

**ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO DEL SAPO
ANDINO *Telmatobius chusmisensis* (ANURA:
TELMATOBIIDAE).**

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por
Katherin Eliana Alejandra Otálora Acevedo
Abril, 2017

Director de Tesis:
Dr. Marco Méndez

Codirector de Tesis:
Luis Felipe Hinojosa

**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

KATHERIN ELIANA ALEJANDRA OTÁLORA ACEVEDO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa de Tesis rendida el 25 de Abril de 2017.

Director de Tesis:

- Dr. Marco Méndez

Co-director de Tesis:

- Dr. Luis Felipe Hinojosa.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

- Dr. David Véliz

- Dr. Elie Poulin

*"Nada tiene sentido en biología
si no es a la luz de la evolución".
Dobzhansky*



RESUMEN BIOGRAFICO

Mi nombre Katherin Eliana Alejandra Otálora Acevedo, nací el 8 de mayo de 1993 en Tunja-Boyacá, Colombia. Realicé mi educación media en el Colegio de Boyacá, entre el año 2009 y 2014, cursé la carrera de Biología en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), donde obtuve el Título profesional de Biólogo en 2014, realice un intercambio académico con la Universidad Nacional de Colombia (UNAL) en el año de 2012 y el desarrollo de mi tesis fue en el periodo 2013-2014 en la Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL). He sido asistente de investigación de los grupos de investigación GEBIMOL de la UPTC y GENBIMOL de la UJTL, profesor guía de biología en diversos colegios de Colombia y consultor del área de herpetología en empresas de estudios ambientales. Mi foco de investigación ha sido la biología molecular, genética de poblaciones, filogeografía y filogenia, en diversos taxa de herpetozoos (tortugas marinas y anfibios). En marzo de 2015, ingresé al programa de Magíster en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, trabajando en el Laboratorio de Genética y Evolución.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron en el cumplimiento de esta meta, a mis profesores, Marco Méndez y Luis Felipe Hinojosa, por sus enseñanzas, su apoyo y la confianza depositada en mí.

A mi familia, José Otálora mi padre y mi razón de ser, quien me motiva día a día para alcanzar mis objetivos y me apoya en cada paso que doy, a mi hermana Evelyn, que me permea de su sabiduría y me da fortaleza. A mis hermanos Diego y Sebastián, por su cariño y apoyo. A mis grandes amigos Fabian Cuadros, Jeancarlo Sanchez y Felipe Ormeño por acompañarme y colaborar en el proceso.

A, Pablo Fibla, Paola Sáez, Franco Cruz, Moisés Valladares, Carolina Araya, Álvaro Zúñiga, Alejandra Fabres, Constanza Napolitano, Michel Sallaberry, Elie Poulin y David Véliz, por su ayuda con el trabajo de terreno y sugerencias en la realización de los análisis. A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias: Carla Rojas, José Serrano, Carolina Gallardo, Luis Pastenes, y Camilo Valdivieso. Que con sus comentarios y ayuda, contribuyeron a la realización de este trabajo. Este trabajo contó con el financiamiento del proyecto Fondecyt Regular 1140540 "Integrative taxonomy, systematics and hydrographic history of the genus *Telmatobius* (ANURA: TELMATOBIIDAE): disentangling their hidden biodiversity and diversification history".

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	HIPOTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	6
2.1	Antecedentes.....	6
2.2	Hipótesis I.....	6
2.3	Predicción I.....	6
2.4	Predicción II.....	7
2.5	Hipótesis III.....	7
2.6	Predicción III.....	7
3	OBJETIVOS	8
3.1	Objetivo General:	8
3.2	Objetivos Específicos:.....	8
4	MATERIALES Y METODOS	9
4.1	Obtención de Muestras.....	9
4.2	Procedimientos de laboratorio	9
4.3	Análisis de datos DNAm.....	13
4.4	Análisis de datos con Microsatelites (SSR).....	19
5	RESULTADOS	22
5.1	Patrones de estructuración filogeográfica	25
5.2	Estructuración genética y flujo genético entre poblaciones.....	30
5.3	Análisis de historia demográfica	43
6	DISCUSIÓN.....	47
7	CONCLUSIONES.....	56
8	RECURSOS MATERIALES Y FINANCIAMIENTO.....	57
	BIBLIOGRAFÍA	58

FIGURAS

- Figura 1.** Área de estudio y distribución geográfica de *Telmatobius chusmisensis*. Chusmiza: localidad tipo de *T. chusmisensis*. Líneas en blanco: Subcuencas con presencia de *T. chusmisensis* de Norte a Sur. Subcuenca Aroma (Chiapa e Illalla), Subcuenca Tarapacá (Chusmiza, Laonzana y Lirima), Subcuenca Salar de Huasco (Salar de Huasco, Collacagua y Piga) y Subcuenca Loa Medio (Huatacondo, Copaquire, Chijlla y Choja). Zonas de gran altitud en color burdeo y zonas precordilleranas en color naranja. 12
- Figura 2.** Median-Joining Network inferido a partir de muestras de la Región control del DNA mitocondrial. Subcuenca Tarapacá (Chusmiza-Lirima-Laonzana), Subcuenca Quebrada Quipisca (Noasa) , Subcuenca Salar Huasco (Salar de Huasco, Collacagua y Piga), Subcuenca Quebrada Aroma (Chiapa-Illalla), Subcuenca Loa medio (Copaquire-Huatacondo-Choja-Chijlla)..... 29
- Figura 3.** Análisis espacial de Geneland usando un modelo no correlacionado para datos de DNAmT de todas las muestras de *T. chusmisensis*. a) Número de poblaciones (K=4); b) Mapa de pertenencia de la población; c) Mapa de probabilidad posterior de pertenecer a diferentes clusters. Los círculos negros indican cada localidad. El sombreado más oscuro y más claro es proporcional a las probabilidades posteriores de pertenecer a los grupos, las áreas más claras (amarillas) muestran las probabilidades de pertenencia más altas de los grupos. 33
- Figura 4.** Tres primeros ejes de análisis factorial de correspondencia (AFC)

basado en la variación alélica de cada localidad.....	38
Figura 5. Arriba promedio de LnP (D); y Abajo ΔK por cada valores de K analizado, derecha. Índices según Evanno et al., 2005, calculados en STRUCTURE harvester. (Earl & von Holdt 2012).	40
Figura 6. STRUCTURE, plot basado en 8 loci de Microsatélites en K= 6. Cada individuo es representado por una línea vertical dividida en segmentos de colores que representan los grupos o clusters (K), el eje Y muestra el porcentaje de pertenencia a cada clusters.....	41
Figura 7. Reconstrucción de la historia demográfica utilizando el fragmento de la Región Control del DNAm de <i>Telmatobius chusmisensis</i> , usando Bayesian Skyline plot. Eje x: intervalo de tiempo reconstruido en el período 0-13 mil años BP. Eje y: reconstrucción del tamaño efectivo de la población en escala logarítmica. La línea negra es la estimación media del tamaño de la población con el tiempo. La región en azul representa las regiones de densidad posterior más altas del 95%. a) Subcuenca Tarapacá, b) Subcuenca Quipisca_SalarHuasco, c) Subcuenca Aroma d) Subcuenca Loa Medio. La Subcuenca de Tarapacá marca el inicio de la expansión poblacional, aproximadamente 10000-12500 años BP.	45
Figura 8. Distribución de mismatch de las secuencias de <i>Telmatobius chusmisensis</i> en los diferentes grupos genéticos establecidos por SAMOVA y GENELAND. a) Subcuenca Tarapacá, b) Subcuenca Quipisca_SalarHuasco, c) Subcuenca Aroma d) Subcuenca Loa Medio.	46

TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas de las localidades visitadas en la Región de Tarapacá durante dos salidas a terreno, en primavera de 2015 e invierno de 2016.	10
Tabla 2 Modelos de migración de las poblaciones de <i>Telmatobius chusmisensis</i> que se evaluarán en MIGRATE-n.	18
Tabla 3. Medidas de diversidad genética de <i>Telmatobius chusmisensis</i> a nivel de subcuenca, basadas en análisis mitocondrial de la región control.	23
Tabla 4. Marcadores microsatélites analizados en las muestras recolectadas de <i>Telmatobius chusmisensis</i> con sus respectivas características. Ta = temperatura de annealing. pb = pares de bases nucleotídicas.	24
Tabla 5. Localidades y número de individuos muestreados, parámetros de variación genética determinadas del análisis de 8 loci microsatélites.	25
Tabla 6. Estimaciones de la diferenciación genética y NST por pares de grupos genéticos basados en DNAm _t región control. Valores significativos en negrita. Significancia al 5%, corrección de FDR.	28
Tabla 7. Estimaciones de la diferenciación genética y NST por pares de grupos genéticos basados en DNAm _t región control. Todos los valores fueron significativos. Significancia al 5%, con corrección de FDR.	31
Tabla 8. Resultados de la Prueba de Mantel entre distancias genéticas y distancias físicas (distancia geográfica y diferencia de altitud).	34
Tabla 9. Bayes Factor y Log probabilidad marginal para los modelos de flujo genético histórico de <i>Telmatobius chusmisensis</i>	35

Tabla 10. Tasa de migración histórica estimada para las poblaciones de <i>Telmatobius chusmisensis</i>	36
Tabla 11. Estimaciones de la diferenciación genética por pares de grupos genéticos basados en SSR. Valores significativos en negrita. Significancia al 5%, corrección de FDR.	37
Tabla 12. Tasas de migración contemporánea estimada con microsatélites, la primera columna corresponde a la localidad de origen, siguientes columnas localidad receptora de individuos, en negrita se muestran los valores superiores a 0,1.	42
Tabla 13. Resultados de las pruebas de asignación de la primera generación de migrantes como el porcentaje de individuos de la subcuenca muestreada asignados a cada subcuenca, en negrita se muestran los valores superiores a 15%.	42
Tabla 14. Test de neutralidad selectiva, población en equilibrio mutación-deriva de <i>Telmatobius chusmisensis</i> , a nivel de subcuencas basadas en análisis mitocondrial de la región control. *Significancia al 5%, ($p < 0,05$).	44

RESUMEN

La hidrografía del altiplano chileno se caracteriza por ser muy compleja, debido a las intensas fluctuaciones estacionales y a efectos de glaciaciones del Pleistoceno, que han generado un alto grado de endemismo en el área. Uno de los componentes endémicos de esta zona es el anfibio *Telmatobius chusmisensis* (Telmatobiidae) (Formas et al., 2006) un sapo estrictamente acuático, que tiene una distribución entre los 19° y 21° S. Este rango de distribución presenta un amplio gradiente altitudinal y latitudinal del altiplano chileno. En este estudio se evalúa la existencia de estructuración genética y filogeográfica en *T. chusmisensis*, y la existencia de cambios en el tamaño efectivo poblacional en el tiempo. Para esto, se secuenciaron 811 pb del gen mitocondrial Dloop y se genotipificaron 8 loci microsatélites, en 205 especímenes en 13 localidades. Para determinar la variabilidad intra e inter-poblacional de *T. chusmisensis* se construyó una red de haplotipos y se calcularon los índices de diversidad genética. Posteriormente, se estimó el número de poblaciones mediante un análisis de estructuración genética utilizando SAMOVA, GENELAND y STRUCTURE. La historia demográfica de las poblaciones se evaluó mediante los índices demográficos y se realizó un Skyline Plot. *Telmatobius chusmisensis* presentó cinco grupos genéticos con el marcador mitocondrial y seis grupos genéticos con los marcadores nucleares, esos patrones se explican por el aislamiento geográfico entre las subcuencas, la restricción al sitio de origen dada la baja vagilidad de estos organismos y su alta dependencia a los sistemas acuáticos. Por otro lado, los datos de DNA

mitocondrial revelaron un patrón filogeográfico claro con separación moderada entre las poblaciones del norte y del sur. Se identificó una expansión demográfica reciente para uno de los grupos más meridionales (Subcuenca Quebrada de Tarapacá), presumiblemente debido las fluctuaciones ambientales entre periodos secos y húmedos en el altiplano, durante y luego del último período glacial 20000-7000 años BP. Los análisis de flujo genético contemporáneo dan evidencia de flujo dentro de las subcuencas y entre dos subcuencas latitudinalmente cercanas (Subcuenca Quipisca y Tarapacá) que estaría mediado por eventos de dispersión actuales generados por el Monzón sudamericano y ENSO, que permite el flujo asimétrico desde zonas de mayor altitud a zonas de menor altitud. Los eventos de dispersión históricos estarían atribuidos al CAPE por aumentos en la precipitación que fomentarían el flujo genético entre subcuencas (Tarapacá y Aroma). La subcuenca de Tarapacá presumiblemente habría actuado como una población fuente. La distancia geográfica entre subcuencas jugó un rol importante como barrera geográfica en la restricción parcial del flujo de genes en esta especie. Un grupo independiente y nuevo (Subcuenca Loa Medio) se reporta para *Telmatobius chusmisensis*, que estaría en proceso de diferenciación por lo cual toma gran importancia en términos de conservación. Este es el primer estudio de la estructura genética de esta especie.

ABSTRACT

The hydrography of the Chilean highland is characterized by being complex due to intense seasonal fluctuations and the effects of Pleistocene glaciations, which have generated a high degree of endemism in this area. *Telmatobius chusmisensis* (Telmatobiidae) is an endemic amphibian to this zone (Formas et al., 2006), that is strictly aquatic, inhabiting between 19 ° and 21 ° S. This range of distribution presents a great altitudinal and latitudinal gradient of the Chilean highland. This study evaluates the existence of a genetic and phylogeographic structure in *T. chusmisensis*, and the presence of a change in effective population size over time. We sequenced 811 bp of the mitochondrial Dloop gene, and genotyped 8 microsatellite loci in 205 specimens from 13 locations. We determined the intra- and inter-population variability of *T. chusmisensis*, built a network of haplotypes and calculated genetic diversity indexes. Subsequently, the number of populations by a genetic structuring analysis was estimated using SAMOVA, GENELAND and STRUCTURE. The demographic history of populations was evaluated using demographic indices and Skyline Plot. *Telmatobius chusmisensis*, presented five genetic groups with the mitochondrial marker, and six genetic groups with nuclear markers, these patterns are explained by geographical isolation among the sub-basins, the restriction to the site of origin due to low vagility of these organisms. Moreover, mitochondrial DNA data revealed a phylogeographic pattern with a moderate separation between northern and southern populations. A recent demographic expansion was identified for the most southern group (Quebrada de Tarapacá), presumably due to environmental

fluctuations between dry and wet periods in the highlands during and after the last glacial period 14000-7000 BP years. The analyzes of contemporary genetic flow provide evidence of flow within the sub-basins and between two latitudinally close sub-basins (Quipisca and Tarapacá Sub-basin), that would be mediated by current dispersion events generated by the South American Monsoon and ENSO, which allows asymmetric flow from higher altitude zones to lower altitude areas. The historical dispersal events would be attributed to CAPE, due to an increase in precipitation that promoted genetic flow between sub-basins (Tarapacá and Aroma). The Tarapacá sub-basin would presumably have acted as a source population. Geographic distance between sub-basins played an important role as a geographical barrier in the partial restriction of gene flow in this species. We reported an independent and new group (Medium Loa Sub-basin) for *Telmatobius chusmisensis*, which would be in a process of differentiation and would have a great importance in terms of conservation. This is the first study of genetic structure for this species.

