001	0.0058 ± 0.001	0.0043 ± 0.001	0.0079 ± 0.001	-	0.2482
Sur Andes	0.0084 ± 0.001		0.0005 ± 0.000	0.0004 ± 0.000	0.0001 ± 0.000	0.0015 ± 0.000	0.0055 ± 0.001	-

Tablas 12: Valores de *Fst* obtenidos de la comparación de pares de haplotipos del gen citocromo b razas de *Liolaemus monticola* (bajo la diagonal) y valores de P significativos (sobre la diagonal) para 1023 permutaciones y $\alpha = 0,05$.

RAZA	NORTE	ZONA HÍBRIDA	SUR
NORTE	-	0.00000 ± 0.00000	0.00293 ± 0.0016
ZONA HÍBRIDA	0.11399	-	0.01262 ± 0.0042
SUR	0.03113	0.07425	-

Tabla 13: Análisis Espacial de Varianza Molecular (SAMOVA) realizados con secuencias del citocromo b para *Liolaemus monticola*. Componentes de la varianza: entre razas (ER); entre eco-demos dentro de una raza (EEDR); dentro de los eco-demos (DE). Destacado en negrita el mejor modelo de agrupación. En azul eco-demos Sur, verde: Zona Híbrida, rojo: eco-demos Norte y naranja: eco-demo Norte mod. 1.

Modelo de agrupación	Eco-Demo	Índices de fijación	% de variación
2	NCosta-NmodI-NAndes-NCajón ZH-SCajón-SCosta-SAndes	F_{SC}: 0.178** F_{ST}: 0.639* F_{CT}: 0.561^	ER: 56.05 EEDR: 7.87 DE: 36.13
3	NCosta-NmodI-NAndes-NCajón ZH-SCajón SCosta-SAndes	F _{SC} : 0.084^* F _{ST} : 0.614* F _{CT} : 0.578°	ER: 57.83 EEDR: 3.53 DE: 38.64
4	SCosta ZH-SCajón NCosta-NmodI-NAndes-NCajón SAndes	F _{SC} : 0.061* F _{ST} : 0.612* F _{CT} : 0.587°°	ER: 58.74 EEDR: 2.50 DE: 38.76
5	NmodI ZH-SCajón NCosta-NAndes-NCajón SAndes SCosta	F _{SC} : 0.031* F _{ST} : 0.602* F _{CT} : 0.590°°	ER: 58.95 EEDR: 1.27 DE: 39.78
6	SCosta NCosta ZH-SCajón NAndes-NCajón NmodI SAndes	F _{SC} : 0.002* F _{ST} : 0.578* F _{CT} : 0.577°*	ER: 57.70 EEDR: 0.10 DE: 42.20

*P= 0,000 ± 0,000 **P= 0,012 ± 0,000 ^P= 0,033 ± 0,000 ^*P= 0,037 ± 0,004 °P= 0,002 ± 0,000
°°P= 0,001 ± 0,000 °*P= 0,003 ± 0,000

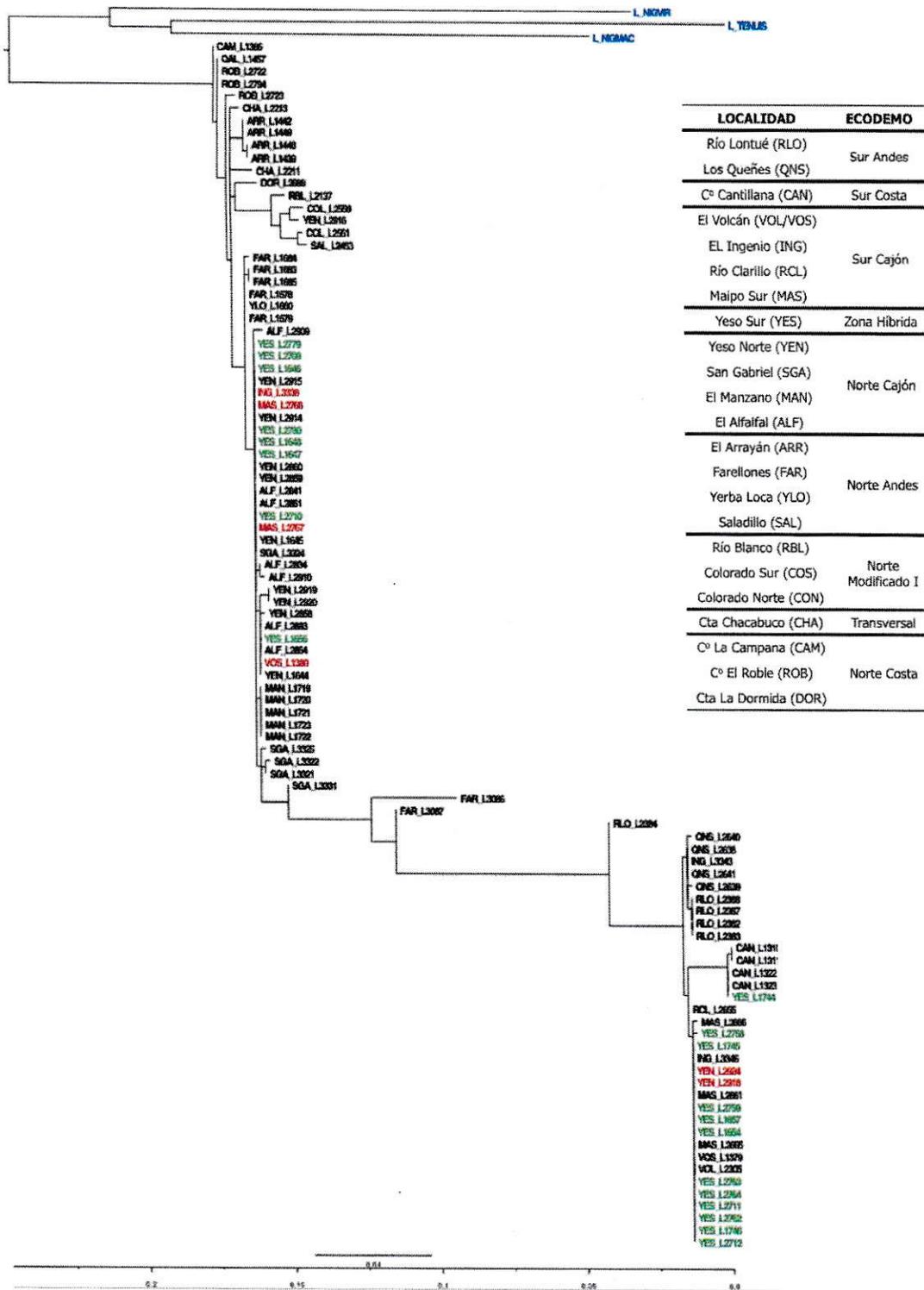


Figura 11: Reconstrucción filogenética para el gen mitocondrial *citocromo b*, utilizando *Máxima Verosimilitud*. Destacado en azul grupo externo, en verde individuos de la zona de hibridación y en rojo individuos mal ubicados de las razas cromosómicas.

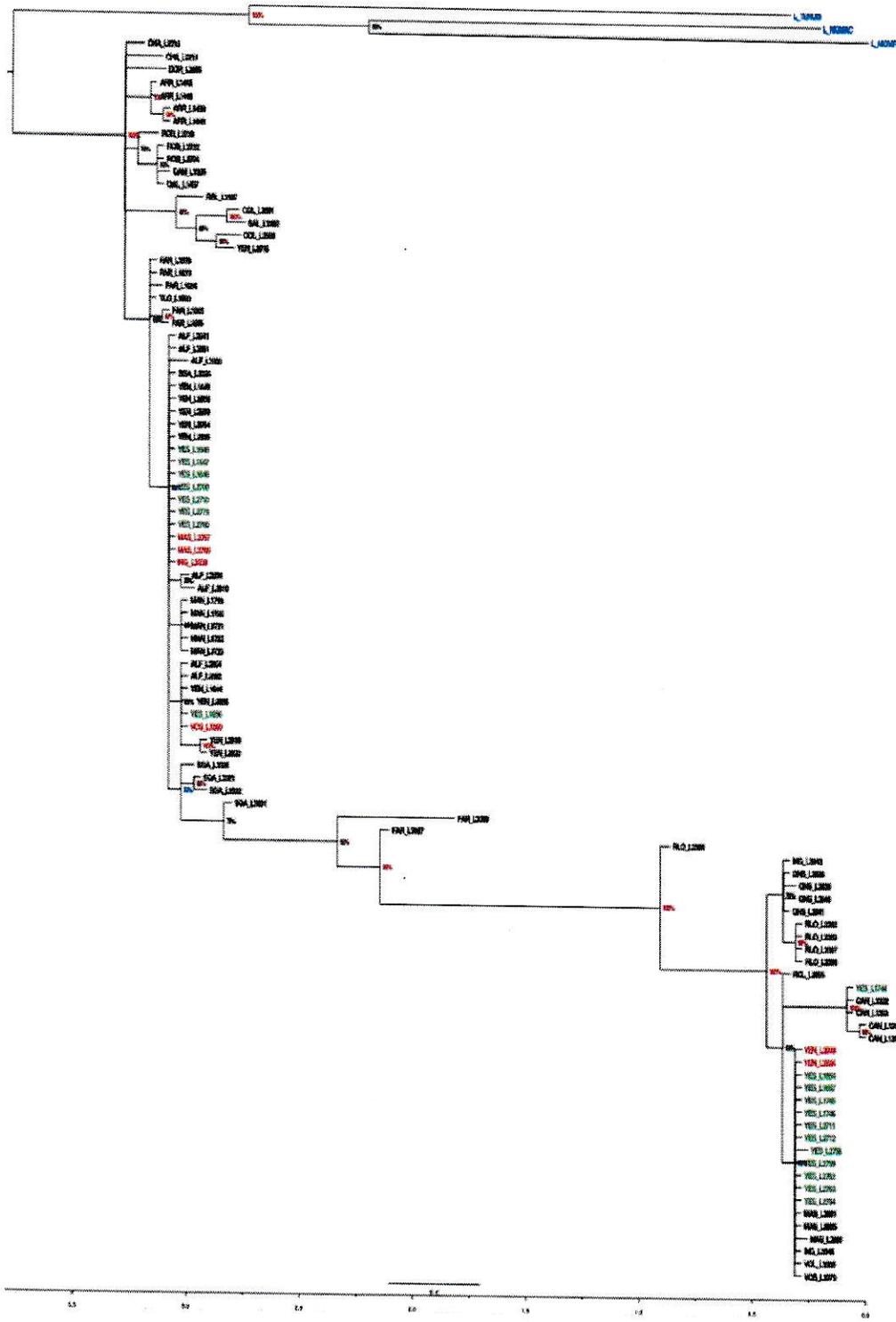


Figura 12: Reconstrucción filogenética para el gen mitocondrial *citocromo b*, utilizando inferencia Bayesiana Destacado en azul grupo externo, en verde individuos de la zona de hibridación y en rojo individuos mal ubicados de las razas cromosómicas.

Morfológicos (merísticos y morfométricos)

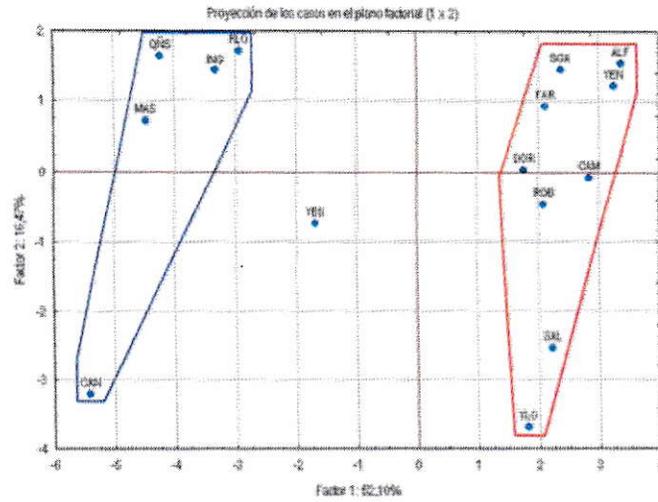
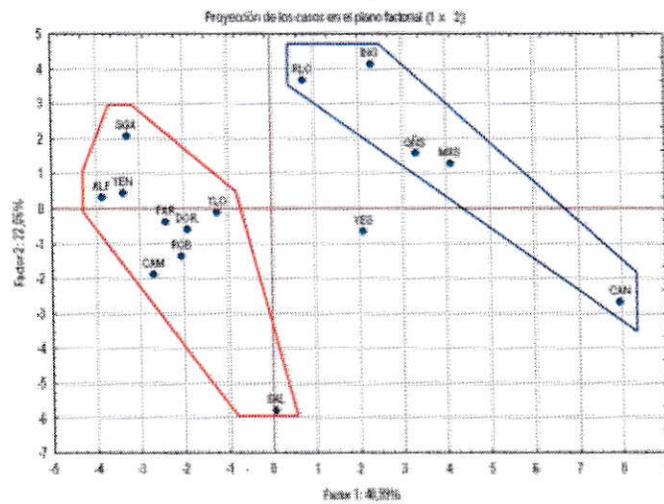
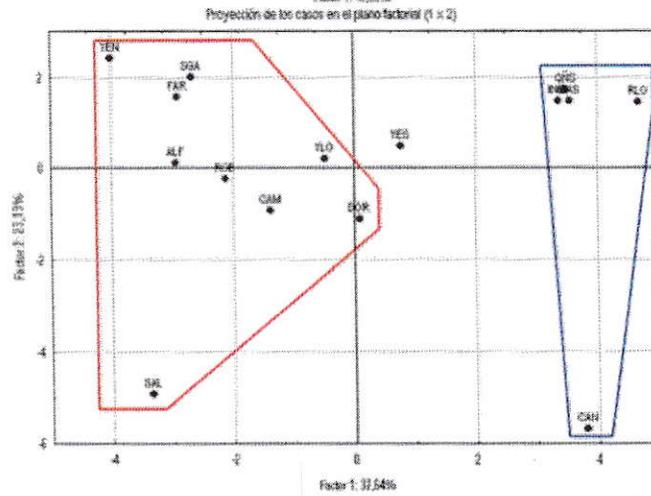
El análisis de componentes principales (ACP) para un total de 313 individuos (Tabla 15), reveló que, al emplear 20 variables que no presentaron dimorfismo, los dos primeros ejes representaron el 68.6% de la varianza total; siendo el 52.1% para el primer componente y 16.47% para el segundo (Fig. 13 A). Para aquellas variables que presentaron dimorfismo sexual: en los machos, el 63 % de la varianza total se explica por los dos primeros componentes (40.99% y 22.06% para el primero y segundo respectivamente) (Fig. 13 B); y en las hembras el 60.8% de la varianza total se explica por los dos primeros componentes (37.64% y 23.13% respectivamente) (Fig. 13 C). Los tres ACP separaron las localidades acorde a cada raza cromosómica y la Zona de Hibridación en una posición central entre las razas parentales.

Con la ordenación bidimensional a través del EMD (Stress: 0.037), empleando sólo las variables que no presentaron dimorfismo sexual, se evidenció una fuerte separación (Stress < 0.005) en dos grupos, correspondiente a las localidades de cada raza cromosómica (Norte y Sur), más la Zona de Hibridación (YES) (Fig. 14).

El Análisis de Discriminante Lineal (ADL) indica que el 89.7% de la varianza puede ser explicada en el primer eje, en el cual se puede observar la posición segregada de los individuos provenientes desde las razas y la zona híbrida (Fig. 15). La función predictora del Análisis de Discriminantes indica que existe una alta asignación de individuos a su grupo original siendo 88%, 94% y 82% de individuos bien asignados a la raza Sur, Norte y Zona Híbrida respectivamente (Fig. 16).

Tabla 14: variables morfométricas de *Liolaemus monticola* que mostraron diferencias significativas entre las localidades mediante morfometría merística. Los datos se muestran como promedios y error estándar en paréntesis. Para el significado de las variables ver materiales y métodos: morfología.

	COR	ACOR	B	SOR	SCI	TEM	CATE	MOSPA	FRON	SAF	POFR	LOR	ALASUP	1BLASUP	2ALASUP	2BLAINF	ALAINF	B	AURS	TIPS	SARO	INA	SANA	INCA	GUS	DOS	VES	SAB	FEM	DORCA	AVCO	LAMA	LARCABLA	RESCA
ROB	11,432	18,459	16,488	6,973	7,405	4,351	2,135	1,764	10,676	2,054	2,568	7,676	6,189	12,297	3,919	10,378	2,568	4,108	7,919	3,973	7,568	5,027	31,243	74,054	97,216	61,243	17,189	19,108	26,568	19,378	1,299	0,068		
	(1,094)	(1,726)	(3,271)	(0,440)	(0,498)	(0,978)	(0,347)	(0,630)	(1,415)	(0,229)	(1,463)	(1,564)	(0,701)	(1,561)	(0,433)	(1,754)	(0,555)	(1,350)	(0,547)	(0,164)	(0,603)	(0,164)	(1,801)	(3,511)	(3,973)	(2,565)	(1,647)	(1,868)	(1,214)	(1,277)	(0,104)	(0,007)		
CAM	11,846	18,769	16,692	6,923	7,769	4,462	2,077	2,692	10,385	2,000	2,615	7,154	6,231	12,154	3,769	9,692	2,462	4,538	8,077	4,077	7,615	5,077	31,077	77,000	96,308	61,923	16,385	19,077	27,462	19,615	1,279	0,067		
	(0,899)	(1,013)	(2,529)	(0,277)	(0,599)	(0,519)	(0,277)	(0,947)	(1,044)	(0,000)	(0,870)	(0,376)	(0,439)	(1,214)	(0,439)	(0,947)	(0,680)	(1,050)	(0,494)	(0,277)	(0,506)	(0,277)	(1,256)	(3,028)	(3,199)	(2,691)	(1,193)	(1,188)	(1,127)	(1,044)	(0,061)	0,005		
DOR	11,138	18,818	15,909	7,000	8,045	5,364	2,182	2,227	10,273	2,000	2,409	8,273	5,727	12,909	3,545	11,000	2,273	3,909	8,000	4,273	7,682	5,000	31,227	78,591	100,727	60,136	15,182	20,636	26,682	19,045	1,257	0,061		
	(1,082)	(2,519)	(3,322)	(0,617)	(0,899)	(1,093)	(0,501)	(0,869)	(0,935)	(0,000)	(0,666)	(1,453)	(0,631)	(2,408)	(0,510)	(2,526)	(0,767)	(1,540)	(0,000)	(0,456)	(0,568)	(0,000)	(2,287)	(3,984)	(6,348)	(2,274)	(2,771)	(1,677)	(0,945)	(1,362)	(0,108)	0,006		
SAL	11,571	18,786	15,429	6,571	7,357	7,143	2,071	2,143	11,143	2,143	2,071	11,714	5,429	15,429	3,429	13,214	2,357	5,071	8,000	4,000	7,429	4,857	29,143	74,929	99,286	58,286	18,786	19,929	25,929	19,143	1,316	0,066		
	(0,915)	(1,568)	(2,197)	(0,617)	(0,737)	(0,834)	(0,258)	(0,743)	(0,862)	(0,352)	(0,884)	(1,146)	(0,737)	(2,165)	(0,516)	(2,588)	(0,507)	(1,000)	(0,378)	(0,000)	(1,060)	(0,352)	(2,840)	(3,595)	(3,173)	(2,350)	(2,225)	(1,474)	(1,792)	(1,146)	(0,129)	0,007		
YLO	11,167	18,833	15,583	6,417	6,750	5,167	2,083	1,583	9,917	1,917	2,167	8,167	5,917	11,917	3,917	11,000	1,833	4,083	7,833	3,917	7,917	4,750	31,083	74,167	95,500	60,583	16,000	20,000	26,333	19,250	1,165	0,060		
	(1,030)	(2,082)	(2,843)	(0,900)	(1,485)	(0,835)	(0,289)	(0,900)	(1,240)	(0,289)	(0,577)	(1,528)	(0,900)	(2,275)	(0,996)	(1,706)	(0,389)	(1,165)	(0,389)	(0,289)	(0,669)	(0,452)	(1,443)	(3,973)	(5,854)	(3,118)	(1,954)	(2,523)	(2,015)	(1,960)	(0,217)	0,015		
FAR	11,313	19,250	16,938	7,000	7,500	4,813	2,000	1,938	10,625	2,000	2,313	8,125	6,188	13,000	4,313	11,250	2,000	3,563	8,000	4,000	7,500	4,750	30,500	76,813	97,000	59,625	15,938	19,563	26,053	18,563	1,281	0,066		
	(0,873)	(1,390)	(3,415)	(0,632)	(1,549)	(0,750)	(0,365)	(0,574)	(0,885)	(0,000)	(1,250)	(1,544)	(0,655)	(1,549)	(0,873)	(2,113)	(0,516)	(1,315)	(0,894)	(0,000)	(0,730)	(0,447)	(2,066)	(5,419)	(4,243)	(1,928)	(1,948)	(1,209)	(1,482)	(2,032)	(0,132)	0,007		
ALF	11,519	19,407	16,481	7,259	7,630	5,185	2,000	1,963	11,111	2,037	1,926	7,778	6,111	12,704	4,000	10,741	2,037	3,074	7,741	4,037	7,370	4,926	30,165	76,926	96,704	60,481	14,704	18,704	25,407	18,556	1,313	0,071		
	(1,087)	(1,647)	(2,343)	(0,526)	(0,926)	(1,075)	(0,000)	(0,808)	(1,502)	(0,192)	(0,550)	(1,396)	(0,641)	(1,918)	(0,480)	(1,583)	(0,587)	(1,072)	(0,813)	(0,338)	(0,792)	(0,385)	(2,661)	(4,976)	(4,268)	(2,940)	(1,815)	(1,636)	(1,279)	(1,188)	(0,107)	0,008		
SGA	10,929	18,071	15,000	7,000	7,357	4,571	2,071	1,857	11,143	2,000	1,643	7,500	5,929	12,071	3,929	10,714	2,071	2,929	7,857	4,071	7,857	4,929	29,286	74,214	94,214	58,714	14,071	20,429	25,786	17,929	1,143	0,057		
	(0,829)	(1,207)	(2,572)	(0,392)	(1,008)	(0,646)	(0,267)	(0,535)	(1,351)	(0,000)	(0,745)	(0,855)	(0,475)	(0,730)	(0,267)	(2,525)	(0,475)	(1,207)	(0,949)	(0,267)	(0,663)	(0,267)	(1,383)	(4,246)	(4,061)	(1,684)	(1,492)	(1,697)	(1,424)	(1,492)	(0,137)	0,010		
YEN	11,130	18,391	14,913	7,304	7,304	4,609	2,043	1,913	11,000	2,000	1,870	8,391	5,913	12,739	3,739	10,435	2,043	3,957	7,896	4,000	8,087	5,043	29,043	76,435	93,783	58,783	14,870	19,000	25,304	18,304	1,252	0,066		
	(1,517)	(1,207)	(2,572)	(0,392)	(1,008)	(0,646)	(0,267)	(0,535)	(1,351)	(0,000)	(0,745)	(0,855)	(0,475)	(0,730)	(0,267)	(2,525)	(0,475)	(1,207)	(0,949)	(0,267)	(0,663)	(0,267)	(1,383)	(4,246)	(4,061)	(1,684)	(1,492)	(1,697)	(1,424)	(1,492)	(0,137)	0,010		
YES	11,444	18,422	16,222	6,711	7,133	5,067	2,400	1,311	9,667	2,156	2,711	8,733	5,667	12,933	3,778	11,333	2,333	3,933	8,267	4,067	7,800	4,956	31,711	80,533	99,644	63,800	16,356	20,911	26,467	18,422	1,238	0,060		
	(1,271)	(1,983)	(3,169)	(0,895)	(0,786)	(1,355)	(0,495)	(0,733)	(1,651)	(0,367)	(1,121)	(1,789)	(0,977)	(1,776)	(0,599)	(2,286)	(0,640)	(1,232)	(0,654)	(0,252)	(0,548)	(0,424)	(3,050)	(3,703)	(4,190)	(2,573)	(2,227)	(1,678)	(1,325)	(1,454)	(0,104)	0,006		
MAS	10,478	17,565	15,478	6,696	7,174	5,217	2,652	1,261	9,565	2,217	3,391	8,739	5,739	13,478	3,739	12,261	2,043	3,478	8,087	3,913	7,522	4,435	31,000	82,783	101,043	64,348	14,739	22,870	26,696	19,043	1,167	0,051		
	(1,702)	(2,107)	(3,383)	(0,559)	(0,717)	(1,242)	(0,573)	(0,619)	(1,237)	(0,422)	(1,588)	(1,936)	(0,619)	(2,794)	(0,449)	(3,264)	(0,562)	(1,275)	(0,848)	(0,417)	(0,846)	(0,843)	(2,174)	(3,044)	(5,423)	(3,113)	(2,359)	(1,576)	(1,769)	(1,331)	(0,116)	0,005		
ING	11,222	18,556	16,222	6,889	7,222	5,000	2,667	1,111	9,222	2,222	2,333	8,000	5,444	11,778	3,889	10,556	2,000	3,222	7,556	4,000	7,444	4,556	30,111	81,667	97,333	66,222	14,444	22,000	27,667	18,333	1,128	0,053		
	(0,972)	(1,130)	(3,073)	(0,333)	(0,441)	(0,000)	(0,707)	(0,333)	(0,833)	(0,441)	(0,707)	(0,707)	(0,726)	(1,481)	(0,333)	(0,527)	(0,000)	(1,093)	(0,726)	(0,000)	(0,527)	(0,726)	(1,453)	(3,082)	(2,449)	(2,279)	(1,130)	(3,464)	(0,500)	(1,225)	(0,146)	0,013		
CAN	9,929	17,429	15,929	6,786	6,714	6,857	2,643	1,500	9,857	2,143	2,857	10,857	4,857	14,000	3,857	14,786	2,143	4,714	8,071	4,000	7,714	4,929	33,000	87,071	105,857	67,429	18,429	21,929	28,571	19,929	1,176	0,054		
	(1,269)	(1,342)	(2,200)	(0,699)	(0,499)	(0,535)	(0,633)	(0,855)	(1,351)	(0,363)	(1,562)	(1,099)	(1,027)	(1,617)	(0,770)	(2,392)	(0,383)	(0,825)	(0,267)	(0,000)	(0,611)	(0,267)	(2,219)	(3,385)	(2,476)	(2,821)	(1,950)	(2,269)	(1,158)	(1,685)	(0,129)	0,007		
QNS	10,361	17,250	15,028	6,778	7,611	4,611	2,639	1,056	9,556	2,139	3,056	7,556	5,806	12,028	4,222	10,500	1,667	3,389	8,250	4,056	7,861	4,639	32,111	82,833	101,806	66,444	14,833	20,972	27,472	19,861	1,248	0,060		
	(0,931)	(1,442)	(2,372)	(0,681)	(0,786)	(0,994)	(0,762)	(0,232)	(1,362)	(0,351)	(1,194)	(1,297)	(0,577)	(1,765)	(0,540)	(2,007)	(0,717)	(1,358)	(0,500)	(0,232)	(0,593)	(0,593)	(3,437)	(2,962)	(3,311)	(2,335)	(2,547)	(1,540)	(1,207)	(1,417)	(0,098)	0,006		
RLO	11,429	18,571	15,571	7,000	6,714	5,000	2,714	1,143	9,857	2,143	2,857	7,286	5,571	11,714	3,857	10,571	7,857	4,143	7,857	4,571	31,143	81,429	101,286	65,143	15,143	21,143	27,286	18,857	1,219	0,058				
	(1,272)	(2,225)	(3,047)	(0,577)	(0,488)	(0,816)	(0,488)	(0,378)	(1,345)	(0,378)	(0,900)	(0,488)	(0,787)	(1,496)	(0,690)	(1,414)	(0,787)	(1,618)	(0,378)	(0,378)	(0,900)	(0,787)	(1,215)	(5,381)	(3,638)	(4,259)	(1,574)	(2,035)	(1,704)	(1,952)	(0,117)	0,010		