1 INTRODUCCIÓN.

El altiplano es una meseta central intermontana de gran altitud (3600-4500 msnm) situada en el cordón montañoso de la cordillera de los Andes (Rigsby et al., 2005; Vila et al., 2013). Esta región comprende el 15% de la superficie continental, y ha sido catalogada como centro de diversidad y endemismo (Duellman, 1999). Durante el periodo Glacial Tardío, el Altiplano de Chile y su zona precordillerana, se caracterizó por la formación de grandes cuerpos de agua subterránea (14 000-12 000 años B.P.) y extensos lagos, los cuales habrían cubierto un área cuatro veces más extensa que la actual (Hastenrath & Kutzbach, 1985; Vila et al., 2013) debido a un aumento en la precipitación (CAPE "Central Andean (or Atacama) Pluvial Event") entre 18000-11000 años B.P (Grosjean et al., 1991; Gayo et al., 2012). Durante el Holoceno la zona presentó una predominancia de condiciones de hiperaridez, caracterizadas por un cambio en el régimen de precipitaciones, disminución en la cobertura vegetal y disminución en la productividad del área (Latorre et al., 2002; Maldonado et al., 2005; Maldonado y Rozas, 2008; Placzek et al., 2013;). Esto dio lugar a la formación de un elevado número de sistemas endorreicos (salares, lagos y vertientes), donde las interconexiones contemporáneas son mayoritariamente subterráneas (Vila, 1975; Collado et al., 2013). Actualmente, esto constituye una explicación recurrente de eventos de aislamiento geográfico, divergencia genética, extinción y estructuración poblacional de organismos predominantes de este sistema (Cei, 1986; Formas et al., 2003; Correa et al., 2010; Morales et

al., 2011; Vila et al., 2013) como es el caso de las especies de caracoles del género *Biomphalaria* (Collado et al. 2011; Collado & Méndez 2013), peces del género *Orestias* (Vila et al., 2013, Esquer-Garrigos et al., 2013) y especies de sapos del género *Telmatobius* (Sáez et al., 2014). Por lo anterior, la especiación alopátrica ha sido postulada como el principal mecanismo de divergencia para la zona altiplánica (Cej, 1986; Guarnizo et al., 2009; Morales et al., 2011; Vila et al., 2013; Saez et al., 2014). Esta dinámica de cambios ha generado una marcada modificación del paisaje, potenciando la formación de barreras geográficas que han restringido la migración o intercambio genético entre poblaciones (Cruz-Jofre, 2015) y promoviendo el aumento en la frecuencia de haplotipos privados, como en el caso del pez *Orestias ascotanensis* (Morales et al., 2011). En la actualidad, la existencia de conexiones temporales entre distintos sistemas endorreicos, se deben principalmente a eventos intensos de lluvia denominados como "Invierno Altiplánico" o monzón Sudamericano durante el verano austral (diciembre a marzo) (Zhou & Lau, 1998). Estos eventos incrementan los niveles de agua, generando corredores que permitirían la dispersión entre diferentes sectores y flujo genético entre algunas poblaciones que aparentemente están aisladas (Morales et al., 2011). Estas condiciones podrían contrarrestar los efectos de vicarianza en estas zonas. Por lo tanto, la caracterización genética de las poblaciones que habitan esta zona es una tarea compleja dada la mezcla entre factores históricos y ecológicos que co-ocurren en estos sistemas.

La mayoría de los sistemas fluviales que pertenecen a la macrozona Andina, tienen sus nacientes en las altas montañas de la cordillera de Los Andes, y constituye la línea divisoria de aguas entre las cuencas exorreicas del océano Atlántico y del océano Pacífico; donde los cordones montañosos son la principal delimitante entre cuencas hidrográficas. Gran parte de las cuencas se extienden desde dichos frentes montañosos de fuertes pendientes, que son alimentados por aguas lluvias estivales, deshielos y vertientes (FAO, 2014). La diferencia en los gradientes altitudinales de los sistemas montañosos jugaría un rol importante como fuente causal de especiación, principalmente mediada por aislamiento reproductivo y flujo genético restringido, debido a la diversidad orográfica y climatológica, que presentan estas zonas (Guarnizo et al., 2009; Funk et al., 2015).

Los anfibios del género *Telmatobius* (Wiegmann, 1834) representan un componente nativo de la batracofauna andina (Formas et al., 2003). Actualmente este género está compuesto por 63 especies distribuidas desde Ecuador hasta Argentina y Chile en su distribución sur (Barrionuevo & Baldo 2009; Frost 2015). Se ha postulado que su diversificación habría ocurrido a través de la colonización desde zonas del oriente hacia al occidente en los Andes centrales (Lavilla, 1985 & Saez et al., 2014). *Telmatobius chusmisensis* es un sapo endémico de Chile, se habría originado durante el Pleistoceno (0,34 Mya), es estrictamente dependiente de cuerpos de agua altiplánicas de la región

de Tarapacá (Saez et al., 2014). Esta especie ha sido descrita en base a su morfología externa, osteología y cariotipo por Formas et al en el año 2006 en su localidad tipo Chusmiza.

El conocimiento de la distribución de *T. chusmisensis* era relativamente escaso y se limitaba a la localidad tipo de Chusmiza (Formas et al., 2006). Sin embargo, Sáez et al (2014), amplían la distribución de la especie a 12 localidades distribuidas en el sector septentrional de Chile, de los 19°S (Chiapa) a los 21°S (Choja) en tres grandes cuencas (Pampa de Tamarugal, Rio Loa y Altiplánica) y cinco subcuencas (Quebrada Aroma-Quebrada Tarapacá-Quebrada de Quipisca-Salar de Huasco-Loa Medio) de los andes chilenos (Figura, 1). Esta especie utiliza una variedad de hábitats acuáticos presentes en la zona (i.e bofedales, salares, pozas con vegetación acuática, lagos y quebradas precordilleranas), sobre los 2.000 m.s.n.m. desde zonas cordilleranas hasta zonas precordilleranas (Velooso et al., 1982; Sáez et al., 2014).

T. chusmisensis es parte de un nuevo linaje endémico, restringido a las vertientes occidentales de los Andes chilenos, denominado como grupo *Telmatobius pefauri* (Saez et al., 2014). Este grupo incluye las especies chilenas *T. pefauri*, *T. dankoi*, *T. vilamensis* y *T. chusmisensis*. Las especies de este grupo habitan en los valles occidentales de los Andes y divergieron de linajes del altiplano durante el Pleistoceno tardío (Sáez et al. 2014; Lavilla 1985). *Telmatobius chusmisensis* presenta una distribución desde zonas de gran altitud hasta zonas precordilleranas, a diferencia de su clado hermano (*T.*

pefauri, *T. dankoi* - *T. vilamensis*) el que se encuentra restringido a la zona precordillerana. Este patrón de distribución permite evaluar la posibilidad de procesos de colonización poblacional de *T. chusmisensis* desde zonas de mayor altitud a zonas de menor altitud, razón por la cual resulta interesante como modelo para estudios filogeográficos.

Los análisis filogeográficos son una herramienta útil para la investigación de los aspectos históricos de la biogeografía y la estructura genética de las poblaciones (Zeisset & Beebee, 2008), ya que permiten interpretar el modo y la extensión en que los procesos históricos pudieron dejar marcas evolutivas en la demografía y la distribución geográfica actual de los organismos (Avice 2000; Freeland 2005). Los anfibios son particularmente informativos en temas de investigación filogeográfica, por su distribución global, alto grado de estructuración genética en las poblaciones, capacidad limitada de dispersión y alta filopatría (Zeisset & Beebee, 2008; Seppä & Laurila 1999). En el presente trabajo se evalúa la existencia de estructuración genética y su dimensión en *T. chusmisensis*, así como también cambios de tamaño efectivo poblacional en el tiempo.

2 HIPOTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Antecedentes.

Considerando: a) La topología y climatología del Altiplano Chileno durante y luego del último período glacial 28000-7000 años BP que habrían dificultado la migración o intercambio genético entre poblaciones; b) La distribución de *T. chusmisensis* de los 19° a 21° S a lo largo de gradientes altitudinales y latitudinales en la cordillera de los andes chilenos; c) La baja vagilidad de *T. chusmisensis* asociada a sus hábitos estrictamente acuáticos; d) La colonización y divergencia de linajes del género *Telmatobius* en altiplano durante el Pleistoceno tardío, desde vertientes orientales a occidentales (zonas cordilleranas a precordilleranas) y el flujo asimétrico de vertientes de mayor altitud a menor altitud. Se postulan las siguientes hipótesis:

2.2 Hipótesis I

Las poblaciones de *Telmatobius chusmisensis* presentan una baja conectividad entre subcuencas, dada su baja vagilidad.

2.3 Predicción I

Las poblaciones de *T. chusmisensis* presentaran alta estructuración genética y un bajo flujo genético entre subcuencas, lo que les permitirá acumular un mayor número de haplotipos privados.

2.3 Hipótesis II

Las poblaciones *T. chusmisensis* presentan procesos de dispersión asimétricos desde zonas cordilleranas hacia zonas precordilleranas.

2.4 Predicción II

Las poblaciones precordilleranas en *T. chusmisensis* presentaran una mayor diversidad genética respecto a las poblaciones de zonas cordilleranas, producto del flujo asimétrico predominante en la región, que lleva nuevos haplotipos desde zonas de mayor altitud a zonas de menor altitud.

2.5 Hipótesis III

Los periodos húmedos durante el UMG habrían promovido el aumento poblacional de *T. chusmisensis*.

2.6 Predicción III

Los poblaciones de *T. chusmisensis* habrían sufrido una expansión poblacional en los períodos húmedos en el altiplano, debido en un incremento de la precipitación en el área que facilitaría la conectividad y reproducción de la especie.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Evaluar la existencia de patrones de aislamiento y conectividad entre poblaciones de la sapo andino *Telmatobius chusmisensis*.

3.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Determinar patrones de estructuración genética y filogeográfica entre poblaciones del sapo andino *Telmatobius chusmisensis*.
- ✓ Establecer los patrones de flujo genético en las poblaciones del sapo andino *Telmatobius chusmisensis*.
- ✓ Estimar la señales de cambios demográficos en las poblaciones del sapo andino *Telmatobius chusmisensis*.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Obtención de Muestras

Se capturaron un total de 275 individuos, con un tamiz de pesca, entre rocas de arroyos con corriente leve, pozas con vegetación acuática y bofedales del Altiplano. Los individuos capturados fueron anestesiados por inmersión en una solución 0,2% benzocaína (Saez et al., 2014). Posteriormente, los ejemplares fueron muestreados y liberados en el lugar de su captura. Las muestras de tejido se conservaron en etanol absoluto hasta su análisis. Se tomaron muestras de un trozo de membrana interdigital de los pies (aproximadamente 3mm³). Para la identificación del espécimen se usaron descripciones originales y claves taxonómicas de Formas et al., 2003 del adulto de *Telmatobius*. Las localidades incluidas en este estudio se indican en la Tabla 1 y la Figura 1, y se encuentran distribuidas dentro de cinco grandes subcuencas.

4.2 Procedimientos de laboratorio

La extracción de DNA se realizó utilizando el método de extracción de sales (modificado de Jowett, 1986). Se amplificó el gen mitocondrial D-loop (~ 1300 pb), para lo cual se diseñaron los partidores (F "CAACAATCGGAGCACTAGA"; R "CCTAGCTCCTGACTTCTT"). Las condiciones de PCR se estandarizaron. La mezcla para la amplificación mediante PCR consistió en un volumen final de 30 µl, compuesto por Buffer de PCR 1X, Cloruro de Magnesio 3.0 mM, DNTPS 0.4mM, solución de partidores 0.15 mM c/u, 1 U de Taq DNA polimerasa y 60

ng de DNA. Luego se realizó los ciclos térmicos que se detallan a continuación: un primer paso de desnaturalización de 3 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 54 °C, 1:20 segundos a 72 °C y para terminar una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Los fragmentos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con GelRed® (Biotium, Inc.). Los productos amplificados se analizaron en el servicio de secuenciación MacroGen Inc., (www.macrogen.com) Corea del Sur. Estas secuencias fueron alineadas con la opción ClustalW del programa BioEdit v. 7.2.0 (Hall, 1999) y editadas mediante inspección visual en Geneious v. 10.0.9 (Kearse et al., 2012), las secuencias serán depositadas en el GenBank.

Tabla 1. Coordenadas geográficas de las localidades visitadas en la Región de Tarapacá durante dos salidas a terreno, en primavera de 2015 e invierno de 2016.

	Localidad	Latitud Sur	Longitud Oeste	Altura (msnm)	Cuenca	Subcuenca
1	Chiapa	19° 31' 56,33"	69° 12' 19,58"	3062	PT	QA
2	Illalla	19° 33' 4,83"	69° 13' 31,21"	2953	PT	QA
3	Chusmiza	19° 41' 3,38"	69° 11' 2,29"	3500	PT	QT
4	Laonzana	19° 51' 17,09"	69° 19' 58,83"	1843	PT	QT
5	Lirima	19° 50'44.00"	68° 51'7.00"	4086	PT	QT
6	Noasa	19° 59'8.00"	69° 7'23.00"	3148	PT	QQ
7	Choja	21° 5'24.00"	68° 52'17.00"	3531	RL	LM
8	Copaquire	20° 55' 35,78"	68° 51' 11,77"	3663	RL	LM
	Copaquire	20° 55' 45,37"	68° 53' 6,53"	3542	RL	LM
9	Huatacondo	20° 56' 0,97"	68° 57' 12,66"	2945	RL	LM
10	Chijlla	21° 1,0' 25,57"	68° 44' 9,87"	4500	RL	LM
11	Collacagua	20° 1'55.61"	68° 49'17.11"	3930	A	SH
12	Piga	20° 2'26.55"	68° 45'38.63"	3933	A	SH
13	Huasco	20° 15' 46,09"	68° 52' 32,42"	3806	A	SH

Cuencas, PT: Pampa de Tamarugal, A: Altiplánica, RL: Río Loa.

Subcuencas, QA: Quebrada Aroma QT: Aroma-Quebrada Tarapacá QQ: Quebrada de Quipisca LM: Loa Medio SH: Salar de Huasco

Todos los individuos fueron genotipados utilizando 8 loci microsatélites polimórficos, seleccionados de un resultado de análisis de 644.686 lecturas,

90.324 microsatelites y 52.489 primers, realizado por la empresa OMICS Solutions del Centro Nacional de Genómica y Bioinformática de Chile.

El tamaño de los alelos amplificados se determinó mediante electroforesis microcapilar en un secuenciador de DNA automático (ABI prism 377 - Applied Biosystems) (Macrogen Inc). El análisis de fragmentos se realizó en el software GENEMAPPER 4.0 (SoftGenetics). Se llevó a cabo el control de calidad para cada loci con el programa Microchecker (van Oosterhout et al., 2004) con el fin de corregir alelos con peaks grandes, presencia de stutters que generan errores de lectura y detectar la presencia de alelos nulos.