A**B****C**

Figuras 13 A, B y C: Resultado del Análisis de Componentes Principales para A) todas las variables que no presentaron dimorfismo sexual y para aquellas que si presentaron B) en machos y C) hembras. Cuadros en **rojo**: localidades de la Raza Norte (2n=38-40), en **azul**: localidades de la Raza Sur (2n=34) de *L. monticola*.

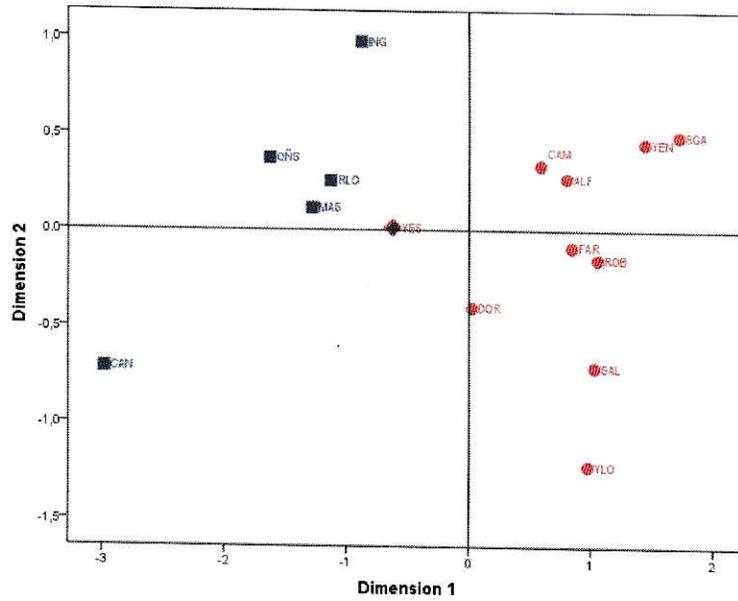


Figura 14: Ordenación bi-dimensional para las localidades de *Lioleamus monticola* utilizando Escalamiento Multidimensional. Cuadros **azules**: localidades de la Raza Sur ($2n=34$); Círculos **rojos**: localidades de la Raza Norte ($2n=38-40$). Rombo **azul-rojo**: YES= Zona de Hibridación.

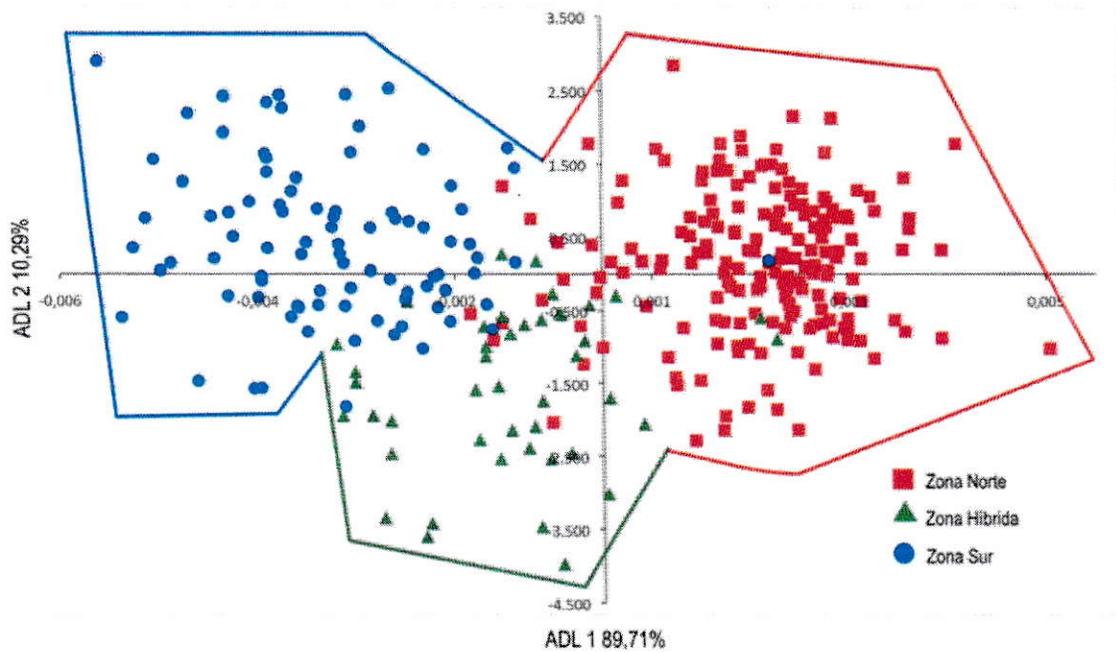


Figura 15: Análisis Discriminante Lineal (ADL) para todas las variables morfológicas merísticas de *Liolaemus monticola* por individuo utilizadas en este estudio.

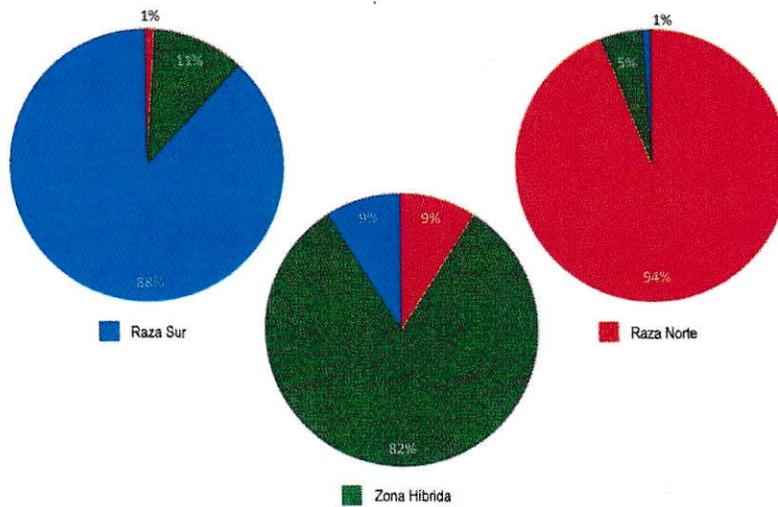


Figura 16: Porcentaje de los individuos bien y mal correspondidos por el ADL.

DISCUSIÓN

Esta tesis, al tomar los beneficios de cada marcador, da una visión más global de los diferentes niveles de variabilidad dentro y entre las razas y/o eco-demos, al incluir, por una parte nuevos individuos, nuevas localidades, agrupaciones por eco-demos y la zona de hibridación interracial. A esto, debemos sumar un vasto número de individuos con nuevas mutaciones cromosómicas, con nuevas mutaciones genéticas, otros con haplotipos únicos de citocromo b y rasgos fenotípicos únicos.

Patrones de variabilidad: Una visión multidisciplinaria

La variabilidad en términos generales, se da por la hibridación entre citotipos diferentes, por la recombinación e introgresión. Todo este conjunto da cuenta de una gran variabilidad cromosómica y genética encontrada en esta especie que a continuación se detallan.

Variabilidad Cromosómica

Los resultados cromosómicos, concuerdan con las caracterizaciones previas para las razas Sur ($2n= 34$), Norte ($2n= 38$ a 40), la zona de hibridación interracial y la raza Norte mod. 1 ($2n=38-40$). Sin embargo, las desviaciones a las fórmulas cariotípicas presentadas en las razas Sur que daría origen a la Raza Norte y la Norte mod. 1, más la zona híbrida, implicarían en primer lugar hibridación entre citotipos por introgresión cromosómica entre diversos individuos, luego expansión y, posteriormente una eventual fijación.

Además esta variabilidad cromosómica estaría dada por el origen de nuevas mutaciones. Así por ejemplo, para la raza Sur $2n=34$, el individuo L3342 de El Ingenio, resultó ser mosaico para una fisión del par 2, detectada tanto a nivel mitótico como meiótico, hecho que evidenciaría el origen de una nueva mutación, similar a la analizada por Lamborot, 1991 en un individuo de El Volcán (Raza Sur, Cajón del Maipo); en tanto, el individuo L2768 de Maipo Sur, resultó ser híbrido cromosómico, con cromosomas introgresados a partir de un citotipo "raza Norte" o producto de una migración desde la zona de hibridación.

Para la raza Norte, el individuo L3322 de San Gabriel, es híbrido interracial producto de introgresión cromosómica de un individuo probablemente de la raza Sur hacia la rivera norte del Río Maipo. A este ejemplo se sumarían tres individuos más, reportados por Lamborot en 1991., no incluidos en esta tesis. El individuo L2083 de Cuesta Chacabuco, Cordón Trasversal, presentaría introgresión de un cromosoma del par 6, desde la raza Norte mod. 1, descrito en Lamborot y col. (2012). Estas situaciones contribuyen, por una parte, al incremento novedades cromosómicas que reflejan un incremento de la tasa mutacional cromosómica y de la recombinación. Ejemplo de incremento en la tasa de mutación cromosómica tanto en poblaciones naturales híbridas como en híbridos experimentales se da en *Drosophila* (Naviera y Fontdevila 1985).

Patrones de especiación cromosómica

El complejo *Liolaemus monticola* en Chile, ha sido comparado en muchos aspectos con el complejo *Sceloporus grammicus* en México (Lamborot 1993; Sites y Reed, 1994), puesto que ambos exhiben fenómenos muy similares a niveles jerárquicos equivalentes, es decir, mantenimiento de polimorfismos dentro de razas cromosómicas, zonas híbridas parapátricas entre las razas, etc. (Sites y Reed, 1994, Vásquez et al 2007). Estos aspectos permiten reconocerlas como modelos de especiación cromosómica.

El patrón de variación cromosómica clinal de *L. monticola* es, en varios aspectos, comparable con tres modelos de especiación cromosómica: i) "modelo de especiación en cascada de Hall" en *Sceloporus* (Hall, 1973, 1980, 1983), ii) "proceso en cadena" de White (White 1978 a y b) o iii) "el modelo de alopatria cromosómica primaria" (King 1981, en Lamborot, 1993).

Un punto interesante en relación a los modelos de especiación cromosómica, es la estimación de las aneuploidías en machos. Ambas razas de *L. monticola* presentan tasas normales de aneuploidías, sin embargo, esta se incrementa en grados variables según los citotipos recombinantes de la zona de hibridación (Lamborot 1991, 1993), fenómeno que indicaría que es evidente que han logrado traspasar la barrera al flujo de genes (ver resultados de marcadores nucleares). El origen de una mutación cromosómica para *L. monticola* sería de origen espontáneo, la cual puede pasar a la población como heterocigoto, para luego tener la posibilidad de fijarse o no dentro de la población (Lamborot 1991) con un efecto tanto sobre el fitness de los híbridos heterocigóticos (Lamborot 1993) así como sobre la introgresión interracial, los cuales aumentarían la variabilidad inter-cromosómica mediante la recombinación, conservando las secuencias de genes relativamente bien adaptados a un nuevo entorno (Lamborot 1991).

Variabilidad en loci Aloenzimáticos y de AFLP

Un escenario diferente es lo planteado por los marcadores moleculares nucleares. Las dos razas se distinguen muy bien por los cromosomas, sin embargo a nivel de loci aloenzimáticos y de AFLP, el gran flujo génico entre razas hace imposible sus distinciones. La gran introgresión sería un indicativo que los híbridos son sexualmente compatibles con otros *L. monticola*, a pesar de la baja a moderada fertilidad que tendrían algunas combinaciones cromosómicas estimadas por el grado de aneuploidía, Lamborot (1991 y 1993), por lo que bastaría con sólo un bajo número de individuos machos viables para ser posible el flujo de alelos (introgresión) de una zona a otra.

Vásquez y colaboradores en el 2007, analizaron cuatro razas cromosómicas de *Liolaemus monticola*, incluyendo a las razas parentales de esta tesis, y descubrieron estructuración entre razas y, a su vez, alelos propios. Lo destacable de estos resultados es que, al ser comparados con los obtenidos en esta tesis difieren en el reconocimiento y separación de las razas parentales, debido a que el trabajo de Vásquez y col. (2007) no incluyeron localidades del Cajón del Maipo, lo que pone de manifiesto una mayor cantidad de mutaciones aloenzimáticos, para dicha zona.

Es así como resalta la gran cantidad de alelos aloenzimáticos nuevos y únicos en la ZH y localidades aledañas al Cajón del Maipo. Dichos alelos de origen mutacional o "*hybridzymes*" (Woodruff, 1989) incrementan la variabilidad genética y son útiles para evaluar cuán divergentes son los parentales. Este aspecto se documenta en Vásquez y col. (2007) para la raza Norte mod. 1, considerada por Lamborot y col. (2012) como una zona de hibridación secundaria, la cual es cromosómica, genética y geográficamente intermedia entre las razas Norte y Múltiple Fisiones, (Lamborot 1998).

Lo interesante de los marcadores *AFLP* radica en el alto número de loci analizables en estudios poblacionales capaces de detectar zonas híbridas (Berlsford y col 2011; Muñoz y col 2012; Kunte y col. 2012; Placyk y col 2012). Sin embargo, en esta tesis no lograron identificar a cabalidad a las razas cromosómicas en cuestión, tan sólo demostraron tendencias a agrupaciones (figuras 9 B) lo que podría ser interpretado como una importante introgresión de genes entre ambas razas, debido a un alto flujo de machos entre ambas razas; o dado a el bajo número de individuos y el alto número de loci detectados, no se podría determinar una real estructuración interracial.

En suma, estos marcadores nucleares entregaron datos convincentes de que las razas cromosómicas de *Liolaemus monticola*: i) no mantienen una estructuración poblacional clara, ii) la mayor variabilidad se concentraría entre las localidades aledañas a la zona de hibridación, y iii) la ausencia de estructuración se debería al flujo génico que mantienen los eco-demos de ambas razas a pesar de los ríos que hoy visualizamos.

Variabilidad para el gen mitocondrial: Citocromo b

La confirmación de la separación entre las razas Sur ($2n=34$) y Norte ($2n=38-40$) por más de cuarenta pasos mutacionales, es un aspecto que se contrasta por una parte con la presencia de haplotipos compartidos, y por otra con la gran cantidad de mutaciones acumuladas en algunos individuos, desde la última o penúltima glaciación, en el marco de los posibles eventos de expansión y contracción poblacionales.

Las reconstrucciones filogenéticas son coincidentes para las inferencias Bayesiana y Máxima Verosimilitud, Figuras 7 y 8, ponen de manifiesto la existencia de una introgresión bidireccional y asimétrica, con una mayor contribución de individuos provenientes desde la ribera sur hacia la ribera norte que desde la norte a la del sur. Dichos individuos se destacan por ADN_{mt} no concordantes a su estatus cromosómico, y de provenir de localidades próximas a la zona de hibridación en EL Cajón del Maipo. La introgresión de ADN_{mt} entre las razas Sur ($2n=34$) y Norte ($2n=38-40$), se dio a conocer por primera vez en Torres-Pérez y col. (2007) basado en una pequeña muestra de sólo dos a tres individuos elegidos por localidad y cariotipo.

Una explicación posible de cómo el ADN_{mt} explica patrones de introgresión en el eco-demo o raza, estaría mediada por el paso de hembras con una mutación favorable que surgió en una ladera, se eleva en frecuencia y luego, se traslada a la otra ladera a través de la Zona Híbrida. Estas mutaciones serán detectables en los miembros de una raza tengan dos formas muy divergentes de ADN_{mt} (Plotner y col., 2008). Cuando el reemplazo es completo, no hay ejemplos sobrevivientes para revelar la presencia de introgresión mitocondrial (Irwin y col., 2009).

Los numerosos pasos mutacionales que separan las razas Norte y Sur de *L. monticola*, también se han reportado para la herpetofauna del cono Sur de Sudamérica con ejemplos tales como *Liolaemus pictus* (Vidal y col. 2012), *Liolaemus gracilis* y *Liolaemus bibronii* (Olave y col. 2011) y en *Philodryas*, (Sallaberry-Pincheira y col. 2011). Morando y col. en 2004, encontraron introgresión entre especies estrechamente relacionadas como *Liolaemus darwinii* y *L. laurenti* en el sur de la Argentina.

La literatura hace mención que por regla general, el ADN_{mt} introgressa de manera más fácil y más frecuente que los loci nucleares después de una expansión del rango de distribución (ver Currat y col. 2008).

Variación Morfológica

Una gran sorpresa se encontró entre la variación de los caracteres morfológicos, independiente del alcance estadístico utilizado, si bien son congruentes con trabajos anteriores (Lambrot y Eaton 1992, 1997; Lambrot et al 2003), revelan y avalan la separación de las razas cromosómicas y el reconocimiento de los individuos pertenecientes a la ZH, pese a que la literatura hace mención de que la detección de los híbridos que utilizan caracteres morfológicos generalmente asumen que los individuos híbridos serán fenotípicamente intermedios a los individuos parentales (Smith 1992). Un fenómeno destacable al usar este marcador es la subestructuración que existe entre algunas localidades de cada raza cromosómica. Es así como la localidad de Cantillana, perteneciente al eco-demo Sur, se separa del resto de las localidades del Sur, esto podría deberse tanto a las diferencias cromosómicas como genéticas acumuladas, logrando así una adaptación al entorno circunscrito.

Congruencia e Incongruencias entre marcadores

Las razas cromosómicas, presentan una distribución geográfica, bastante acotada por los ríos Maipo y Aconcagua, así como la Zona de Hibridación entre la ladera Sur del río Maipo, salvo los híbridos cromosómicos o mutantes. En general, existe una tendencia de un 14.3% de no concordancia con ADN_{mt}, interpretado como individuos que, cromosómicamente presentan rearrreglos de una raza pero un ADN_{mt} de la otra; situación similar propuesta en razas cromosómicas de ratones (Boissinot y Boursot 1997), evidencia de que los rearrreglos cromosómicos estarían fuertemente seleccionados y los genes en un menor grado.

Tanto las variaciones en loci aloenzimáticos así como de *AFLP*, y ADN_{mt} evidencian que la zona de hibridación e híbridos aledaños al Cajón del Maipo serían un puente entre estas dos razas cromosómicas, puesto que esta mantendría los acervos de ambas razas parentales y permitiría el libre flujo genético entre ellas revelando una importante introgresión bidireccional.

Al comparar las localidades más australes de la raza Sur como Los Queñes, Río Lontué y Siete Tazas, distantes a más de 200 Km. de los sitios próximos al Cajón del Maipo, siguen manteniendo similares características cromosómicas y morfológicas sugerentes que la distribución geográfica desde el Río Maipo hacia el sur es probablemente más continua, a pesar del hecho de que actualmente varios ríos importantes separan estas localidades, hecho coincidente que se respalda de manera robusta en esta tesis.

La vasta documentación sobre las razas cromosómicas de *L. monticola*, y los resultados obtenidos en esta tesis, permitieron encontrar congruencia entre algunos marcadores. Es así como los polimorfismos cromosómicos, las secuencias de ADN_{mt} y los caracteres morfológicos y merísticos, i) separan las razas cromosómicas Norte ($2n=38-40$) y Sur ($2n=34$), como también reconocer la zona de hibridación descrita para dichas razas, ii) introgresión en todos los marcadores, iii) la introgresión cromosómica y genética serían bidireccionales y asimétricas, destacando la importancia de la zona de hibridación como nexo entre las dos razas cromosómicas, y iv) la zona de hibridación parece ser más extensa de lo que se tenía documentado.

Una discordancia entre algunos de los cinco marcadores independientes en esta tesis, implica la falta de un desarrollo completo de aislamiento reproductivo con evidencia de introgresión de cromosomas y de genes, lo que hace difícil definir los límites exactos del rango para una o más especies nuevas dentro de la actual distribución de *L. monticola*. Esto añade una nueva disyuntiva en elevar de categoría a esta especie de lagarto; en contraposición a lo sugerido en Torres-Pérez y col. (2007), ya que el argumento expuesto por los autores se basa en el análisis de unos pocos individuos de localidades aledañas a la zona de hibridación, sin tomar en cuenta la complejidad del conjunto de razas cromosómicas de esta especie.

Los ríos Maipo y Yeso como barreras al flujo génico

El Río Maipo y su afluente el Río Yeso han sido considerados como excelentes barreras al flujo de marcadores cromosómicos mitocondriales y morfológicos, los que limitarían la expansión y recolonización de algunas localidades parapátricas (Lamborot y Eaton 1992, 1997, Lamborot 1991), a excepción de la localidad de Yeso Sur que resulta ser un punto crucial para el flujo genético desde la ladera sur del río Maipo hacia el norte de este y viceversa.

Sin embargo, a la luz de los presentes resultados, estos ríos no funcionarían como barreras perfectas, ya que el grado de la barrera varía según el marcador. Así, en esta tesis, es posible reconocer que son excelentes barreras al flujo cromosómico, con excepciones de la ZH y localidades aledañas, sólo parciales al flujo mitocondrial y caracteres morfológicos, pero barreras débiles para alelos aloenzimáticos y loci de *AFLP* utilizados.