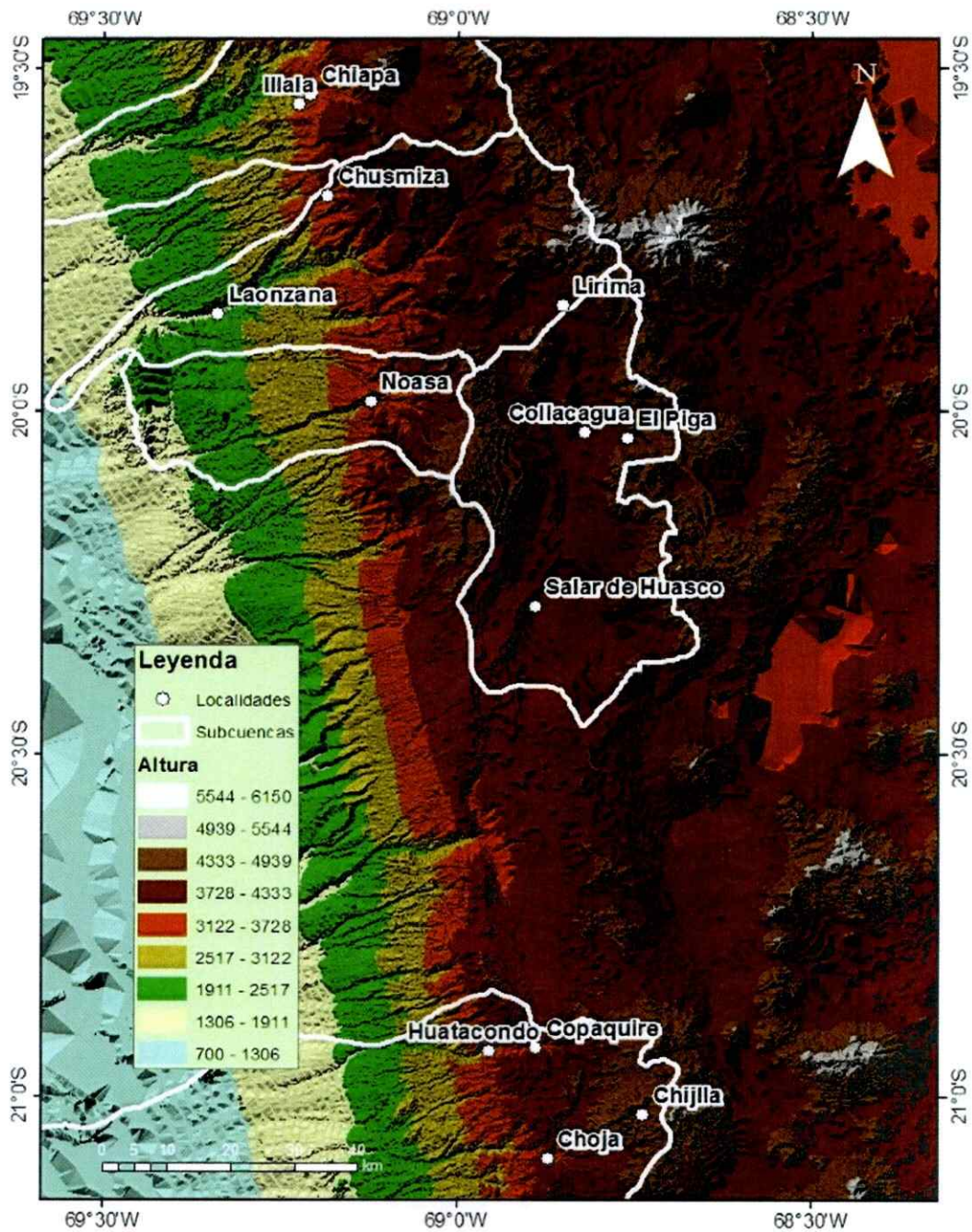


Figura 1. Área de estudio y distribución geográfica de *Telmatobius chusmisensis*. Chusmiza: localidad tipo de *T. chusmisensis*. Líneas en blanco: Subcuencas con presencia de *T. chusmisensis* de Norte a Sur. Subcuenca Aroma (Chiapa e Illala), Subcuenca Tarapacá (Chusmiza, Laonzana y Lirima), Subcuenca Salar de Huasco (Salar de Huasco, Collacagua y Piga) y Subcuenca Loa Medio (Huatacondo, Copaquira, Chijlla y Choja). Zonas de gran altitud en color burdeo y zonas precordilleranas en color naranja.

4.3 Análisis de datos DNAm

Los índices de diversidad estándar tales como el número de haplotipos (k), sitios polimórficos (S) y diversidad haplotípica (H), se estimaron a partir del alineamiento de secuencias de Dloop utilizando DNAsp v5.10 (Librado & Rozas, 2009), con el fin de determinar los niveles de polimorfismo genético para cada grupo geográfico. También se estimó el promedio de diferencias entre pares de secuencias (Γ) y la diversidad nucleotídica (π) de acuerdo a Nei (1987). Las relaciones genealógicas entre las poblaciones de *Telmatobius chusmisensis* se determinaron usando el algoritmo median-joining en PopArt v.1.7 (Bandelt *et al.* 1999; French *et al.*, 2013).

La estructura genética global se analizó utilizando SAMOVA (Dupanloup, Schneider & Excoffier, 2002) sobre la base de los datos genéticos y geográficos disponibles. SAMOVA define grupos de poblaciones geográficamente homogéneas y diferenciadas al máximo entre sí. El conjunto de datos se dividió en grupos K ($K = 2, 3, \dots, 12$), maximizando la proporción de varianza genética total como resultado de las diferencias entre grupos de poblaciones (FCT) y obteniendo la configuración de K que exhibía el mayor valor FCT. La significancia ($\alpha = 0,01$) de este índice se evaluó con una prueba de permutación (10.000 permutaciones).

Se estimó el número de clusters, así como los límites espaciales entre ellos utilizando un modelo bayesiano calculado con el paquete GENELAND, Versión 4.0.0 (Guillot *et al.*, 2005) en el entorno R (R, Versión 3.0.2; Ihaka y Gentleman 1996). Este software implementa un procedimiento de Monte Carlo utilizando

cadena de Markov (MCMC) para determinar el mejor agrupamiento de muestras usando datos genéticos y geográficos. El análisis fue realizado para las 13 localidades. Se realizaron diez corridas independientes usando 10.000.000 MCMC de iteraciones, con una frecuencia de muestreo de 1.000 y un periodo de burn-in de 250. Un primer análisis fue realizado entre un $K_{min}= 1$ y un $K_{max}= 13$ clusters. Un segundo análisis se realizó considerando los dos valores de K más probables $K_{min}=1$ y $K_{max}= 5$ clusters, obtenidos del primer análisis.

Para determinar si existía estructuración filogeográfica se realizó el test de permutación con Permut (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/>) utilizando un ensayo analítico. Se evaluó si NST (Diferencias por pares de sitios polimórficos) era significativamente mayor que GST (Frecuencias de haplotipos) por comparación de los valores medidos de NST directamente, con los obtenidos después de 10000 permutación aleatorias (Jost, 2008).

Se evaluó la diferenciación genética entre pares de localidades de *Telmatobius chusmisensis* y por pares de Clusters definidos por los análisis del algoritmo median-joining, GENELAND, SAMOVA y F_{ST} pareado por localidades usando la región control del mtDNA en Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier et al., 2005) la significancia estadística fue definida utilizando 1.000 permutaciones.

Para evaluar si la distancia genética estaba relacionada con la distancia geográfica entre sitios después de controlar por la diferencia altitudinal, se realizó un Test de Mantel (Mantel, 1967) con el paquete Vegan en el entorno R (R, Versión 3.0.2; Ihaka y Gentleman 1996). En este análisis se utilizaron seis matrices: (1) F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) y (2) $F_{ST}/(1-F_{ST})$ (Rousset, 1997) basados en análisis de microsatélites, (3) F_{ST} (Wright, 1949) y (4) $F_{ST}/(1-F_{ST})$ basados en análisis de DNAm_t de la Región Control, (5) una matriz de distancia geográfica (distancia lineal entre localidades) y (6) una matriz de distancias altitudinales (distancia euclidiana en metros entre localidades). Para determinar la significancia de correlaciones entre matrices se realizaron 10.000 iteraciones. El análisis fue realizado para 12 localidades. El test de Mantel simple fue usado para evaluar la significancia de la relación entre F_{ST} y una variable predictora a la vez. Posteriormente, el test de Mantel parcial fue usado para determinar si el F_{ST} estaba relacionado significativamente con la distancia geográfica después de eliminar los efectos de la diferencia altitudinal.

Las inferencias de cambios demográficos del pasado en *T. chusmisensis* fueron estimadas mediante las pruebas D Tajima y de Fu's F_s (Tajima, 1989; Fu, 1997) utilizando DnaSP v5.10 (Librado & Rozas, 2009) y Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier et al., 2005), para evaluar el supuesto de neutralidad selectiva de secuencias de DNA mitocondrial y población en equilibrio mutación-deriva. Así, los valores negativos significativos para estas pruebas corresponderían a evidencia de exceso de polimorfismos raros en un población, lo que indicaría ya sea reciente

expansión demográfica o selección positiva (Tajima, 1989; González-Wevar et al., 2011). Adicionalmente se realizó el índice de Raggedness en el programa Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier et al., 2005), que es un prueba la validez de un modelo de expansión súbita basado en la suma de las desviaciones cuadradas entre el desajuste observado y esperado. Los valores no significativos de este índice significan que los datos no se desvían de lo esperado bajo el modelo de expansión es decir indican la expansión de la población.

Utilizando las secuencias del DNAm_t (Dloop), se construyó un distribución de diferencias entre pares de secuencias (mismatch distribution), para evaluar las señales de expansión en la historia demográfica de las poblaciones de *T. chusmisensis* utilizando el programa Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier et al., 2005), donde cambios bruscos de tamaño de la población generaron distribuciones unimodales (Rogers y Harpending, 1992). El número de diferencias observadas entre pares de secuencias de DNAm_t se compararon con la distribución esperada de las diferencias bajo una modelo demográfico específico (es decir, population growth-decline).

Para explorar la historia demográfica asociada con las secuencias de DNA en las poblaciones de *T. chusmisensis* se realizó un Skyline Plot en BEAST Software version 1.7 (Drummond et al., 2007). Este enfoque se basa en una genealogía inferida de secuencias de DNA y estima el tamaño efectivo de la población (N_e) en el tiempo, utilizando un enfoque bayesiano. Los modelos de

sustitución nucleotídica HKY+G+I y F81 fueron seleccionados por medio de AIC utilizando el programa JMODELTEST (Posada, 2008). El modelo de F81 no es implementado en BEAST, por lo que fue sobreparametrizado por el modelo HKY+G+I. El análisis se realizó utilizando el modelo de Log-normal no correlacionado, basado en la selección AIC implementado en TRACER, versión 1.6 (Drummond & Rambaut, 2007). Se realizaron búsquedas con este modelo especificando la tasa de cambio (0,7 mutaciones / sitio / MYR que corresponden, a distancia por pares de 7% MYR) sugeridas por Ho et al. (2007) y para la Región Control por Burrige et al. (2008). Para estimar los parámetros en la zona de convergencia, se corrieron 100 millones de generaciones, muestreando cada 10 mil generaciones y descartando el 25% de generaciones como burn-in. El resultado fue visualizado en TRACER, versión 1,6 (Drummond & Rambaut, 2007). Para este análisis no se tuvieron en cuenta los migrantes.

Se utilizaron métodos coalescentes para estimar las conectividades históricas entre las poblaciones de *T. chusmisensis*. Cuatro posibles modelos de flujo de genes fueron evaluados (Tabla 2) mediante MIGRATE-N v. 3.6 usando Markov basado en cadenas de Montercalo, este es un modelo que infiere parámetros poblacionales utilizando Máximo de Verosimilitud. Basado en la teoría de coalescencia a escala de mutación, estima las tasas de migración históricas entre las poblaciones asumiendo un modelo de matriz de migración (Beerli, 2006) (Tabla 2). La distribución marginal (probabilidad de que pase un evento X independiente de un evento Y) se estimara seguida de un ranking del factor

de Bayes (medida de preferencia para seleccionar un modelo sobre otro) de cada modelo de migración evaluado (Beerli y Palczewski, 2010). La genealogía de partida será tomada de un árbol UPGMA y los valores theta ($2Ne\mu$) inicial y de M (M/Ne ; migrantes por generación) se obtendrán a partir del cálculo F_{ST} . El static heating se aplicó a 4 cadenas independientes usando ajustes de temperatura de 1,0, 1,5, 3,0 y 1 000 000,0. Un total de 13500 de steps fueron corridos, registrando un valor cada 2700 generaciones, posteriormente 33750 fueron descartadas como burn-in. Se realizaron tres corridas independientes, evaluando un total de 1.093.500.000 genealogías. Los resultados se expresaron como el valor promedio de estas tres corridas independientes. Para hacer esta comparación posible, la tasa de migración histórica se escaló usando la fórmula $m = M \times \mu$, y la tasa de mutación utilizada fue 3×10^{-2} .

Tabla 2 Modelos de migración de las poblaciones de *Telmatobius chusmisensis* que se evaluarán en MIGRATE-n.

Modelo	Descripción
Migración (Full)	Flujo de genes entre todas las subcuencas.
Step stone 1	Solo las subcuencas más cercanas presentaran flujo de genes (Quebrada Aroma-Quebrada Tarapacá -Quebrada de Quipisca -Salar de Huasco-Loa Medio)
Division de Step stone 1	Solo las subcuencas más cercanas presentaran flujo de genes, sin flujo de genes entre (Quebrada Aroma-Quebrada Tarapacá-Quebrada Quipisca) y Loa Medio.
Division de Step stone 2	Solo las subcuencas más cercanas presentaran flujo de genes, sin flujo de genes entre (Quebrada Aroma-Quebrada Tarapacá-Quebrada de Quipisca) (Salar de Huasco y Loa Medio).