Los datos geológicos para la zona de Cajón del Maipo indican que las glaciaciones del Pleistoceno se han desarrollado a lo menos tres o cuatro eventos diferentes, en los que las "lenguas" glaciares desde los Andes alcanzaron los valles centrales (Brüggen, 1950). Aunque hay algunas discrepancias en la datación de las lenguas glaciares en Chile central, el desarrollo de estas lenguas podrían haber actuado como barreras e interrumpido el flujo génico entre los eco-demos Norte y Sur, antes del origen de los ríos. Es por ello que la ZH podría haber cambiado dramáticamente con los factores históricos y geográficos (Lamborot 1991), permitiendo, en algunas instancias, a las razas estar separadas alopátricamente y en otras de manera parapátricamente por los ríos Maipo y Yeso.

CONCLUSIONES

- 1.- Análisis cromosómicos y morfológicos son bastante claros para mostrar la presencia de una estructuración geográfica, con la presencia de razas y una zona híbrida en un inicio circunscrita a una zona.
- 2.- Análisis del ADN_{mt} muestran la presencia de las dos razas genéticamente muy diferentes, existiendo en la zona híbrida individuos con haplotipos de cada región. De forma interesante, algunos individuos de las zonas donde están las razas tienen haplotipos típicos de la otra raza lo que indica un posible efecto de migrantes e hibridación en esa zona.
- 3.- Los análisis morfológicos muestran diferencias claras entre las razas cromosómicas y también con los híbridos, los cuales poseen formas intermedias. Esto refuerza la idea de las razas delineadas genéticamente con una zona híbrida.
- 4.- Los análisis realizados con marcadores nucleares (aloenzimas y *AFLP*) no muestran una segregación tan clara de las razas y la zona híbrida. Si bien, los loci de *AFLP* muestran una cierta diferencia que separa la raza norte con la raza sur-híbrido y las aloenzimas muestran cambios en el número de alelos (intermedia en la zona híbrida) y en las heterocigocidades (aumento del H_e) no es posible establecer claramente los grupos.
- 5.- A la luz de los resultados es posible indicar que las razas cromosómicas existen, la zona híbrida es geográficamente delineada y que es posible la existencia de introgresión posiblemente facilitada por la migración de machos.

REFERENCIAS

- Aljanabi, S.M. y Martínez, I. 1997.** Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nuc. Ac. Res.* 25, 4692–4693.
- Allendorf, F.W. Leary, R.F., Spruell, P. y Wenburg, J.K. 2001.** The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* Vol.16 No.11.
- Anderson, E. 1949.** *Introgressive Hybridization*. John Wiley and Sons: New York.
- Ankel-Simons, F. y Cummins, J.M. 1996.** Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 13859-13863.
- Arnold, M.L. 1992.** Natural hybridization as an evolutionary process. *Ann Rev EcolSyst*23:237–261.
- Arnold, M.L. 1997.** *Natural hybridization and evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Arnold, M. 2004.** Transfer and origin of adaptations through natural hybridization: Were Anderson and Stebbins right?. *Plant Cell* 2004;16;562-570
- Astete, P. 2011.** Estudio comparativo de los patrones de recombinación vía quiasmática en poblaciones de dos razas cromosómicas de *Liolaemus monticola* (Sauria: Iguanidae) y una zona de hibridación. Memoria para optar al Título de Profesor de Biología y Ciencias Naturales, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.
- Avise, J.C. 1994.** *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York
- Baker, R.J. y Bickham J.W. 1986.** Speciation by monobrachial centric fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8245–8248
- Bandelt, H.J. Forster, P. y Röhl, A. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molec. Biol Evol* 16: 37-48.
- Barton, N.H. 2001.** The role of hybridization in evolution. *Mol. Ecol.* 10, 551–568.
- Barton, N.H. y Hewitt, G.M. 1981.** The genetic-basis of hybrid inviability in the grasshopper *Podisma pedestris*. *Heredity* 47: 367–383.
- Barton, N.H. y Hewitt, G.M. 1985.** Analysis of hybrid zones. *Ann Rev Eco Syst* 16: 113–148.
- Barton, N.H. y Hewitt, G. 1989.** Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341, 497-503.
- Bazykin, A.D. 1969.** Hypothetical mechanism of speciation. *Evolution*, 23, 685–687.
- Belkhir, K. Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. y Bonhomme, F. 2004.** GENETIX 4.03, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Berlsford, A., Milá, B. y Irwin, D. 2011.** Hybrid origin of Audubon's warbler. *Mol Ecol.* 20, 2380–2389
- Boissinot, S. y Boursot, P. 1997.** Discordant Phylogeographic Patterns Between the Y Chromosome and Mitochondrial DNA in the House Mouse: Selection on the Y Chromosome? *Genetics* 146 1019-1034

- Brüggen, J. 1950.** Fundamentos de la Geología de Chile. Ins. Geográfico Militar, Santiago, Chile.
- Bush, G.L., Case, S.M., Wilson, A.C. 1977.** Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 74: 3942–3946.
- Capanna, E., A. Gropp, H. Winking, G. Noack, y Civitelli M.V. 1976.** Robertsonian metacentrics in the mouse. Chromosoma 58: 341-353.
- Carr, S.M. y col. 1986.** Mitochondrial DNA analysis of hybridization between sympatric white-tailed deer and mule deer in west Texas. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 9576–9580
- Carson, H.L., Clayton, J., F.E. y Stalker, H.D.1967.** Karyotypic stability and speciation in hawaiian *Drosophila* PNAS, vol. 57 no. 5 1280-1285
- Cei, J.M. 1986.** Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. Mus. reg. Sci. nat. Torino Monogr. 4: 527 pp.
- Cei, J.M. 1993.** Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina. Mus. reg. Sci. nat. Torino, Monogr. 14: 949 pp.
- Coyne, J.A. y Orr, H.A. 2004.** Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 545 pp.
- Currat, M. Ruedi, M., Petit, R.J. y Excoffier, L. 2008.** The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. Evolution 62: 1908–1920.
- De Queiroz, K. 1998.** The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. En D.J. Howard y S.H. Berlocher: Endless Forms: Species and speciation. Pg: 57-75. Oxford University Press. New York.
- De Queiroz, K. 2005.** Different species problems and their resolution. Bioessays 27: 1263–1269.
- Dobzhansky, T. 1937.** Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press. New York.
- Donoso-Barros, R. 1966.** Reptiles de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. 606 pp.
- Dowling, T.E. y De Marais, B.D. 1993.** Evolutionary significance of introgressive hybridization in cyprinid fishes. Nature 362, 444–446
- Dowling, T.E. y Secor, C.L. 1997.** The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. Annu Rev Ecol Syst 28:5 93–619.
- Dupanloup, I. Schneider, S., Excoffier, L. 2002.** A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. Molecular Ecology 11(12): 2571-81.
- Earl, D.A. y von Holdt, B.M. 2011.** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7 Version: v0.6.8 Oct 2011.
- Endler, J. A. 1977.** Geographic variation, speciation and clines. Pp. 246. Princeton University Press, New Jersey.
- Etheridge, R. y De Queiroz, K. 1988.** A phylogeny of Iguanidae. Edición R. Estes & G. Pregill. Pp. 283–368.

- Evanno, G. Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molec. Ecol.*, 14, 2611–2620.
- Excoffier, L. y Smouse, P. 1994.** "Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony" *Genetics* 136: 343-359.
- Falush, D. Stephens, M. y Pritchard, J.K. 2007.** Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7, 574–578.
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1998.** Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético, 1ra ed. Brasilia: EMBRAPACENARGEN 1998.
- Field, D.L. Ayre, D.J., Whelan, R.J. y Young, A.G. 2010.** Patterns of hybridization and asymmetrical gene flow in hybrid zones of the rare *Eucalyptus aggregata* and common *E. rubida*. *Heredity*, 1–13
- Filatov, D.A. 2002.** ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molec. Ecol. Not.* 2, 621-624.
- Frankham, R., Ballou, J., Briscoe, D. 2004.** Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, 2º ed. United Kingdom.
- Fu, Y.X. 1996.** New statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 143: 557–570.
- Garagna, S., Marziliano, N., Zuccotti, M., Searle, J.B., Capanna, E. y Redi, C.A. 2001.** Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *PNAS* vol. 98 (1) 171–175
- Grant, V. 1981** *Plant Speciation*, Columbia University Press
- Haldane, J.B.S. 1948.** The theory of cline. *Journal of Genetics*, 48: 277-284.
- Hall, W.P. 1973.** Comparative population cytogenetics, speciation and evolution of the crevice using species of *Sceloporus* (Sauria: Iguanidae). Tesis de Doctorado, Harvard University, Cambridge, Massachusetts. 215 pp.
- Hall, W.P. 1980.** Chromosome, speciation and evolution of Mexican iguanid lizards. *Nat. Geo. Soc. Res. Rep.* 12, 309–329.
- Hall, W.P. 1983.** Mode of speciation and evolution in the sceloporine iguanid lizards. I. Epistemology of the comparative approach and introduction to the problem. In: Rhodin AGJ, Miyata K, eds. *Advances in Herpetology and Evolutionary Biology*. Cambridge, Massachusetts: Mus Comp Zool. 643-679.
- Harrison, R.G. 1990.** Hybrid zones: windows on the evolutionary process. *Oxford Surveys en Evol. Biol.* 7: 69– 128.
- Harrison, R.G. 1993.** Hybrids and hybrid zones: Historical Perspective. En: R.G. Harrison, (ed.). *Hybrid zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press.
- Harrison, R.G. 1998.** Linking evolutionary pattern and process. En D.J. Howard y S.H. Berlocher: *Endless Forms: Species and speciation*. 19-31. Oxford University Press. New York.

- Hedrick, P.W. 1981.** The establishment of chromosomal variants. *Evolution*, 35: 322-332
- Irwin, D. Rubtsov, A.S y Panov, E.N. 2009.** Mitochondrial introgression and replacement between yellowhammers (*Emberiza citrinella*) and pine buntings (*Emberiza leucocephalos*) (Aves: Passeriformes) Biol. Jour. Linn. Soc., 98, 422–438.
- Key, K.H. 1968.** The concept of stasipatric speciation. *Syst. Zoo.*, 17, 14–22.
- King, M. 1981.** Chromosome Change and speciation in lizards. In Atchley, W. and Woodruff, D. eds. *Essays on Evolution and Speciation in Honour of M.J. White*, Camb. Univ. Press, pp. 262–285.
- King, M. 1993.** *Species Evolution: the Role of Chromosome Change*. Cambridge/ New York: Cambridge University Press.
- Kolnicki, R. 2000.** Kinetochore reproduction in animal evolution: Cell biological explanation of karyotypic fission theory. *PNAS*. vol. 97, no. 17, 9493–9497
- Kunte, K., Shea, C., Aardema, M.L., Scriber, J.M., Juenger, T.E., Gilbert, L.E. y Kronforst, M.R. 2012.** Sex Chromosome Mosaicism and Hybrid Speciation among Tiger Swallowtail Butterflies. *Plos Genetics*. 7, 9: e1002274
- Lamborot, M. 1991.** Karyotypic variation among populations of *Liolaemus monticola* (Tropiduridae), separated by riverine barriers at the Andes range. *Copeia* 1991: 1044-1059.
- Lamborot, M. 1993.** Chromosomal evolution and speciation in some Chilean lizards. *Evol. Bio* 7: 133-151.
- Lamborot, M. 1998.** A new and highly polymorphic chromosomal race of *Liolaemus monticola* (Iguanidae) from the "Norte Chico" of Chile. *Chromosome Research* 6: 247-254.
- Lamborot, M. 2001.** Karyotypic polymorphism and evolution within and between the *Liolaemus monticola* (Iguanidae) "northern 2n=38-40" chromosome race populations in central Chile. *Rev Chil Hist Nat* 74: 121-138.
- Lamborot, M. 2008.** *Herpetología de Chile, Capítulo 6: Evolución cromosómica en Reptiles de Chile*. Editores: Vidal, M. y A. Labra. Sciece Verlag.
- Lamborot, M. Álvarez, E., Campos, I. y Espinoza, A. 1981.** Karyotypic characterization of three Chilean subspecies of *Liolaemus monticola*. *Jour. Hered.* 72: 328–334.
- Lamborot, M. Eaton, L. y Carrasco, B.A. 2003.** The Aconcagua River as another barrier to *Liolaemus monticola* (Sauria: Iguanidae) chromosomal races of central Chile. *Rev Chil Hist Nat* 76: 23-34.
- Lamborot, M. y Álvarez-Sarret, E. 1993.** Karyotypic variation within and between populations of *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) separated by the Maipo River in the coastal range of central Chile. *Herpetologica* 49: 435-449.
- Lamborot, M. y Eaton, L.C. 1992.** Concordance of morphological variation and chromosomal races in *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) separated by riverine barriers in the Andes. *Zeits Zool Syst Evol* 30: 189-200.

- Lamborot, M. y Eaton, L.C. 1997.** The Maipo River as a biogeographical barrier to *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) in the mountain ranges of central Chile. *J. Zoo Syst Evol Res* 35: 105-111.
- Lamborot, M. y Vásquez, M. 1998.** A triploid of *Liolaemus gravenhorsti* (Tropiduridae) in central Chile. *Journal of Herpetology* 32:617-620.
- Lamborot, M., Ossa, C.G. y Vásquez M. 2012.** Population cytogenetics of the "Northern Mod 1" chromosomal race of *Liolaemus monticola* Müller & Helmich (Iguanidae) from Central Chile. *Gayana* 76 (1).
- Lande, R. 1985.** The fixation chromosomal rearrangements in a subdivided population with local extinction and colonization. *Heredity*, 54: 323-332.
- Levene, H, 1949.** On a matching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.* 20:91-94.
- Lewis, H. 1966.** Speciation in flowering plants. *Science* 152, 167–172
- Lewontin, R. y Birch, L. 1996.** Hybridization as a source of variation for adaptation to a new environment. *Evolution* 20: 315–336.
- Lobo, F. 2001.** A phylogenetic analysis of lizards of the *Liolaemus chilensis* group (Iguania: Tropiduridae). *Herpet J.* 11, 137–150.
- Lobo, F. Espinoza, R.E. y Quinteros, S. 2010.** A critical review and systematic discussion of recent classification proposals for Liolaemidae lizards. *Zootaxa* 2549, 1–30.
- Mallet, J. 2005.** Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20, 229–237.
- Mallet, J. 2008.** Hybrid speciation. *Nature.* Vol 446:15
- Mallet, J. 2010.** Shift happens! Shifting balance and the evolution of diversity in warning colour and mimicry. *Ecol Ent.* 35: 90–104.
- Markert C. y Hunter R.L. 1957.** The distribution of esterases in mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 1959 7: 42
- Mayr, E. 1942.** Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press. New York.
- Mayr, E. 1963.** Animal Species and Evolution. Belknap Press, Cambridge, MA, 797 pp.
- Michalakis, Y. y Olivieri I. 1993.** The influence of local extinctions on the probability of fixation of chromosomal rearrangements. *J. Evol. Bio.*, 6: 153-170.
- Montaño-Pérez, K. Villalpando-Canchola, E. y Vargas-Albores, F. 2006.** AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y su aplicación en acuicultura. *Interciencia.* 31: 563-569.
- Morando, M. Avila, L.J., Baker, J. y Sites, J.W. 2004.** Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution*, 58 (4), 842–861.
- Muñoz, A.G., Baxter, S.W., Linares, M. y Jiggins, C.D. 2012.** Deep mitochondrial divergence within a *Heliconius* butterfly species is not explained by cryptic speciation or endosymbiotic bacteria. *Evolutionary Biology*, 11:358

- Navarro, A. y Barton, N. 2003.** Accumulating post zygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. *Evolution* 57: 447–459.
- Naviera, H. y Fontdevila, A. 1985.** The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. IX. High frequencies of new chromosome rearrangement induced by introgressive hybridization. *Chromosoma* 91: 87-94.
- Noor M.A., Grams, K.L, Bertucci, L.A. y Reiland, J. 2001.** Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc. Nat. Acad. Scie.* 98: 12084–12088.
- Olave, M. Martinez, L.E., Avila, L.J., Sites, J.W. y Morando, M. 2011.** Evidence of hybridization in the Argentinean lizards *Liolaemus gracilis* and *L. bibronii* (Iguania: Liolaemini): an integrative approach based on genes and morphology. *Molec. Phylo Evol.* 61(2): 381-391.
- Olden, J.D. Poff, N.L., Douglas, M.R., Douglas, M.E. y Fausch, K.D. 2004.** Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends Ecol Evol* 19:18–24.
- Orr, H.A. 1996.** Dobzhansky, Bateson and the genetics of speciation. *Genetics* 144: 1331–1335.
- Páez, E. 2010.** Variación genética aloenzimática en una zona de hibridación, entre dos razas cromosómicas de *Liolaemus monticola*. Memoria para optar al Título de Profesor de Biología y Ciencias Naturales, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.
- Palumbi, S.R. 1996.** The polymerase chain reaction. In *Molecular systematics*, 2nd edn (ed. D. M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable), pp. 205–247. Sunderland, MA: Sinauer.
- Perry, W.L. Lodge D.M. y Feder J.E. 2002.** Importance of hybridization between indigenous and non-indigenous freshwater species: An overlooked threat to North American biodiversity. *Syst Biol* 51:255–275.
- Peters, I.A. y Donoso-Barros, R. 1970.** Catalogue of Neotropical Squamata: Part II. Lizards and amphibians. *Bulletin of the United States National Museum* 297: 170-195.
- Placyk, J.S., Fitzpatrick, B.M. y Casper, G.S. 2012.** Hybridization between two gartersnake species (*Thamnophis*) of conservation concern: a threat or an important natural interaction? *Conserv Genet.* Publicación online DOI 10.1007
- Plotner, J, Uzzell T, Beerli P, Spolsky C, Ohst T, Litvinchuk SN, Guex G-D, Reyer H-U, Hotz H. 2008.** Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaearctic water frogs. *J. Evol Bio* 21: 668–681.
- Pounds, J.A. y Jackson, J.F. 1981.** Riverine barriers to gene flow and differentiation of fence lizard populations" *Evolution* 35: 516-528.
- Pritchard, J.K. Stephens M, y Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 115:945- 959.
- Rambaut, A. 2009.** FigTree versión 1.3.1. disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

- Redi, C.A. y Capanna, E. 1988.** Robertsonian heterozygotes in the house mouse and the fate of their germ cells. In: Daniel A, ed. *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan R. Liss. pp. 315-359
- Rieseberg, L. 2001.** Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Eco Evol* 16: 351-358.
- Rieseberg, L. y Wendel, J. 1993.** Introgression and its consequences in plants. In: Harrison RG ed. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press: New York, pp 70–109.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling A., Höhna, S.H., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. y Huelsenbeck, J.P. 2012.** MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 61(3): 539–542
- Rozas, J. Sanchez-Del Barrio X. y Rozas R.2003.** "DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods". *Bioinfor.* 19: 2496-2497.
- Saiki, R.K. Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. 1988.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sallaberry-Pincheira, N., Garin, C.F., González-Acuña D., Sallaberry, M.A. y Vianna, J.A. 2011.** Genetic divergence of Chilean long-tailed snake (*Philodryas chamissonis*) across latitudes: conservation threats for different lineales. *Diver Distrib*, 17, 152–162.
- Simpson, J. 1997.** Amplified fragment length polymorphisms. *B. Soc. Bot. Méx.* 60:73-76.
- Sites, J.W. y Moritz, C. 1987.** Chromosomal evolution and speciation revisited. *Syst Zoo* 36: 153-174.
- Sites, J.W. y Reed, K.M. 1994.** Chromosomal evolution, speciation, and systematics: some relevant issues. *Herpetologica* 50: 237- 249.
- Smith, G.R. 1992.** Introgression in fishes – significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates. *Syst. Biol.* 41, 41–57.
- Smithies, O. 1955.** Zone Electrophoresis in Starch Gels: Group Variations in the Serum Proteins of Normal Human Adults. *Biochem. J.* 61. 629–641.
- Soft Genetics LLC GeneMarker® Version 1.95 software**, State College, PA, USA.
- StatSoft, Inc. STATISTICA, 2004.** (data analysis software system), version 8. www.statsoft.com
- Stebbins, G.L. 1959.** The role of hybridization in evolution. *Proc Amer Philos Soc* 103: 213–251.
- Stamatakis, A.2006.** RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinf.* 22 (21): 2688–2690
- Swofford, D.L. y 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.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.

- Templeton, A.R. 1981.** Mechanisms of speciation a population genetic approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 12, 23–48
- Todd, N.B. 1970.** Karyotypic fissioning and Canid phylogeny. *J. Theor. Biol.* 26, 445–480
- Torres-Pérez, F. Lamborot, M., Boric-Bargetto, D, Hernández, C.E., Ortiz, J.C. y Palma, R.E. 2007.** Phylogeography of a mountain lizard species: an ancient fragmentation process mediated by riverine barriers in the *Liolaemus monticola* complex (Sauria: Liolaemidae). *J. Zoo. Syst Evo Res* 45: 72–81.
- Torres-Pérez, F. Méndez, M.A., Benavides, E., Moreno, R.A., Lamborot, M., Palma, R.E., Y Ortiz, J.C. 2009.** Systematics and evolutionary relationships of the mountain lizard *Liolaemus monticola* (Liolaemini): how morphological and molecular evidence contributes to reveal hidden species diversity. *Bio. J.Lin. Soc*, 96, 635–650.
- Vásquez, M. 2002.** Genética Biogeográfica de *Liolaemus monticola* (Iguanidae) en Chile central. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Genética. U. de Chile.
- Vásquez, M., Torres-Pérez, F. y Lamborot, M. 2007.** Genetic variation within and between four chromosomal races of *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) in Chile. *Herpeto. J.* 17: 149-160.
- Vidal, M. Moreno, P.I. y Poulin, E. 2012.** Genetic diversity and insular colonization of *Liolaemus pictus* (Squamata, Liolaeminae) in northwestern Patagonia. *Aust Ecol.* 37, 67–77.
- Von Müller, L. y Hellmich, Y. 1932.** Beitrag zur Kenntnis der Herpetofauna Chiles. IV. *Liolaemus monticola*, ein weiterer neuerer Rassenkreis aus den Hochanden Chiles. *Zool Anz* 99: 177-192.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Ac. Res.* 23: 4407-4414.
- White, M.J.D. 1978a.** Chain processes in chromosomal speciation. *Syst Zool* 27: 285-298.
- White, M.J.D. 1978b.** Modes of Speciation. San Francisco: WH Freeman.
- Wiens, J.J. y Penkrot, T.A. 2002.** Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (Sceloporus). *Systematic Biology* 51: 69–91.
- Woodruff, D.S. 1989.** Genetic anomalies associated with Cerion hybrid zones: the origin and maintenance of new electromorphic variants called hybridzymes. *Bio. J. Linn Soc* 36, 281–294.
- Wright, S. 1931.** Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97–159.
- Wright, S. 1978.** Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Zouros, E. y col. 1994.** Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359: 412- 414.