4.4 Análisis de datos con Microsatélites (SSR)

Para el análisis con los loci microsatélites (SSR), se diseñaron marcadores mediante secuenciación de DNA en la plataforma Ion Torrent chip 314 con un resultado de análisis de 644.686 lecturas, 90.324 microsatélites y 52.489 primers, servicio prestado por la empresa Omics Solutions Centro Nacional de Genómica y Bioinformática de Chile. Se obtuvo una lista de posibles partidores específicos para la amplificación de microsatélites en *Telmatobius chusmisensis*, de los cuales se solicitó la síntesis de un set de 72 pares de partidores microsatélites (dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos) a la empresa MacroGen Inc. (Corea). A continuación, se realizó la estandarización de las reacciones de PCR simples utilizando el protocolo descrito por Schuelke (2000), para el marcaje con fluoróforo de los fragmentos amplificados. La mezcla para la amplificación mediante PCR consistió en un volumen final de 15 μ l, compuesto por Buffer de PCR 1X, Cloruro de Magnesio 2,5 mM, solución de desoxiribonucleótidos 400 μ M, partidador Forward-M13 130 nM, partidador Reverse 130 nM, partidador Fluorescente 130 nM, 1 U de Taq DNA polimerasa y 60 ng de DNA. Luego se realizaron los ciclos térmicos que se detallan a continuación: un primer paso de desnaturalización de 3 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 56-58 °C (dependiendo de cada marcador SSR), 30 segundos a 72 °C. A continuación 8 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 52 °, 30 segundos a 72 °C, para terminar con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Finalmente, con el objetivo de determinar cuáles

marcadores SSR permitían identificar la presencia de múltiples alelos y así poder diferenciar entre las distintas poblaciones del presente estudio, se desarrolló una prueba de polimorfismo en 17 marcadores con amplificación específica. El análisis de polimorfismo consistió en la amplificación de tres muestras de cada una de las localidades incluidas en el presente estudio para cada marcador SSR. En este caso, el análisis de los fragmentos se realizó a través de electroforesis capilar, utilizando un secuenciador ABI PRISM 3730xl (Applied Biosystems) por el servicio de secuenciación de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Finalmente se seleccionaron 8 loci microsatélites polimórficos definitivos para el análisis de límites de distribución y flujo genético en las poblaciones de *Telmatobius chusmisensis* (Tabla 4).

Para definir la estructuración contemporánea de las poblaciones de *Telmatobius chusmisensis* se utilizaron los genotipos de los individuos, por medio de un análisis bayesiano implementado en STRUCTURE V 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Se analizaron de 1 a 13 grupos, realizando 20 diferentes corridas de 1.000.000 iteraciones de MCMC; se quemaron las primeras 250.000 iteraciones; estos parámetros fueron calculados para cada valor de K, bajo el modelo No aditivo (No Admixture model) (Pritchard et al., 2000). El número más probable de poblaciones K, fue determinado usando el valor de la verosimilitud de los datos observados, $\ln P(D)$ y la tasa de cambio de segundo orden del logaritmo de la verosimilitud de los datos en corridas diferentes de K (ΔK) descrito en Evanno et al., (2005). Adicionalmente se realizó un análisis en el

programa de GENECLASS versión 2 (Piry et al. 2004) para detectar los migrantes de primera generación entre las subcuencas e identificar los porcentajes de asignación a la subcuenca de captura.

Se analizó el grado de estructuración genética entre pares de poblaciones calculando los índices F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) en el programa GENETIX 4.05 (Belkhir et al. 2004). Para graficar las diferencias entre las poblaciones se realizó un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) en GENETIX 4.05. Para evaluar el aislamiento por distancia, se analizó la correlación entre las distancias genéticas y geográficas entre muestras (distancia genética media para cada unidad) mediante un Test de Mantel, similar al efectuado con los F_{ST} del análisis con la región control del DNAm_t.

Para estimar el flujo de genes contemporáneo, se realizó un análisis bayesiano utilizando el software de BAYESASS (Wilson y Rannala 2003). El software BAYESASS implementa inferencia bayesiana, la cual estima tasas de migración simétrica o asimétrica sobre las últimas dos o tres generaciones entre las poblaciones. Este análisis se realizó usando 30.000.000 iteraciones y una burn-in de 3.000.000 de iteraciones, con un muestreo hecho cada 100 iteraciones. Diez corridas independientes con diferentes seeds fueron realizadas para examinar la consistencia en los resultados. Los resultados se expresaron como el valor medio de estas diez corridas independientes.

5 RESULTADOS

Se usaron un total de 205 individuos de *T. chusmisensis* para el análisis con DNAm, provenientes de 13 localidades (Chiapa, Chijlla, Chusmiza, El Piga, Illalla, Laonzana, Lirima, Noasa, Choja, Collacagua, Salar de Huasco Huatacondo y Copaquire) todas de la zona precordillerana y cordillerana de la región de Tarapacá.

Se obtuvieron 811 pb de la Región Control del DNAm. Un total de 64 sitios polimórficos fueron encontrados entre 48 haplotipos, con una diversidad haplotípica de $\pi=0,918$ y el número promedio de diferencias entre pares de secuencias $\bar{d}=10,810$ (Tabla 3). Se realizaron análisis filogenéticos (MP, ML, IB) con las secuencias de la región control de *Telmatobius chusmisensis*, incluyendo secuencias de *Telmatobius marmoratus*, *Telmatobius pefauri* y *Telmatobius vilamensis*, para corroborar que los individuos correspondieran solo a *Telmatobius chusmisensis*. Se encontraron localidades de simpatria entre *Telmatobius chusmisensis* y *Telmatobius marmoratus*. Las localidades de Piga y Collacagua presentaron 3 y 14 individuos respectivamente, correspondientes a la especie *Telmatobius marmoratus*.

Tabla 3. Medidas de diversidad genética de *Telmatobius chusmisensis* a nivel de subcuenca, basadas en análisis mitocondrial de la Región Control.

DNAmt						
Subcuenca	n	Número de sitios polimórficos (S)	Numero de Haplotipos (K)	Diversidad Haplotípica (H)	Diversidad Nucleotídica (π)	Promedio de numero de diferencias entre pares de secuencias (Γ)
Total	205	64	48	0.918±0.13	0.01389	10.810
A Quebrada Tarapacá	64	31	20	0.863±0.001	0.00404	3.202
B Quebrada de Quípisca	12	18	6	0.682±0,021	0.00388	3.136
C Salar de Huasco	21	25	8	0.624±0.014	0.00331	2.629
D Quebrada Aroma	34	7	6	0.752±0.0012	0.00220	1.770
E Loa Medio	74	27	10	0.559±0.003	0.00295	2.330

Se genotipificó un total de 275 individuos. Los Locus TCh1232 y TCh2261 fueron monomórficos y TCh0796 resultaron en genotipado poco fiables sin concordancia entre amplificaciones independientes, por lo que no se incluyeron en los análisis posteriores (Tabla 4). La mayoría de poblaciones se desviaron del Equilibrio Hardy-Weinberg a excepción de Chiapa, Chijilla, Copaquire y Huatacondo, pero ya que este patrón no fue observado en la mayoría de los loci se incluyeron en los análisis (Tabla 5). El programa Micro-Checker 2.2.3 no pudo realizar el análisis binomial para algunos loci debido a que más del 50%

de los alelos en estos loci eran de un solo tipo de tamaño, sin embargo para el resto de los loci no identificó errores de genotipado, alelos nulos o pérdida de alelos en nuestros datos. Todos los individuos incluidos en los análisis amplificaron por lo menos cuatro loci, 208 de 275 individuos (75,7%) amplificaron todos los loci analizados. En la Tabla 5 se indican los valores de diversidad genética por localidad, se observa que las localidades de Huasco, Copaquire y Collacagua presentaron los mayores valores Heterocigosidad observada (H_o) y las localidades Choja y Noasa los de menor valor.

Tabla 4. Marcadores microsatélites analizados en las muestras recolectadas de *Telmatobius chusmisensis* con sus respectivas características. Ta = temperatura de annealing. pb = pares de bases nucleotídicas.

Locus	Motivo Repetido	Secuencia Partidor Forward (5'-3')	Secuencia Partidor Reverse (5'-3')	Fluoróforo	Ta (°C)	Tamaño alelos (pb)
Tch_2664	(TTC) ₄	ACATTGATTTATAGGGTAAC	TAAAATGTTACACCTGGTT	PET	56	118-121
Tch_2123	(AGAC) ₉	TACACAAACAAATCTAGTCTC	GAATCTGCTATTGTAGAGTAT	6-FAM	58	168-192
Tch_2517	(CAT) ₆	AGATGATGATAATGATGAAG	TAGTGATGAGGAGAGTGTAG	VIC	58	195-201
Tch_1971	(GCA) ₅	TTTTACTCACTTCAACCAG	AAAGTAATAAGCAACATCG	NED	56	198-213
Tch_1213	(ATT) ₄	TATAGAAAGCTTAGGTCAGTA	AACATCTGTATATGTGAAGTC	NED	58	145-172
Tch_976	(TATG) ₄	AGCATTTCTGTAATTATCTC	ACTTTTAATCAGATGTGAAC	VIC	58	204-212
Tch_968	(TCT) ₅	AAATCTGAAATTAGACTCCT	GTCACAGAGACAAGTATCG	6-FAM	58	215-221
Tch_2243	(TAG) ₅	AAGTGTGAACATAACCTTAC	GCTACTGAGGGATTATAGTA	PET	58	172-232

Tabla 5. Localidades y número de individuos muestreados, parámetros de variación genética determinadas del análisis de 8 loci microsatélites.

Localidad	N	H _o	H _e	F _{is}
Chusmiza	34	0.2904	0.4855	0.4116
Chiapa	29	0.3319	0.3608	0.0975*
Illalla	14	0.3214	0.3785	0.1867
Lirima	21	0.2619	0.4709	0.4632
Laonzana	16	0.2422	0.3831	0.3953
Noasa	16	0.2188	0.3176	0.3401
Collacagua	33	0.3977	0.4771	0.1812
Huasco	4	0.5313	0.4766	0.0228*
Piga	35	0.2821	0.5715	0.5170
Choja	2	0.0625	0.4531	0.9285
Chijlla	22	0.2330	0.2275	-0.0005*
Copaquire	24	0.4323	0.4117	-0.0288*
Huatacondo	25	0.3113	0.3700	-0.1688*

N: Número de individuos. FIS valores mostraron desviación significativa del EHW, con 10.000 permutaciones ($p < 0.01$); * $p < 0.01$, no significativo.

5.1 Patrones de estructuración filogeográfica

La red de haplotipos de DNAm_t (Figura 2) mostró una alta diversidad genética, 48 haplotipos fueron encontrados con una diversidad haplotípica de 0.918 (Tabla 3), se encontraron haplogrupos con una asociación no aleatoria correspondiente mayoritariamente a su origen geográfico a nivel de subcuencas. La subcuenca de Quebrada Tarapacá compuesta por las localidades de Chusmiza, Lirima y Laonzana, mostró dos haplotipos dominantes de mayor frecuencia con una forma predominante de estrella, es el grupo con mayor número de haplotipos ($n=20$) y mayor diversidad haplotípica (0.863 ± 0.001) (Tabla 3). Este grupo presentó haplotipos compartidos con la localidad Chijlla correspondiente a la subcuenca

Loa Medio. La subcuenca Quebrada de Quipisca presento el menor número de haplotipos ($n=6$) con una diversidad haplotípica de $0.682 \pm 0,021$, representada por la localidad de Noasa, con un haplotipo dominante y pocos pasos mutacionales. La subcuenca Salar de Huasco, presento un total de 8 haplotipos con una diversidad haplotípica menor que la Quebrada Quipisca (0.624 ± 0.014), pero con mayor distribución geográfica representada por las localidades de Salar de Huasco, Collacagua y Piga. La subcuenca Quebrada Aroma representada por las localidades de Chiapa e Illalla reporta un bajo número de haplotipos ($n=6$) pero una alta diversidad haplotípica (0.752 ± 0.0012), presentó haplotipos compartidos con la localidad de Lirima y pocos pasos mutacionales con la subcuenca de Loa Medio, esta última representada por las localidades más australes de la distribución de *T. chusmisensis*, Huatacondo, Copaquire, Chijilla y Choja, presentó dos haplotipos de mayor frecuencia y fue el grupo con la menor diversidad haplotípica (0.559 ± 0.003). Este haplogrupo presentó haplotipos compartidos con las localidades de Collacagua y Noasa correspondientes a las subcuencas de Quebrada de Quipisca y Salar de Huasco sugiriendo retención de polimorfismos por una posible conexión histórica. En general la red de haplotipos mostro conexiones con pocos pasos mutacionales entre localidades pertenecientes a las misma subcuenca (Figura 2).

El análisis de diferenciación genética realizado mediante el test de F_{ST} pareado por localidades muestra que todas las comparaciones fueron significativas, a excepción de las localidades Piga-Collacagua, Huasco-Collacagua y Copaquire-

Huatacondo, Copaquire-Chijlla, pertenecientes a la misma subcuenca Salar de Huasco y Loa medio respectivamente (Tabla 6).

Los coeficientes de NST (0.934 ± 0.02) fueron significativamente mayores que los valores de GST (0.334 ± 0.06) ($p < 0,05$), lo que sugiere que existe estructuración filogeográfica, donde pares de haplotipos de DNA mitocondrial de la misma población tienen una secuencia más similar que los pares de haplotipos de poblaciones diferentes y que dentro de una población es más probable encontrar haplotipos genéticamente relacionados que genéticamente distantes.

Tabla 6. Estimaciones de la diferenciación genética y Nst por pares de grupos genéticos basados en la Región Control. Valores significativos en negrita. Significancia al 5%, corrección de FDR.

	Chiapa	Illalla	Laonzana	Lirima	Chusmiza	Noasa	Collacagua	Piga	Huasco	Huatacondo	Chijlla	Copaquire
Chiapa	-	0.98586	11.67098	9.01963	11.71217	8.74254	8.34103	9.40088	9.48421	9.14831	5.46992	9.33421
Illalla	0.32159	-	13.04177	10.35939	13.06532	9.81593	8.62870	9.78022	9.78022	9.34432	5.78671	9.53022
Laonzana	0.84198	0.91725	-	0.51667	0.43009	6.57108	7.08623	7.34559	7.40441	18.96851	14.55109	19.15441
Lirima	0.70535	0.77143	0.14289	-	0.95874	5.33958	5.71932	5.97500	6.10000	16.58077	12.23420	16.76146
Chusmiza	0.77194	0.81505	0.11658	0.18766	-	6.58925	7.51569	7.84194	7.84731	18.99206	14.62716	19.17796
Noasa	0.73620	0.82053	0.73831	0.54665	0.63385	-	4.58460	4.97222	5.00000	15.39744	11.37662	15.58333
Collacagua	0.75130	0.83732	0.78723	0.58855	0.67967	0.59262	-	0.00000	0.00000	13.28296	9.83874	13.45265
Piga	0.71311	0.78063	0.72063	0.51752	0.64642	0.50703	0.04955	-	0.00000	15.56410	11.07359	15.75000
Huasco	0.77729	0.92059	0.84461	0.55142	0.66798	0.58915	0.0000	0.0000	-	15.56410	11.55844	15.75000
Huatacondo	0.86400	0.94215	0.95917	0.88851	0.89349	0.91756	0.92482	0.90695	0.97230	-	2.94073	0.00000
Chijlla	0.52895	0.56080	0.76656	0.67146	0.74450	0.66669	0.64789	0.61610	0.63297	0.47879	-	3.12662
Copaquire	0.86460	0.94769	0.96080	0.88604	0.91728	0.92604	0.90515	0.97772	0.0000	0.48206	0.88571	-

Valores de Fst entre pares de localidades se encuentran debajo de la diagonal y valores de Nst corregidos se encuentran sobre la diagonal.