Anexo 1

Listado con las localidades, individuo y diagnóstico cromosómico sólo para los pares cromosómicos polimórficos de *Liolaemus monticola*. Destacado en negro individuos híbridos cromosómicos. MRI= MAS, RCL e ING; QST= QNS y STA

Localidad	Individuo	PAR 1	PAR 2	PAR 3	PAR 4	PAR 5	PAR 6	PAR 7	Localidad	Individuo	PAR 1	PAR 2	PAR 3	PAR 4	PAR 5	PAR 6	PAR 7
CAM	1381	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	CON	2620	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CAM	1382	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CON	2622	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CAM	1383	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2623	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CAM	1384	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2640	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA
CAM	1385	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2641	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CAM	1386	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CON	2642	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CAM	1387	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CON	2648	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CAM	1388	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CON	2649	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CAM	1389	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CON	2650	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CAM	1390	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2659	AA	AA	AA	BB	AA	AA	CC
CAM	1391	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2660	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CAM	1392	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2661	AA	AA	AA	BB	AA	AA	CC
DOR	2492	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2662	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA
DOR	2494	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2664	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA
DOR	2495	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2665	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA
DOR	2531	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CON	2667	AA	AA	AB	BB	AA	AA	CC
DOR	2532	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2669	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA
DOR	2534	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CON	2670	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA
DOR	2588	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CON	2671	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
DOR	2589	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CON	2672	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
DOR	2630	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CON	2673	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
DOR	2631	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	CON	2679	AA	AA	BB	BB	AA	AA	CC
DOR	2692	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	CON	2682	AA	AA	BB	BB	AA	AA	CC
DOR	2693	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	CON	387	AA	AA	BB	BB	AA	AA	CC
DOR	2695	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	REL	388	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
DOR	2696	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	REL	2137	AA	AA	AB	BB	AA	AA	CC
DOR	2700	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	REL	2138	AA	AA	BB	BB	AA	AA	CC
CHA	2078	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	REL	2139	AA	AA	BB	BB	AA	AA	CC
CHA	2079	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	REL	2445	AA	AA	AB	BB	AA	AA	CC
CHA	2080	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	REL	2446	AA	AA	AA	BB	AA	AA	CC
CHA	2081	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	SAL	2448	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CHA	2082	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	SAL	2449	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CHA	2083	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	SAL	2450	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CHA	2084	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	SAL	2452	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA
CHA	2211	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	SAL	2453	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA
CHA	2213	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	SAL	2454	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA
CON	2539	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	SAL	2455	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA
CON	2543	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	SAL	2456	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2544	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AC	SAL	2457	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2545	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AC	SAL	2458	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2546	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AC	SAL	2459	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2551	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AC	SAL	2460	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2552	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AC	SAL	2467	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2553	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AC	SAL	2468	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2554	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AC	FAR	1425	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2555	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AC	FAR	1426	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2556	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AC	FAR	1428	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2557	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AC	FAR	1438	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2613	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	FAR	1668	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2614	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	FAR	1661	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2615	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	FAR	1662	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2616	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	FAR	1663	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2617	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	FAR	1422	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA
CON	2619	AA	AA	AB	BB	AA	AA	CC	FAR	1668	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA

Continuación anexo 1

Localidad	Individuo	PAR 1	PAR 2	PAR 3	PAR 4	PAR 5	PAR 6	PAR 7	Localidad	Individuo	PAR 1	PAR 2	PAR 3	PAR 4	PAR 5	PAR 6	PAR 7
FAR	1669	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	YES	1746	AA						
FAR	1670	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	YES	2709	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA
FAR	1676	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	YES	2710	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA
FAR	1678	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	YES	2711	AA						
FAR	1679	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	YES	2712	AA						
FAR	1683	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	YES	2758	AA						
FAR	1684	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	YES	2759	AA						
FAR	1685	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	YES	2760	AA						
FAR	1686	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	YES	2762	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA
FAR	1687	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	YES	2763	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA
FAR	1439	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	YES	2764	AA						
FAR	1442	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	YES	2779	AA						
FAR	1448	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	YES	2780	AA						
FAR	1449	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	YES	2866	AA						
ALF	2840	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	MRI	2866	AA						
ALF	2841	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	MRI	2766	AA						
ALF	2846	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	MRI	2768	AA	AA	BB	AB	AA	AA	AA
ALF	2851	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	MRI	3353	AA						
ALF	2854	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	MRI	2656	AA						
ALF	2883	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	MRI	3338	AA						
ALF	2884	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	MRI	3343	AA						
ALF	2895	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	MRI	3342	AA	AB	AA	AA	AA	AA	AA
ALF	2910	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CAN	1311	AA						
MAN	1719	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CAN	1312	AA						
MAN	1720	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CAN	1313	AA						
MAN	1721	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CAN	1314	AA						
MAN	1722	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CAN	1315	AA						
MAN	1723	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CAN	1316	AA						
SGA	3322	AA	AA	AB	AB	AA	AA	AA	CAN	1322	AA						
SGA	3324	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CAN	1323	AA						
SGA	3325	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CAN	1324	AA						
SGA	3329	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CAN	1326	AA						
SGA	3331	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CAN	1327	AA						
SGA	3349	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CAN	1331	AA						
YEN	1644	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CAN	1332	AA						
YEN	1645	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	CAN	1333	AA						
YEN	2776	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	CAN	1335	AA						
YEN	2856	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	CAN	1336	AA						
YEN	2859	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	CAN	1341	AA						
YEN	2860	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	QST	1461	AA						
YEN	2861	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	QST	1465	AA						
YEN	2914	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	QST	1466	AA						
YEN	2915	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	QST	1469	AA						
YEN	2916	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	QST	1470	AA						
YEN	2919	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	QST	2637	AA						
YEN	2920	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	QST	2638	AA						
YES	1646	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA	QST	2639	AA						
YES	1646b	AA	AA	AB	AB	AA	AA	AA	QST	2640	AA						
YES	1647	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA	QST	2641	AA						
YES	1648	AA	AA	BB	BB	AA	AA	AA	QST	2642	AA						
YES	1655	AA	QST	2646	AA												
YES	1656	AA	QST	2648	AA												
YES	1744	AA	AA	AB	AA	AA	AA	AA	QST	3309	AA						
YES	1744b	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA	QST	3313	AA						
YES	1744c	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA	QST	3314	AA						

Anexo 2

Frecuencias alélicas de los 7 pares de cromosomas polimórficos de *Lioleamus monticola* para los 9 eco-demos. Heterocigosidad esperada (**H exp.**); heterocigosidad observada (**H obs.**); Zona Híbrida (**ZH**). En negro las localidades que presentan polimorfismos únicos. Pares 1 y 5 resultaron ser monomórficos.

Par 2	NCOS	NTRAN	NMODI	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9444	1.000	1.000
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(0.000)	(-)	(-)
200	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0556	1.000	1.000
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-0.000)	(-)	(-)
H exp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.1049	0.000	0.000
H obs.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.1111	0.000	0.000

Par 3	NCOS	NTRAN	NMODI	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	0.2778	0.5000	0.2708	0.3553	0.5000	0.9048	0.8889	1.0000	1.0000
	(0.003)	(-0.053)	(0.271)	(0.037)	(0.106)	(0.467)	(1.000)	(-)	(-)
200	0.7222	0.5000	0.7292	0.6447	0.5000	0.0952	0.1111	0.0000	0.0000
	(0.003)	(-0.053)	(0.271)	(0.037)	(0.106)	(0.467)	(1.000)	(-)	(-)
H exp.	0.4012	0.5000	0.3950	0.4581	0.5000	0.1723	0.1975	0.000	0.000
H obs.	0.4074	0.5856	0.2917	0.4474	0.4545	0.0952	0.0000	0.000	0.000

Par 4	NCOS	NTRAN	NMODI	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0303	0.7857	0.9444	1.000	1.000
	(-)	(-)	(-)	(-)	(1.000)	(-0.250)	(0.000)	(-)	(-)
200	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9697	0.2143	0.0556	0.000	0.000
	(-)	(-)	(-)	(-)	(1.000)	(-0.250)	(-0.000)	(-)	(-)
H exp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0588	0.3367	0.1049	0.000	0.000
H obs.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.4286	0.1111	0.000	0.000

Par 6	NCOS	NTRAN	NMODI	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	1.000	0.9444	0.7917	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	(-)	(-)	(0.000)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
500	0.000	0.0556	0.2083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	(-)	(-)	(-0.000)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
H exp.	0.000	0.000	0.252	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H obs.	0.000	-0.000	0.252	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Par 7	NCOS	NTRAN	NMODI	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	1.000	1.000	0.7083	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	(-)	(-)	(0.103)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
300	0.000	0.000	0.2917	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	(-)	(-)	(0.103)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
H exp.	0.000	0.000	0.4132	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H obs.	0.000	0.000	0.3750	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Anexo 3

Frecuencias alélicas de los 7 pares de cromosomas polimórficos para las razas de *Lioleamus monticola*. Heterocigocidad esperada (**H esp.**); heterocigocidad observada (**H obs.**); Zona Híbrida (**ZH**). En negro alelos únicos para cada raza cromosómica. Pares 1 y 5 resultaron ser monomórficos.

Par 2	Norte mod. 1	Norte	ZH	Sur	Par 3	Norte mod. 1	Norte	ZH	Sur
100	1.000 (-)	1.000 (-)	1.000 (-)	0.986 (-0.000)	100	0.270 (0.271)	0.385 (0.060)	0.904 (0.467)	0.973 (-1.000)
200	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.013 (-0.000)	200	0.729 (0.271)	0.614 (0.060)	0.095 (0.467)	0.027 (-1.000)
H esp.	0.000	0.000	0.000	0.026	H esp.	0.395	0.473	0.172	0.052
H obs.	0.000	0.000	0.000	0.027	H obs.	0.291	0.447	0.095	0.000

Par 4	Norte mod. 1	Norte	ZH	Sur
100	0.000 (-)	0.009 (-1.000)	0.785 (-0.250)	0.986 (-0.000)
200	1.000 (-)	0.990 (-1.000)	0.214 (-0.250)	0.013 (-0.000)
H esp.	0.000	0.018	0.336	0.026
H obs.	0.000	0.000	0.428	0.027

Par 6	Norte mod. 1	Norte	ZH	Sur	Par 7	Norte mod. 1	Norte	ZH	Sur
100	0.791 (0.252)	0.995 (0.000)	1.000 (-)	1.000 (-)	100	0.708 (0.103)	1.000 (-)	1.000 (-)	1.000 (-)
500	0.208 (0.252)	0.004 (-0.000)	0.000 (-)	0.000 (-)	300	0.291 (0.103)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)
H esp.	0.329	0.009	0.000	0.000	H esp.	0.413	0.000	0.000	0.000
H obs.	0.250	0.009	0.000	0.000	H obs.	0.305	0.000	0.000	0.000

Continuación anexo 4

localidad	individuo	AAT	AMAN	PGM	PGI	LDMA	PEP	SOD
YES	2305	AB	AA	CC	CC	AA	CC	BB
YES	2709	AB	AB	CC	CC	AA	BB	BB
YES	2710	AB	BC	CC	BC	AA	BB	BB
YES	2711	AB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
YES	2712	AB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
YES	2713	BB	BB	CC	CC	AA	AA	BB
YES	2714	AB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
YES	2715	AB	BC	CC	BC	AA	BB	BB
YES	2716	BB	BB	CC	CC	AB	AB	BB
YES	2717	AB	BC	CC	BB	AB	BB	BB
YES	2718	AA	BB	CC	BB	AB	BB	AA
YES	2721	CE	AB	CC	CC	AB	BB	BB
YES	2757	00	BB	00	00	AA	00	BB
YES	2758	AB	BB	00	00	AA	00	BB
YES	2759	AB	BB	00	00	AA	00	BB
YES	2760	AB	AB	00	00	AA	00	BB
YES	2762	AB	BB	00	00	AA	00	BB
YES	2763	AB	BB	00	00	AA	00	BB
YES	2764	AC	BB	00	00	AB	00	AA
YES	2779	AC	AD	00	00	AA	00	AA
MAS	2661	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	2662	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	2663	BC	AB	CC	CC	AA	BB	00
MAS	2664	BB	00	CC	CC	AA	BB	00
MAS	2665	BC	BB	CC	CC	AA	AB	BB
MAS	2666	AC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	2667	BC	AB	CC	CC	AA	BB	AA
MAS	2765	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	2766	BB	BB	CC	CC	AA	BB	AA
MAS	2767	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	2768	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	2769	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	2770	BB	AB	CC	CD	AA	AB	BB
MAS	2772	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	2773	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB
MAS	2774	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB
MAS	3352	CC	00	BC	BC	AA	BB	BB
MAS	3353	BB	00	CC	BC	AA	BC	BB
MAS	3354	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	3355	CC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	3356	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB
MAS	3357	BB	00	BC	CC	AA	BB	BB
RCL	2365	AB	BB	CC	CC	AA	00	BB
RCL	2433	BB	00	CC	CC	AA	BC	BB
RCL	2435	BC	AB	CC	CC	AA	00	BB
RCL	2541	BB	00	CC	CC	AA	00	BB
RCL	2544	BB	00	CC	CC	AA	00	BB
RCL	2556	00	00	CC	CC	AA	00	AB
RCL	2654	AB	BB	CC	DD	AA	BB	BB
RCL	2655	AB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
ING	3338	AA	AA	CC	CC	AA	BC	BB
ING	3339	BB	00	CC	00	AA	CC	BB
ING	3340	BB	AA	00	BC	AA	CC	BB
ING	3341	BB	BB	CC	BB	AA	BC	BB
ING	3342	BB	00	BB	CC	AA	BC	BB
ING	3343	BC	00	CC	BC	AA	CC	BB
ING	3344	AB	00	CC	CC	AA	BC	BB
ING	3345	AB	AB	CC	CD	AA	CC	BB