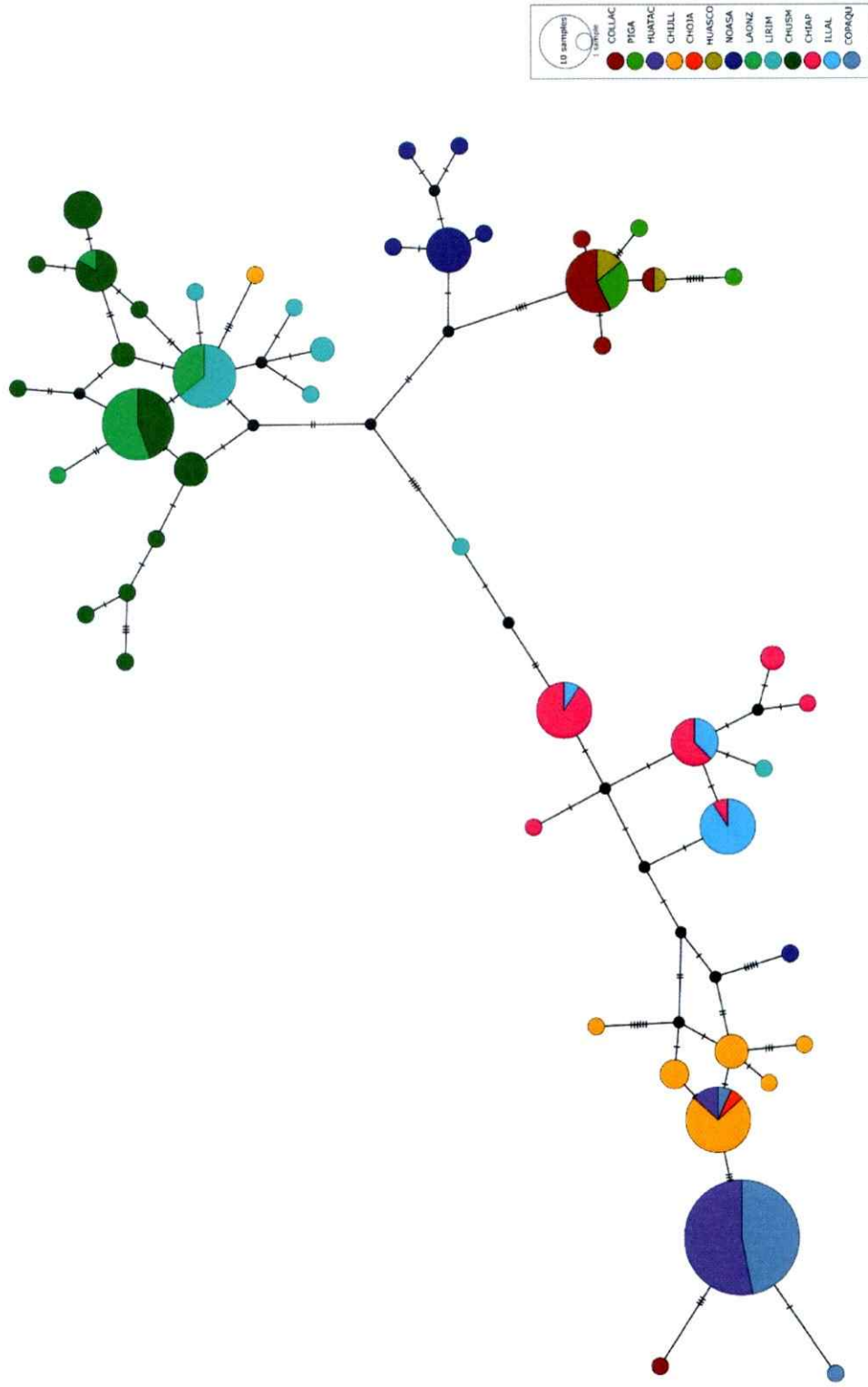


Figura 2. Median-Joining Network inferido a partir de muestras de la Región control del DNA mitocondrial. Subcuenca Tarapacá (Chusmiza-Lirima-Laonzana), Subcuenca Quebrada Quipisca (Noasa) , Subcuenca Salar Huasco (Salar de Huasco, Collacagua y Piga), Subcuenca Quebrada Aroma (Chiapa-Illalla),Subcuenca Loa medio (Copaquire-Huatacondo-Choja-Chijilla).

5.2 Estructuración genética y flujo genético entre poblaciones

El análisis de SAMOVA indicó cuatro grupos como la mejor agrupación (75,12% de la variación entre grupos), este ordenamiento agrupo individuos pertenecientes a la misma subcuenca (i) Chiapa, Illalla (ii) Laonzana, Chusmiza, Lirima, (iii) Huatacondo Chijlla y Copaquire; a excepción del grupo (iv) Noasa, Collacagua, Piga y Huasco; que agrupo a dos subcuencas latitudinalmente cercanas Quebrada Quipisca y Salar de Huasco. El segundo mejor grupo fue K = 5 grupos (74,10% de varianza entre los grupos), con la misma asociación pero diferenciando a Illalla como un quinto grupo. La localidad de Choja se eliminó de estos análisis debido al bajo número de individuos que presentaba.

Los resultados del análisis GENELAND apoyaron los resultados de estructuración entre las unidades poblacionales preestablecidas por el análisis de SAMOVA; el programa indicó cuatro poblaciones (K = 4) en toda la distribución (i) Quebrada Aroma, (ii) Quebrada Tarapacá, (iii) Quebrada Quipisca y Salar de Huasco y (iv) Loa medio, la probabilidad *a posteriori* explicada por este ordenamiento fue de un 57.43% (Figura 3).

Resumiendo, los resultados de las estimaciones de diferenciación genética entre pares de localidades, las relaciones genealógicas mediante el algoritmo de median-joining, el análisis de GENELAND y SAMOVA, se logran definir cuatro grupos genéticos ordenados principalmente a nivel de subcuencas a excepción del grupo establecido por las subcuencas Quebrada Quipisca y Salar de Huasco que corresponderían a una misma unidad genética.

El análisis de diferenciación genética realizado mediante el test de FST pareado por grupos genéticos muestra que todas las comparaciones fueron significativas, es importante destacar que el cluster establecido por las Subcuenca Loa Medio fue el que presento los valores de FST y NST más altos respecto al resto de grupos (Tabla 7).

Tabla 7. Estimaciones de la diferenciación genética y N_{ST} por pares de grupos genéticos realizado con la Región Control. Todos los valores fueron significativos. Significancia al 5%, con corrección de FDR.

Grupo	Aroma	Tarapacá	Quípisca_Huasco	Loa Medio
Aroma	-	11.13079	7.65040	7.27552
Tarapacá	0.76442	-	5.44936	16.24440
Quípisca_Huasco	0.64214	0.54117	-	11.75713
Loa Medio	0.69176	0,81357	0.73129	-

Valores de FST entre pares de grupos genéticos se encuentran debajo de la diagonal y valores de NST corregidos se encuentran sobre la diagonal.

El test de Mantel indicó una alta correlación entre la distancia genética y la geográfica estimada con los microsatélites y con región control del DNAMt (F_{ST} DNAMt de la región control, $r=0.4653$, $p < 0,05$; F_{ST} microsatélites, $r=0.4399$, $p < 0,05$), indicando una tendencia similar en los dos marcadores ($r = 0.5234$, $p < 0,05$) (Tabla 8). En el test de Mantel simple por parejas entre F_{ST} y otra variables a la vez (Distancia geográfica, diferencia altitudinal), solo la distancia geográfica fue predictor significativo del F_{ST} por pares de secuencias ($\alpha=0.05$). La correlación entre las distancias genéticas y geográficas usando las diferencias altitudinales como covariables por medio de un test de mantel parcial, fue significativa (F_{ST} DNAMt de la región control, $r=0.4594$, $p < 0,05$; F_{ST} microsatélites, $r=0.4267$, $p < 0,05$), a diferencia de las relaciones usando la distancia geográfica como covariable que no fueron significativas. Las correlaciones realizadas con $F_{ST}/(1-F_{ST})$ proporcionaron una correlación sistemáticamente más baja, y correlaciones parciales entre distancia genética y otras distancias (Tabla 8).

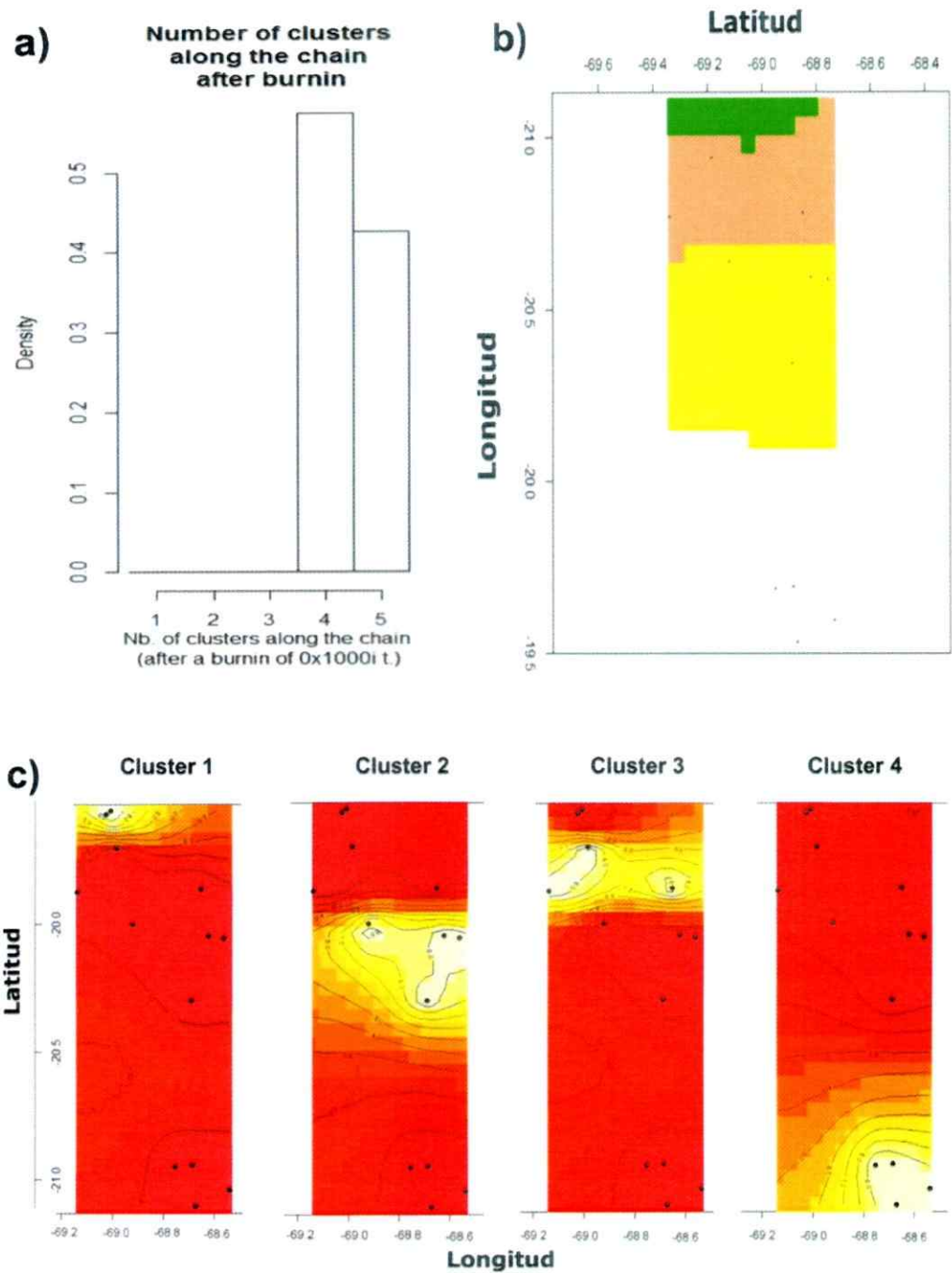


Figura 3. Análisis espacial de Geneland usando un modelo no correlacionado para datos de DNAmT de todas las muestras de *T. chusmisensis*. a) Número de poblaciones ($K=4$); b) Mapa de pertenencia de la población; c) Mapa de probabilidad posterior de pertenecer a diferentes clusters. Los círculos negros indican cada localidad. El sombreado más oscuro y más claro es proporcional a las probabilidades posteriores de pertenecer a los grupos, las áreas más claras (amarillas) muestran las probabilidades de pertenencia más altas de los grupos.

Tabla 8. Resultados de la Prueba de Mantel entre distancias genéticas y distancias físicas (distancia geográfica y diferencia de altitud).

Matriz 1	Matriz 2	Covariable	R	P-valor
Comparación de marcadores moleculares				
FST Microsatélites	FST DNAm CR	-----	0,5234	< 0,05
FST/(1-FST) Microsatélites	FST/(1-FST) DNAm CR	-----	0,0854	NS
Test de Mantel Simple				
FST mitocondrial RG	Distancia geográfica	-----	0,4653	< 0,05
FST mitocondrial RG	Diferencia altitudinal	-----	0,0940	NS
FST microsatélites	Distancia geográfica	-----	0,4399	< 0,05
FST microsatélites	Diferencia altitudinal	-----	0,2576	NS
FST/(1-FST) Microsatélites	Distancia geográfica	-----	0,3739	< 0,05
FST/(1-FST) Microsatélites	Diferencia altitudinal	-----	0,2679	NS
FST/(1-FST) Mitocondrial RG	Distancia geográfica	-----	0,3511	< 0,05
FST/(1-FST) Mitocondrial RG	Diferencia altitudinal	-----	-0,0279	NS
Test de Mantel Parcial				
FST mitocondrial RG	Distancia geográfica	Diferencia altitudinal	0,4594	< 0,05
FST mitocondrial RG	Diferencia altitudinal	Distancia geográfica	0,0442	NS
FST microsatélites	Distancia geográfica	Diferencia altitudinal	0,4267	< 0,05
FST microsatélites	Diferencia altitudinal	Distancia geográfica	0,2303	NS
FST/(1-FST) Microsatélites	Distancia geográfica	Diferencia altitudinal	0,3629	< 0,05
FST/(1-FST) Microsatélites	Diferencia altitudinal	Distancia geográfica	0,2426	NS
FST/(1-FST) Mitocondrial RG	Distancia geográfica	Diferencia altitudinal	0,3571	< 0,05
FST/(1-FST) Mitocondrial RG	Diferencia altitudinal	Distancia geográfica	-0,0748	NS

DNAm CR, DNA mitocondrial de la región control; *r*, coeficiente de correlación; NS, no significativo.

Los valores de migración histórica entre las poblaciones establecidas mediante SAMOVA y GENELAND se muestran en la Tabla 10. La comparación de los modelos de migración reveló que el modelo de *Step Stone 1* (Con flujo genético solo entre las subcuencas más cercanas) tuvo el mayor apoyo de los datos, con una diferencia de log de Bayes Factor difference $>10^5$ unidades relativas los otros modelos de migración (La diferencia de >10 unidades provee un fuerte soporte de un modelo sobre otro, Kass & Raftery 1995) (Tabla 9). Según los anteriores resultados, el principal escenario de migración histórica para las poblaciones analizadas muestra una prevalencia de tasas de migración asimétrica. Las mayores tasas de migración corresponden al flujo genético desde la Subcuenca Tarapacá a la Subcuenca Aroma que son poblaciones latitudinalmente cercanas (Tabla 10).