ING	3346	BC	AB	CC	CC	AA	BC	BB
CAN	1310	BB	BB	CC	CD	AA	BB	BB
CAN	1311	BC	BB	00	CD	AA	BB	BB
CAN	1312	BB	00	AC	BB	AA	BB	BB
CAN	1313	BC	00	BC	CD	AA	BB	BB
CAN	1314	BB	BB	BC	CD	AA	AB	BB
CAN	1315	BB	AA	00	CC	AA	00	BB
CAN	1316	BC	AB	CC	CD	AA	00	BB
CAN	1318	BB	BB	00	CC	AA	BB	BB
CAN	1322	BB	AB	CC	CC	AA	BB	BB
CAN	1323	BB	BB	BC	CC	AA	BB	BB
CAN	1326	BB	00	BC	CC	AA	BB	BB
CAN	1327	BB	00	AC	CC	AA	AB	BB
CAN	1331	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
CAN	1332	CC	00	CC	CC	AA	BB	BB
CAN	1333	BB	BB	AC	CC	AA	BB	BB
CAN	1335	BC	BB	00	CC	AA	BB	BB
CAN	1336	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
CAN	1341	BB	AB	CC	BB	AA	BB	BB
QNS	1454	BC	00	CC	CC	AA	00	BB
QNS	1459	BC	BB	CC	CC	AA	00	BB
QNS	1460	BB	BB	00	00	AA	00	BB
QNS	1464	BC	BC	CC	BB	AA	BC	BB
QNS	1468	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
QNS	1657	BC	00	CC	CC	AA	00	BB
QNS	1741	00	00	CC	CC	AA	00	BB
QNS	1746	BB	00	00	CC	AA	00	BB
QNS	2312	BC	BB	CC	BB	AA	BB	BB
QNS	2583	BB	BB	CC	CC	AA	00	BB
QNS	2584	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
QNS	2585	BC	BB	CC	BB	AA	BB	BB
QNS	2586	BB	00	CC	CC	AA	CC	BB
QNS	2636	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
QNS	2637	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
QNS	2638	BB	BB	00	00	AA	00	BB
QNS	2639	BC	BC	CC	CC	AA	BB	BB
QNS	2640	BC	00	CC	CC	AA	BB	BB
QNS	2641	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
QNS	2642	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
QNS	2643	BC	BB	00	00	AA	00	BB
QNS	2644	BC	BB	CC	CC	AA	BC	BB
QNS	2645	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
QNS	2646	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
QNS	2647	00	BB	CC	CC	AA	00	BB
RLO	2108	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
RLO	2109	BC	BB	CC	CC	AA	BB	BB
RLO	2118	00	00	CC	CC	AA	BC	BB
RLO	2383	BB	00	CC	CC	AA	BB	BB
RLO	2384	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
RLO	2382	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
RLO	2385	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
RLO	2386	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
RLO	2387	BB	BB	CC	BC	AA	BC	BB
RLO	2388	BB	BB	CC	BB	AA	BB	BB
RLO	2993	BB	BB	CC	CC	AA	BB	BB
STA	3304	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB
STA	3305	BC	BB	CC	00	AA	BB	BB
STA	3306	BB	BB	CC	CC	AA	BC	BB

Anexo 5

Frecuencias alélicas de los 7 loci aloenzimáticos para las localidades de *Liroleamus monticola*. Heterocigicidad esperada (H exp.); heterocigicidad observada (H obs.); Zona Híbrida (ZH). Destacado en negrita alelos únicos por localidad (hibridizmas).

AAT	NCOS	NMOD	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	0.025 (-0.018)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.409 (0.219)	0.434 (-0.578)	0.105 (0.175)	0.000 (-)	0.000 (-)
200	0.932 (-0.064)	0.875 (0.058)	0.988 (-0.000)	0.509 (0.426)	0.478 (-0.375)	0.723 (0.158)	0.833 (0.227)	0.810 (-0.220)
300	0.0424 (-0.036)	0.000 (0.000)	0.011 (-0.000)	0.0818 (0.162)	0.065 (-0.048)	0.171 (0.178)	0.166 (0.227)	0.189 (-0.220)
400	0.000 (-)	0.125 (0.058)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)
500	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.021 (-0.000)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)
H exp.	0.128	0.218	0.022	0.566	0.577	0.435	0.277	0.306
H obs.	0.135	0.208	0.022	0.400	0.826	0.368	0.222	0.378

aMAN	NCOS	NMOD	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	0.140 (-0.009)	0.045 (1.000)	0.2162 (0.057)	0.445 (0.733)	0.120 (0.262)	0.230 (0.153)	0.192 (0.294)	0.000 (-)
200	0.780 (-0.170)	0.954 (1.000)	0.783 (0.057)	0.554 (0.733)	0.680 (0.101)	0.769 (0.153)	0.807 (0.294)	0.950 (-0.036)
300	0.078 (-0.077)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.140 (-0.143)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.050 (-0.036)
400	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.020 (0.000)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)
500	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.040 (1.000)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)
H exp.	0.364	0.086	0.338	0.494	0.501	0.355	0.310	0.095
H obs.	0.403	0.000	0.324	0.135	0.440	0.307	0.231	0.100

PGM	NCOS	NMOD	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.019 (-0.010)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.107 (-0.083)	0.000 (-)
200	0.000 (-)	0.010 (-0.000)	0.011 (-0.000)	0.019 (-0.010)	0.000 (-)	0.051 (0.483)	0.143 (-0.130)	0.000 (-)
300	0.989 (0.000)	0.958 (-0.033)	0.999 (-0.000)	0.961 (-0.041)	0.963 (1.000)	0.949 (0.483)	0.750 (-0.300)	1.000 (-)
400	0.011 (-0.000)	0.031 (-0.022)	0.000 (-)	0.010 (-0.000)	0.037 (1.000)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)
H exp.	0.022	0.081	0.023	0.093	0.071	0.097	0.4056	0.000
H obs.	0.022	0.083	0.023	0.096	0.000	0.051	0.500	0.000

PGI	ROB	CAM	DOR	CON	COS	SAL	FAR	ARR
100	0.500 (0.000)	0.010 (0.000)	0.011 (-0.000)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)
200	0.404 (0.913)	0.989 (-0.000)	0.011 (-0.000)	0.202 (0.153)	0.267 (0.678)	0.077 (0.290)	0.111 (1.000)	0.186 (0.908)
300	0.553 (0.831)	0.000 (-)	0.977 (-0.012)	0.755 (0.032)	0.733 (0.678)	0.872 (0.323)	0.750 (0.286)	0.814 (0.908)
400	0.032 (-0.022)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.043 (-0.034)	0.000 (-)	0.051 (0.483)	0.139 (-0.133)	0.000 (-)
H exp.	0.529	0.021	0.045	0.387	0.391	0.231	0.406	0.302
H obs.	0.106	0.021	0.046	0.362	0.133	0.154	0.278	0.029

SOD	NCOS	NMOD	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.064 (0.648)	0.181 (0.909)	0.068 (0.791)	0.000 (-)	0.000 (-)
200	0.967 (1.000)	1.000 (-)	1.000 (-)	0.936 (0.648)	0.819 (0.909)	0.932 (0.791)	1.000 (-)	1.000 (-)
300	0.033 (1.000)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)
H exp.	0.063	0.000	0.000	0.120	0.296	0.126	0.000	0.000
H obs.	0.000	0.000	0.000	0.043	0.028	0.027	0.000	0.000

PEP	NCOS	NMOD	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	0.120 (0.063)	0.063 (0.651)	0.155 (0.373)	0.136 (0.285)	0.278 (0.732)	0.029 (-0.015)	0.063 (-0.034)	0.000 (-)
200	0.790 (-0.015)	0.938 (0.651)	0.845 (0.373)	0.483 (0.092)	0.667 (0.677)	0.721 (0.211)	0.938 (-0.034)	0.845 (0.097)
300	0.090 (0.155)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.381 (0.325)	0.056 (0.658)	0.250 (0.308)	0.000 (-)	0.155 (0.097)
H exp.	0.353	0.117	0.262	0.603	0.475	0.417	0.117	0.262
H obs.	0.340	0.042	0.167	0.475	0.148	0.324	0.125	0.241

LDHa	NCOS	NMOD	NAND	NCAJ	ZH	SCAJ	SCOS	SAND
100	1.000 (-)	1.000 (-)	1.000 (-)	0.979 (-0.015)	0.931 (-0.061)	1.000 (-)	1.000 (-)	1.000 (-)
200	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.021 (-0.015)	0.069 (-0.061)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)
H exp.	0.000	0.000	0.000	0.042	0.129	0.000	0.000	0.000
H obs.	0.000	0.000	0.000	0.043	0.139	0.000	0.000	0.000

Anexo 6

Frecuencias alélicas de los 7 loci aloenzimáticos para las razas cromosómicas descritas de *Lioleamus monticola*. Heterocigocidad esperada (H exp.); heterocigocidad observada (H obs.); Zona Híbrida (ZH). Destacado en negro alelos únicos (hibridizimas) por raza.

AAT	Norte Mod.	Norte	ZH	Sur	aMAN	Norte Mod.	Norte	ZH	Sur
100	0.000 (-)	0.152 (0.412)	0.434 (-0.578)	0.043 (0.221)	100	0.045 (-1.000)	0.250 (0.367)	0.125 (0.258)	0.123 (0.269)
200	0.875 (0.058)	0.799 (0.506)	0.478 (-0.375)	0.779 (0.036)	200	0.954 (-1.000)	0.719 (0.261)	0.666 (0.084)	0.855 (0.188)
300	0.000 (-)	0.047 (0.093)	0.065 (-0.048)	0.177 (0.011)	300	0.000 (-)	0.030 (-0.028)	0.145 (-0.150)	0.021 (-0.015)
400	0.125 (0.058)	0.000 (-)	0.000 (-)	0.000 (-)	400	0.000 (-)	0.000 (-)	0.020 (-0.000)	0.000 (-)
500	0.000 (-)	0.000 (-)	0.021 (-0.000)	0.000 (-)	500	0.000 (-)	0.000 (-)	0.041 -1.000	0.000 (-)
H exp.	0.218	0.335	0.577	0.358	H exp.	0.086	0.419	0.516	0.253
H obs.	0.208	0.197	0.826	0.344	H obs.	0.000	0.300	0.458	0.202

PGM	Norte Mod.	Norte	ZH	Sur	PGI	Norte Mod.	Norte	ZH	Sur
100	0.000 (-)	0.007 (-0.004)	0.000 (-)	0.017 (-0.012)	100	0.010 (0.000)	0.007 (-0.004)	0.000 (-)	0.000 (-)
200	0.010 (-0.000)	0.010 (-0.007)	0.000 (-)	0.046 (0.219)	200	0.989 (-0.000)	0.210 (0.653)	0.266 (0.678)	0.126 (0.754)
300	0.958 (-0.033)	0.975 (-0.022)	0.963 (-1.000)	0.936 (0.132)	300	0.000 (-)	0.757 (0.549)	0.733 (0.678)	0.824 (0.549)
400	0.031 (-0.022)	0.007 (-0.004)	0.037 (-1.000)	0.000 (-)	400	0.000 (-)	0.025 (-0.022)	0.000 (-)	0.049 (0.187)
H exp.	0.080	0.048	0.071	0.120	H exp.	0.021	0.381	0.391	0.302
H obs.	0.083	0.049	0.000	0.103	H obs.	0.021	0.173	0.133	0.131

PEP	Norte Mod.	Norte	ZH	Sur	SOD	Norte Mod.	Norte	ZH	Sur
100	0.062 (0.651)	0.136 (0.240)	0.277 (0.732)	0.025 (-0.020)	100	0.000 (-)	0.026 (0.659)	0.185 (0.908)	0.026 (0.797)
200	0.937 (0.651)	0.683 (0.218)	0.666 (0.677)	0.810 (0.183)	200	1.000 (-)	0.961 (0.761)	0.814 (0.908)	0.973 (0.797)
300	0.000 (-)	0.180 (0.416)	0.055 (0.658)	0.164 (0.269)	300	0.000 (-)	0.011 -1.000	0.000 (-)	0.000 (-)
H exp.	0.117	0.482	0.475	0.316	H exp.	0.000	0.075	0.302	0.051
H obs.	0.041	0.346	0.148	0.253	H obs.	0.000	0.017	0.028	0.010

LDHa	Norte Mod.	Norte	ZH	Sur
100	1.000 (-)	0.991 (-0.006)	0.928 (-0.062)	1.000 (-)
200	0.000 (-)	0.008 (-0.006)	0.071 (-0.063)	0.000 (-)
H exp.	0.000	0.017	0.132	0.000
H obs.	0.000	0.017	0.142	0.000