Tabla 9. Bayes Factor y Log probabilidad marginal para los modelos de flujo genético histórico de *Telmatobius chusmisensis*

Modelo	Beizer Lml	Harmonic Lml	LBF (Beizer)	Elección (Beizer)	Probabilidad del Modelo
Migración	-2225.165484	-1930.098013	-121.852244	3	3.46834×10^{-27}
Step stone 1	-2164.239362	-1923.414026	0.00	1 (Best)	1
Division de Step stone 1	-2248.827699	-2055.805778	-169.176674	4	1.83549×10^{-37}
Division de Step stone 2	-2196.795564	-2030.201534	-65.112404	2	7.26141×10^{-15}

Tabla 10. Tasa de migración histórica estimada para las poblaciones de *Telmatobius chusmisensis*.

Desde/Hacia	Aroma	Tarapacá	Quipisca	SHuasco	Loa Medio
Aroma	-	0.00	-	-	-
Tarapacá	5.427	-	0.00	-	-
Quipisca	-	0.00	-	0.00	-
SHuasco	-	-	0.00	-	0.00
Loa Medio	-	-	-	0.00	-

La diferenciación genética entre pares de localidades de *Telmatobius chusmisensis* usando SSR, mediante un test de F_{ST} pareado, mostró que la mayoría de comparaciones entre localidades fueron significativas, solo los pares de localidades Chiapa-Illalla, Chusmiza-Laonzana, Noasa-Laonzana, Huasco-Collacagua, Huasco-Piga, Huasco-Lirima no presentaron diferencias significativas (Tabla 11). En la Figura 4 (Análisis de correspondencia factorial, AFC), se distinguen claramente 6 grupos de localidades.

El análisis de STRUCTURE, presento altos valores de la verosimilitud de los datos observados $\ln P(D)$, entre $K=6$ y $K=11$ poblaciones. Se calculó el ΔK , para sucesivos valores de K (entre 1 y 13 clusters), lo que revela múltiples peaks para la estimación del K óptimo, dos de ellos presentan altos valores de ΔK , en $K=6$ ($\Delta K=114.274345$), y $K=10$ ($\Delta K=56.616820$), los otros valores de ΔK presentaron valores inferiores a 10 (Figura 5).

Tabla 11. Estimaciones de la diferenciación genética por pares de grupos genéticos basados en SSR. Valores significativos en negrita. Significancia al 5%, corrección de FDR.

Localidad	Chiapa	Ilalla	Laonzana	Lirima	Chusmiza	Noasa	Collacagua	Piga	Huasco	Huatacondo	Chijlla	Copaquire
Chiapa	-	0.0226	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0147	0.00	0.00	0.00	0.00
Ilalla	0.03729	-	0.00013	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Laonzana	0.39217	0.38136	-	0.00013	0.036	0.0127	0.00	0.00	0.0028	0.00	0.00	0.00
Lirima	0.36638	0.35124	0.12899	-	0.00	0.0002	0.00	0.00025	0.0334	0.00	0.00	0.00
Chusmiza	0.30711	0.30063	0.03588	0.16031	-	0.00013	0.00	0.00	0.0007	0.00	0.00	0.00
Noasa	0.45368	0.45083	0.05174	0.10352	0.11651	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Collacagua	0.33219	0.30422	0.35388	0.17197	0.32866	0.37129	-	0.4351	0.00	0.00	0.00	0.00
Piga	0.33080	0.30273	0.30374	0.11957	0.28448	0.31058	0.03619	-	0.4101	0.00	0.00	0.00
Huasco	0.36398	0.33036	0.32886	0.12776	0.27674	0.39128	0.0000	0.0000	-	0.00	0.00	0.00
Huatacondo	0.29928	0.29488	0.41036	0.42842	0.34620	0.51338	0.35225	0.34897	0.41031	-	0.00	0.00
Chijlla	0.47933	0.50160	0.48832	0.47899	0.34321	0.54497	0.46767	0.43410	0.49916	0.57782	-	0.00
Copaquire	0.19518	0.17488	0.32338	0.32131	0.28535	0.40841	0.26170	0.26792	0.28858	0.05963	0.51009	-

Valores de FST entre pares de localidades se encuentran debajo de la diagonal y valores de significancia o p-valor corregidos se encuentran sobre la diagonal.

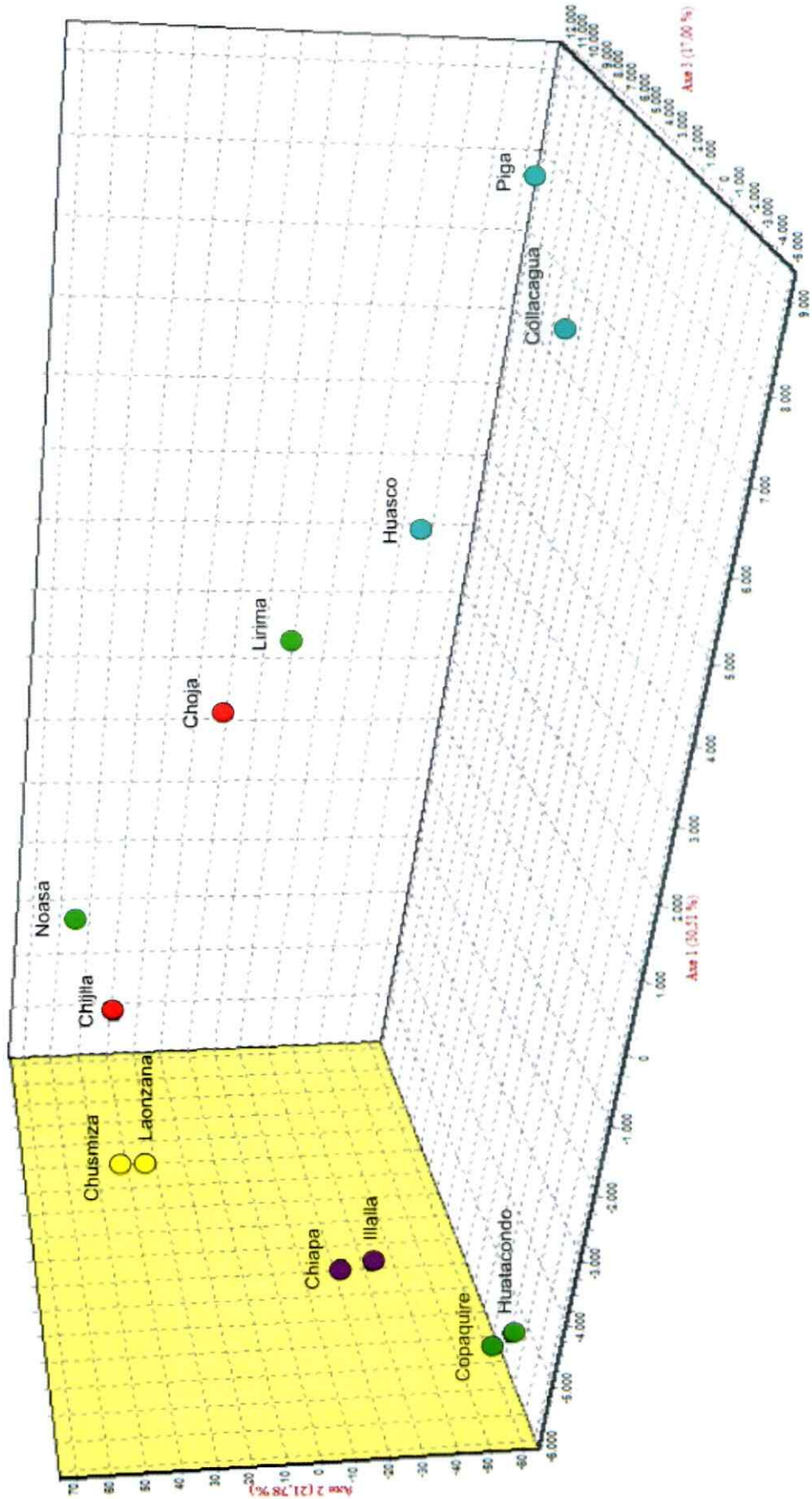


Figura 4. Tres primeros ejes de análisis factorial de correspondencia (AFC) basado en la variación alélica de cada localidad.

El gráfico de clasificación individual con los ordenamientos de clusters en $K=6$, que corresponden a los mayores valores de ΔK , se presenta en la Figura 5. En este es posible distinguir el ordenamiento de las localidades en clusters, que corresponden al número de poblaciones (K), se observa la diferenciación en su mayoría a nivel de la subcuencas, el primer grupo es conformado por Chiapallalla, Chusmiza-Laonzana Noasa-Lirima Huasco-Collacagua Copaquire-Huatacondo Chijlla y Choja; el grupo de localidades Chusmiza y Laonzana presentan una baja clasificación de individuos (Figura 6).

En general integrando los resultados de FST, análisis de correspondencia de AFC y estructuración genética mediante STRUCTURE, se logran definir seis grupos genéticos compuestos por Chusmiza-Laonzana, Noasa-Lirima ya que son más cercanos geográficamente y adicionalmente presentan cuerpos de agua que podrían estar conectado las dos subcuencas a las que pertenecen (Tarapacá y Quipisca); Huasco-Collacagua-Piga y Copaquire-Huatacondo que a pesar de que no presentaron diferencias genéticas significativas los valores de FST fueron muy bajos (Tabla 11) y se agruparon tanto en el análisis de AFC como en STRUCTURE (Figura 4 y 6); Chijlla que siempre se diferenció del resto de las localidades de la distribución sur de *T. chusmisensis* y Choja que no se pudo ubicar bien dentro de algún grupo genético debido al bajo tamaño muestral de la localidad.

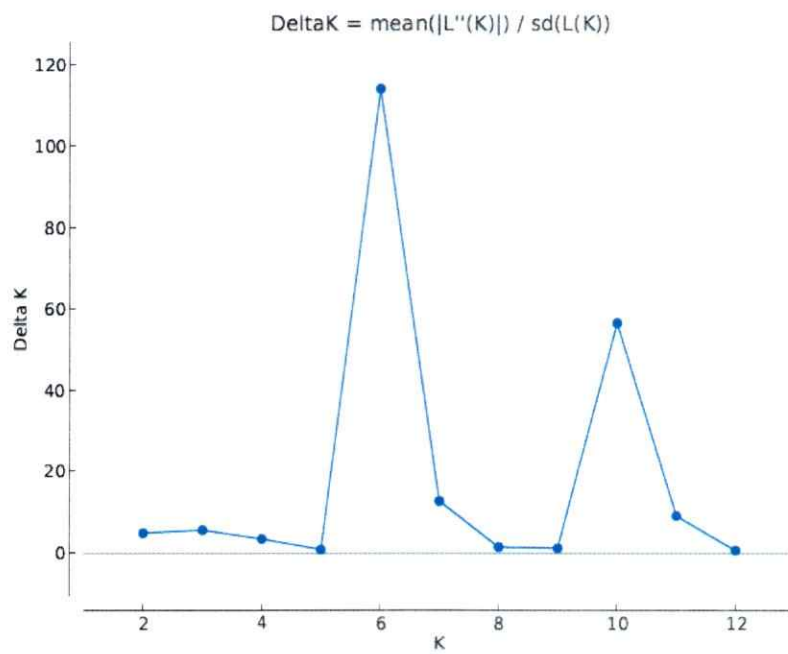
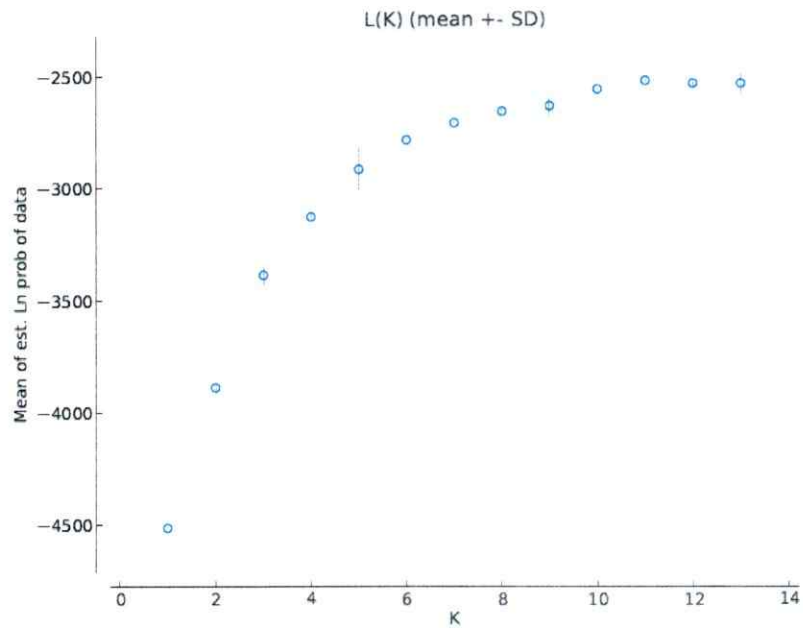


Figura 5. Arriba promedio de LnP (D); y Abajo ΔK por cada valores de K analizado, derecha. Índices según Evanno et al., 2005, calculados en STRUCTURE harvester. (Earl & von Holdt 2012).

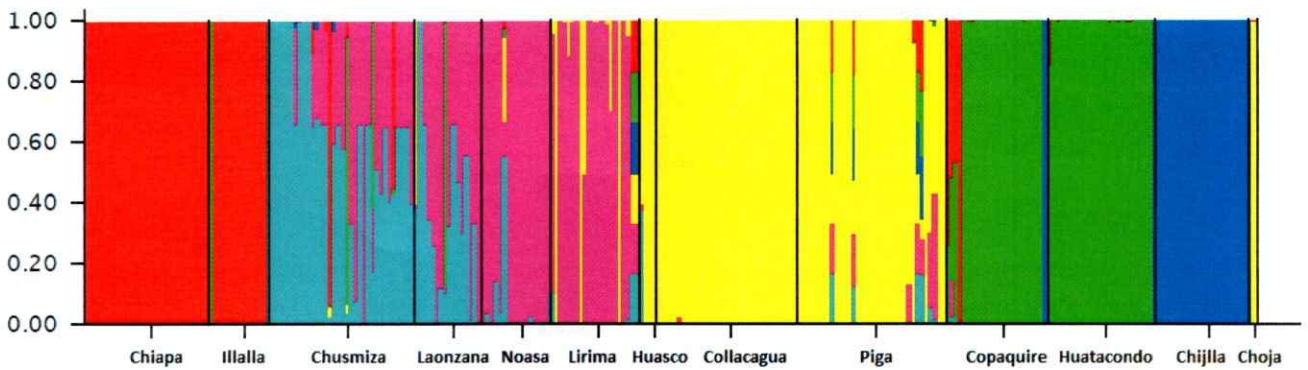


Figura 6. STRUCTURE, plot basado en 8 loci de Microsatélites en K= 6. Cada individuo es representado por una línea vertical dividida en segmentos de colores que representan los grupos o clusters (K), el eje Y muestra el porcentaje de pertenencia a cada clusters.

En la Tabla 12 se muestran las tasas de migración contemporáneas (últimas dos generaciones). La mayoría de estas tasas fueron inferiores a 0,04. Esto indicaría flujo bajo de individuos entre las subcuencas y que la mayor proporción de individuos en cada localidad tendría un origen local (tasas de origen > 0,6). Sin embargo, la subcuenca de Quipisca presentó tasas de migración importantes hacia subcuenca de Tarapacá (0,2779). Las pruebas de asignación de GENECLASS para la primera generación de migrantes (Tabla 13) confirmaron lo proporcionado por el programa BAYESASS, evidenciando los mayores porcentajes de asignación a la subcuenca de captura, a excepción de las subcuenca de Quipisca y Tarapacá.

Tabla 12. Tasas de migración contemporánea estimada con microsatélites, la primera columna corresponde a la localidad de origen, siguientes columnas localidad receptora de individuos, en negrita se muestran los valores superiores a 0,1.

Desde/Hacia	Sub Aroma	Sub Tarapacá	Sub Quipisca	Sub S. Huasco	Sub Loa Medio
Sub Aroma	0.9602	0.0077	0.0076	0.0076	0.0168
Sub Tarapacá	0.0048	0.9313	0.0364	0.0224	0.0051
Sub Quipisca	0.0152	0.2779	0.6961	0.0153	0.0154
Sub S. Huasco	0.0256	0.0047	0.0396	0.9252	0.0049
Sub Loa Medio	0.0073	0.0091	0.0086	0.0044	0.9707

Tabla 13. Resultados de las pruebas de asignación de la primera generación de migrantes como el porcentaje de individuos de la subcuenca muestreada asignados a cada subcuenca, en negrita se muestran los valores superiores a 15%.

Muestreado en / Asignado a	Sub Aroma	Sub Tarapacá	Sub Quipisca	Sub S. Huasco	Sub Loa Medio
Sub Aroma	97.68	0.00	0.00	0.00	6.15
Sub Tarapacá	0.00	74.03	6.25	2.77	0.00
Sub Quipisca	0.00	15.5	87.5	0.00	0.00
Sub S. Huasco	0.00	5.60	6.25	97.2	1.53
Sub Loa Medio	2.32	4.22	0.00	0.00	92.30

5.3 Análisis de historia demográfica

Los análisis de cambios demográficos en las poblaciones de *T. chusmisensis* se realizaron usando las secuencias de la Región Control. De acuerdo a los valores de F_s y Tajima's D solo el grupo de la subcuenca de Tarapacá de la distribución norte de la especie mostraron señales de expansión demográfica reciente, como lo sugieren los valores negativos significativos de F_s y no significativos de $Raggedness$ ($F_s = -4,89005$, $Raggedness = 0.01469$) (Tabla 14). Según lo sugerido por los gráficos de mismatch, la mayoría de poblaciones mostraron una tendencia hacia una distribución unimodal, correspondida con una desviación no significativa desde la curva esperada bajo el modelo de expansión demográfica. Los gráficos de mismatch mostraron valores bajos de distancias por pares de secuencias en todos los grupos (Figura 8). Solo la Subcuenca de Tarapacá presentó una forma de acuerdo con la significancia del índice de F_s y $Raggedness$ (hipótesis nula de expansión demográfica repentina no fue rechazada) (Tabla 3), reflejando señales expansión demográfica reciente. Para el resto de grupos nos podemos hablar de expansión poblacional pero tampoco de equilibrio demográfico ya que los patrones de distribución no correspondieron a desigualdades multimodales. La reconstrucción de los tamaños efectivos de la Subcuenca de Tarapacá con el Bayesian skyline plot indicó compatibilidad con una posible expansión poblacional posterior a los 13 000 años BP, alcanzando el tamaño de la población estable sólo 3000 años BP (Figura, 7). El resto de grupos nos presentaron cambios significativos en el tamaño efectivo de la población.

Tabla 14. Test de neutralidad selectiva, población en equilibrio mutación-deriva de *Telmatobius chusmisensis*, a nivel de subcuencas basadas en análisis mitocondrial de la Región Control.

*Significancia al 5%, ($p < 0,05$).

DNAmt				
Cluster	<i>n</i>	Tajima's D	Fu's Fs	Índice de Raggedness
Total	205	-0.14666	-5.00970	0.01950
A Quebrada Tarapacá	64	-1.4641	-4.89005*	0.01469
B Quebrada de Quipisca_Salar de Huasco	12	-1.2160	-0.82364	0.09808
C Quebrada Aroma	34	-0.56595	0.33950	0.06640
D Loa Medio	74	-1.59566	0.14572	0.26330

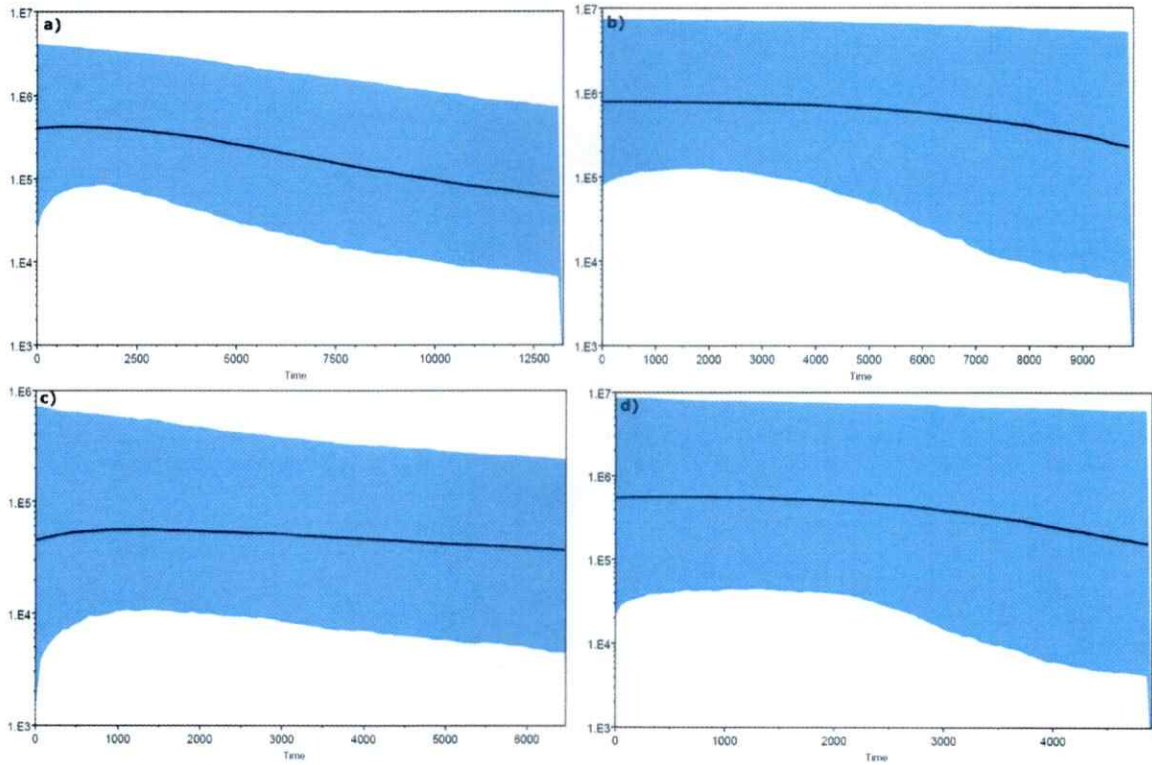


Figura 7. Reconstrucción de la historia demográfica utilizando el fragmento de la Región Control del DNAm_t de *Telmatobius chusmisensis*, usando Bayesian Skyline plot. Eje x: intervalo de tiempo reconstruido en el período 0-13 mil años BP. Eje y: reconstrucción del tamaño efectivo de la población en escala logarítmica. La línea negra es la estimación media del tamaño de la población con el tiempo. La región en azul representa las regiones de densidad posterior más altas del 95%. a) Subcuenca Tarapacá, b) Subcuenca Quipisca_SalarHuasco, c) Subcuenca Aroma d) Subcuenca Loa Medio. La Subcuenca de Tarapacá marca el inicio de la expansión poblacional, aproximadamente 10000-12500 años BP.

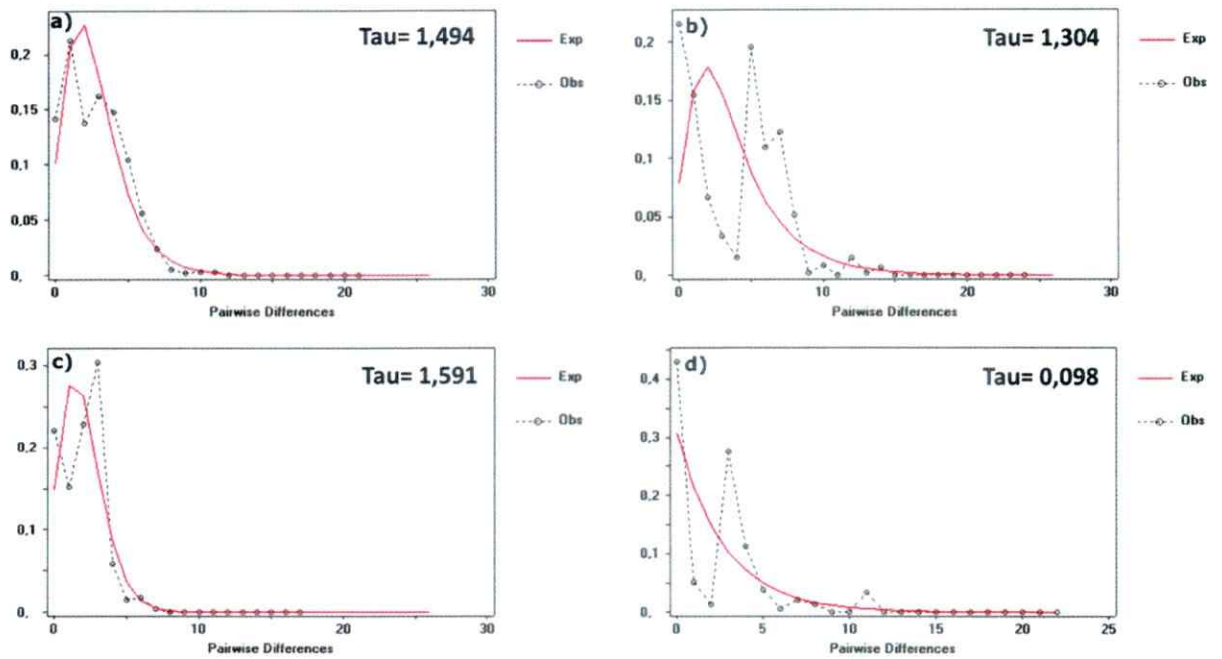


Figura 8. Distribución de mismatch de las secuencias de *Telmatobius chusmisensis* en los diferentes grupos genéticos establecidos por SAMOVA y GENELAND. a) Subcuenca Tarapacá, b) Subcuenca Quipisca_SalarHuasco, c) Subcuenca Aroma d) Subcuenca Loa Medio.

6 DISCUSIÓN

Los análisis de estructuración genética con el marcador mitocondrial (Dloop) coinciden en la determinación de cuatro grupos genéticos para *Telmatobius chusmisensis*, identificando un patrón de asociación correspondiente en su mayoría a su origen geográfico a nivel de subcuencas 1) Quebrada Aroma 2) Quebrada de Tarapacá 3) Quebrada Quipisca-Salar de Huasco 4) Loa Medio. Esta estructuración podría deberse a la alta diferenciación de ecotonos de las subcuencas, capacidades de dispersión restringidas (Rowe et al., 2000; Beebee, 2005) alta filopatría, conservadurismo de nicho dominante en anfibios (Wiens et al., 2005; Guarnizo et al 2009) y predominancia de sistemas endorreicos en estas zonas, topografía e hidrología de la zona (Vila, 1975; Collado et al., 2013; Cruz-Jofré et al., 2015).

Una incipiente divergencia entre poblaciones del sur de la distribución correspondientes a la subcuenca Loa medio, respecto al resto de subcuencas podría reflejar un nuevo linaje independiente, dados los patrones de diferenciación genética (Tabla 7) y flujo genético restringido coincidentes con la discontinuidad geográfica (Figura 6). Adicionalmente, el marcador mitocondrial indicó haplotipos compartidos entre la Subcuenca de Tarapacá y la localidad de Chijlla, Subcuenca Aroma con la localidad de Lirima, y Subcuenca Loa medio con las localidades de Noasa y Collacagua. Esto podría ser explicado por dos escenarios: 1) flujo génico entre las poblaciones y 2) por posibles procesos de retención de polimorfismos (Funk & Omland, 2003). Si bien, es complejo conocer con exactitud a cuál de las

dos causas se debe este patrón, considerando que los haplotipos compartidos son tan escasos y de zonas geográficas lejanas, la explicación más parsimoniosa para este patrón es que se trate de retención de polimorfismo ancestrales.

Un probable escenario climatológico, hidrológico y biogeográfico de los posibles eventos de dispersión y colonización de las poblaciones de *Telmatobius chusmisensis*, se relacionan con la detección de descargas perennes de agua desde la Quebrada Maní cercana a Huasco en la zona cordillerana hacia la Pampa de Tamarugal (Nester et al., 2007; Latorre et al., 2012), procesos que pudieron haberse replicado a lo largo de la cordillera y ocurrido más de una vez en el tiempo, como consecuencia de incrementos de precipitación durante el Pleistoceno a mayor altitud y fluctuaciones en la isoterma 0°C (Morales et al., 2011; Placzek et al., 2013). Esto habría generado descargas de agua desde zonas altas a zonas precordilleranas, que fomentarían diversos procesos de dispersión y efecto fundador, promoviendo la diferenciación entre las poblaciones precordilleranas y cordilleranas de la distribución de *T. chusmisensis*. La información obtenida del presente estudio en poblaciones de *T. chusmisensis*, permite inferir en términos generales que las poblaciones precordilleranas como la subcuenca de Quebrada de Tarapacá, probablemente pudieron acumular grandes diferencias genéticas (Tabla 3), causadas por el flujo asimétrico entre poblaciones de mayor altitud a menor altitud.

Los resultados de flujo genético histórico nos sugieren una conexión asimétrica entre las subcuencas de Aroma y Tarapacá (Tabla 9), actuando la Subcuenca de Tarapacá como una población fuente y Subcuenca Aroma como población sumidero. Probablemente esta conexión habría ocurrido, durante los períodos postglaciales, debido a un aumento en la precipitación del área producto del "Central Andean (or Atacama) Pluvial Event" que se habría instaurado entre los 18000-11000 B.P (Gayo et al., 2012) elevado el nivel y cobertura de agua de los lagos (eg. Lago Tauca) (Geyh et al., 1999), y la inundación o saturación de amplias zonas que generó masas de agua y zonas húmedas extendidas (Ochsenius, 1986; Maldonado y Rozas, 2008).

Las fluctuaciones ambientales entre periodos secos y húmedos en el altiplano (Ochsenius, 1986; Victoriano et al., 2015) habrían jugado un rol importante en la conectividad y/o estructuración reportada en *T. chusmisensis*. Caracterizado principalmente por un ciclo húmedo que se habría instaurado de 14 000 a la 11 000 años BP, mientras que durante el Holoceno alrededor de los 7000 años BP las condiciones climáticas habrían sido extremadamente áridas, lo que derivó a cambios constantes y diversas condiciones climáticas inestables de temperatura y humedad (Villagrán, 1993; Latorre et al., 2002; Maldonado et al., 2005; Maldonado y Rozas, 2008; Placzek et al., 2011; Gayo et al., 2012). Esto habría causado la inestabilidad de las poblaciones de *T. chumisensis* (Duellman 1982), especialmente durante los períodos secos, propiciando la fragmentación, baja conectividad y disminución poblacional traducida a eventos potenciales de cuello

de botella. Tal sería el caso de la Subcuenca de Tarapacá. Según la reconstrucción del Bayesian skyline plot se indica compatibilidad con una posible expansión poblacional posterior a los 13 000 años BP, alcanzando el tamaño de la población estable sólo 3000 años BP (Figura, 7), lo que se relaciona con estos escenarios paleoclimáticos e hidrológicos de ciclos húmedos como el CAPE (Gayo et al., 2012) en la zona precordillerana y secos como lo descrito por Latorre et al. (2002) y Placzek et al. (2013).

Los análisis genéticos utilizando los 8 loci de microsatélites, permiten identificar seis grupos de localidades claramente diferenciables, con los índices de F_{ST} , el análisis factorial de correspondencia (AFC) y el resultado de estructuración genética estimado en STRUCTURE (Figura 4 y 6). Estos grupos se encuentran, organizados de forma distinta a lo reportado por el marcador mitocondrial. Las principales diferencias que se muestran en estas localidades con los marcadores nucleares también se encuentran correlacionadas con el aislamiento geográfico. Esto se corrobora con las pruebas de Mantel que reportan una correlación significativa entre la distancia geográfica y la diferenciación genética entre localidades. Se logran identificar como primera unidad genética a Chiapa-Ilalla de la misma subcuenca, Chusmiza-Laonzana, Noasa-Lirima, Huasco-Collacagua-Piga, Copaquire-Hutacondo, Chijilla y Choja. Las localidades en general se encuentran correlacionados a nivel de subcuencas y estas conexiones entre localidades pertenecientes a la misma subcuenca, presumiblemente ocurren de forma asimétrica desde zonas más alta a zonas más bajas, pudiendo ser

explicadas por la existencia de conexiones contemporáneas temporales entre estos sistemas endorreicos. Según los resultados de flujo genético contemporáneo las poblaciones de los extremos de la distribución como la Subcuenca Aroma y la Subcuenca de Loa Medio no presentaron flujo genético con el resto de subcuencas, mientras que las poblaciones del centro de la distribución de la especie presentarían flujo genético específicamente entre las subcuencas de Quipisca y de Tarapacá (Tabla 12 y 13) probablemente entre las localidades de Noasa y Lirima (Figura 6) que son las más próximas latitudinalmente y podrían estar conectadas por diversos cuerpos de agua. En general, el escenario de flujo genético contemporáneo dentro de las subcuencas y entre subcuencas podría explicarse por recurrentes periodos húmedos inestables en el altiplano mediados por eventos intensos de lluvia como "Invierno Altiplánico" o monzón Sudamericano durante el verano austral (diciembre a marzo) (Zhou & Lau, 1998) y Oscilación del Sur-El Niño (ENOS) (Maldonado & Rozas 2008) que incrementan los niveles de agua, generando corredores que permiten la dispersión entre diferentes sectores y flujo genético entre algunas poblaciones que están aisladas, similar a lo descrito para el complejo *T. marmoratus* (Victoriano et al., 2015).

Los grupos genéticos más probables entregados por los modelos de estructuración poblacional con los marcadores nucleares (STRUCTURE) concuerdan con los seis grupos genéticos encontrados en el análisis factorial de correspondencia (Figura 4 y 6). La clasificación de algunos individuos del programa STRUCTURE de localidades de la distribución del norte en las poblaciones del sur podrían ser explicador por procesos de homoplasia donde a pesar de que dos alelos tengan el

mismo tamaño (pb) esto no es debido a que sean idénticos, sino que se adquirieron de forma independiente por azar (Primmer & Ellergren, 1998).

Los marcadores nucleares muestran una variación que sugiere que la subcuenca Loa Medio del sur de la distribución ha sido aislada recientemente. La asignación bayesiana mediante STRUCTURE y el FST pairwise con microsatélites muestra flujo genético restringido y diferencias significativas entre la Subcuenca Loa Medio (Choja, Chijlla, Huatacondo y Copaquire) con las poblaciones del norte la distribución (Subcuencas Quebrada Aroma, Quebrada de Tarapacá, Quebrada Quipisca, Salar de Huasco) (Tabla 11, Figura 6). Estos datos podrían sugerir a esta subcuenca como una posible Unidad Evolutiva significativa (ESU) *sensu stricto* Waples (1995), que ha comenzado a generar diferencias genéticas, producto de su posición geográfica lo que impide que se conecte a las subcuencas del norte de la distribución de la especie, tomando gran importancia en términos de conservación.

Por otra parte, existen diversos factores que pueden amenazar la viabilidad de una población y con frecuencia pasan desapercibidos, este es el caso de la localidad de Chijlla, que sufrió alteración de su diversidad genética debido a procesos de translocación. Las translocaciones se están proponiendo cada vez más como una forma de conservar la biodiversidad, particularmente en el manejo de especies amenazadas y claves, con los objetivos de mantener la biodiversidad y la función de los ecosistemas dado el aumento de fragmentación del hábitat y el cambio climático (Weeks et al., 2011). Sin embargo, sin el conocimiento previo de la

estructura genética de la especie, esta intervención tiene consecuencias importantes tales como pérdida de diversidad, depresión por exogamia e hibridación de distintos linajes evolutivos divergentes (Huff, 2011; Rymer et al., 1996). Así, el conocimiento detallado de la población y de la estructura genética de una especie es esencial antes de la iniciación de programas dirigidos como el rescate genético (Keely et al., 2015). Estos generan pérdida de diversidad significativa como fue el caso esta localidad (Tabla 4, Figura 6) que podrían llevar a cuellos de botella poblacionales por efectos de la deriva genética (Mock et al., 2004; Wright et al., 2014).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos postular que los eventos alopátricos corresponderían al principal mecanismo de divergencia para explicar la actual distribución de *Telmatobius chusmisensis*. Los eventos alopátricos ya han sido postulados para la zona altiplánica en diversos organismos, como el caso de caracoles del género *Biophalaria* y *Heleobia*, (Cei, 1986; Guarnizo et al., 2009; Morales et al., 2011; Vila et al., 2013; Saez et al., 2014), y peces de la especie *Orestias ascotanus* donde reportan cuatro grupos genéticos que corresponden a las vertientes V1, V2-V7, V8-V10 y V11, con una unidad evolutiva significativa (ESU) que presenta altas diferencias genéticas (Cruz-Jofre, 2015), datos que al igual que los reportados para *T. chusmisensis* estarían siendo explicados por el aislamiento geográfico.

Tabla 15. Tabla de resumen de hipótesis y resultados del trabajo realizado.

Hipótesis	Resultados
<p>Las poblaciones de <i>Telmatobius chusmisensis</i> presentan una baja conectividad entre subcuencas, dada su baja vagilidad.</p>	<p><i>T. chusmisensis</i> presentó un alto grado de estructuración genética. Los marcadores mitocondriales y nucleares mostraron cuatro y seis grupos principales respectivamente con una asociación en su mayoría correspondiente a su origen geográfico a nivel de subcuencas. Las principales diferencias que se muestran en estas poblaciones se encuentran correlacionadas con la restricción al sitio de origen dada la alta filopatría, baja vagilidad de estos organismos y el aislamiento geográfico dominante en la zona.</p> <p>Un grupo independiente y nuevo (Subcuenca Loa Medio) se reporta para <i>Telmatobius chusmisensis</i>. Este nuevo grupo ha comenzado a generar diferencias genéticas, producto de su posición geográfica, lo que impide que se conecte a las subcuencas del norte de la distribución de la especie y estaría en proceso de diversificación, por lo cual toma gran importancia en términos de conservación, pudiendo definirse como una nueva Unidad evolutiva significativa (ESU).</p> <p>Los eventos alopátricos corresponderían al principal mecanismo de divergencia para explicar la actual distribución de <i>Telmatobius chusmisensis</i>. Adicionalmente los resultados de flujo genético histórico permiten identificar como mejor escenario al <i>Step Stone</i>, donde el flujo genético entre subcuencas se dio entre las poblaciones más próximas latitudinalmente, permitiendo identificar el rol que juega la fragmentación de hábitat en la distribución de esta especie.</p>

Hipótesis	Resultados
<p>Las poblaciones <i>T. chusmisensis</i> presentan procesos de dispersión asimétricos desde zonas cordilleranas hacia zonas precordilleranas.</p>	<p>La subcuena Quebrada de Tarapacá con distribución precordillerana, fue la población que presentó la mayor diversidad genética y el mayor número de haplotipos. Lo anterior es soportado por el patrón en forma de estrella en los análisis de la red de haplotipos que surgieren que esta población está en expansión. A diferencia de esta última población, las poblaciones cordilleranas correspondientes a la subcuena Salar de Huasco, presentaron una baja diversidad genética y menor número de haplotipos. Estos resultados se deben probablemente al flujo asimétrico que se genera del arrastre de ríos llevando más individuos (haplotipos) de zonas de mayor altitud a zonas de menor altitud, lo que impide la homogenización entre las dos poblaciones, propiciando la formación de haplotipos únicos en las poblaciones de menor altitud.</p>
<p>Los periodos húmedos durante el UMG habrían promovido el aumento poblacional de <i>T. chusmisensis</i>.</p>	<p>Las fluctuaciones ambientales entre periodos secos y húmedos en el altiplano habrían jugado un rol importante en la conectividad y/o estructuración reportada en <i>T. chusmisensis</i>. Caracterizado principalmente por un ciclo húmedo que se habría instaurado de 18 000 a la 11 000 años BP (CAPE), mientras que durante el Holoceno alrededor de los 7000 años BP las condiciones climáticas habrían sido extremadamente áridas, lo que derivó a cambios constantes y diversas condiciones climáticas inestables de temperatura y humedad. Los análisis de cambios demográficos nos permiten inferir que la población perteneciente a la subcuena Quebrada de Tarapacá presentó señales expansión demográfica reciente. Además, la reconstrucción de los tamaños efectivos con el Bayesian skyline plot indicó compatibilidad con una posible expansión poblacional posterior a los 13 000 años BP, alcanzando el tamaño de la población estable sólo 3000 años BP, lo que se relaciona con estos escenarios paleoclimáticos e hidrológicos de ciclos húmedos y secos en el altiplano durante el UMG, iniciando una expansión cuando las condiciones de humedad fueron favorables debido a procesos de desglaciación que contribuyeron en la formación de extensas zonas de humedad.</p>

7 CONCLUSIONES

Telmatobius chusmisensis presenta cuatro grupos genéticos con el marcador mitocondrial y seis grupos genéticos con los marcadores nucleares, esos patrones se explican por el aislamiento geográfico entre las subcuencas, la restricción al sitio de origen dada la alta filopatría y baja vagilidad de estos organismos.

Los datos de DNA mitocondrial revelaron un patrón filogeográfico claro con separación moderada entre las poblaciones del norte y del sur. Se identificó una expansión demográfica reciente para uno de los grupos más meridionales (Subcuenca Quebrada de Tarapacá), presumiblemente debido las fluctuaciones ambientales entre periodos secos y húmedos en el altiplano, luego del último período glacial 20000-7000 años BP.

La homogenización dentro de subcuencas estaría mediada por eventos de dispersión actuales generados por el Monzón sudamericano y ENSO, que permite el flujo asimétrico desde zonas de mayor altitud a zonas de menor altitud. Y los eventos de dispersión históricos estaría atribuidos al CAPE por aumentos en la precipitación que fomentarían el flujo genético entre subcuencas.

Un grupo independiente y nuevo (Subcuenca Loa Medio) se reporta para *Telmatobius chusmisensis*, que estaría en proceso de diferenciación por lo cual toma gran importancia en términos de conservación.

8 RECURSOS MATERIALES Y FINANCIAMIENTO.

Este proyecto conto con el apoyo de: a) El proyecto de Fondecyt 1140540 desarrollado en el Laboratorio de Genética y Evolución de la Universidad de Chile (GEVOL), cuyo investigador responsable es el Dr. Marco A. Méndez y b) La Beca de Magister IEB 2015 otorgada por el Instituto de Ecología y Biodiversidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Avise JC. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, United Kingdom. 447 pp.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Barrionuevo, J. S. & D. Baldo. 2009. A new species of *Telmatobius* (Anura, Ceratophryidae) from Northern Jujuy Province, Argentina. *Zootaxa*, 2030, 1-20.
- Beebee, T. J. C. 2005. Conservation genetics of amphibians. *Heredity*, 95(6), 423-427.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & F. Bonhomme. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Beerli, P. 2006. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics*, 22(3), 341-345.
- Beerli, P., & Palczewski, M. 2010. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics*, 185(1), 313-326.
- Burridge, C. P., Craw, D., Fletcher, D., & Waters, J. M. 2008. Geological dates and molecular rates: fish DNA sheds light on time dependency. *Molecular Biology and Evolution*, 25(4), 624-633.

- Cadena, C. D., Kozak, K. H., Gomez, J. P., Parra, J. L., McCain, C. M., Bowie, R. C.,... & Graham, C. H. 2011. Latitude, elevational climatic zonation and speciation in New World vertebrates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 20(1), 215-219.
- Cei JM. 1986. Speciation and adaptative radiation in Andean Telmatobius frogs. In: Vuilleumier F, Monasterio M, eds. High altitude tropical biogeography. New York: Oxford University Press, 374–386.
- Collado, G. A., Vila, I., & Méndez, M. A. 2011. Monophyly, candidate species and vicariance in *Biomphalaria* snails (Mollusca: Planorbidae) from the Southern Andean Altiplano. *Zoologica Scripta*, 40(6), 613-622.
- Collado, G. A., Valladares, M. A., & Méndez, M. A. 2013. Hidden diversity in spring snails from the Andean Altiplano, the second highest plateau on Earth, and the Atacama Desert, the driest place in the world. *Zoological Studies*, 52(1), 50.
- Correa, C., Pastenes, L., Sallaberry, M., Veloso, A., & Méndez, M. A. 2010. Phylogeography of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) in northern Chile. *Amphibia-Reptilia*, 31(1), 85-96.
- Cruz-Jofré, F., Morales, P., Vila, I., Esquer-Garrigos, Y., Hugueny, B., Gaubert, P.,... & Méndez, M. A. 2015. Geographical isolation and genetic differentiation: the case of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), an Andean killifish inhabiting a highland salt pan. *Biological Journal of the Linnean Society*, 11(1), 80-86.

- Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2571-2581.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 214.
- Duellman, W.E., 1999. Patterns of Distribution of Amphibians: A Global Perspective. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Earl, D. A. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361.
- Esquer-Garrigos, Y., Hugueny B., Koerner K., Ibañez C., Bonillo C., Pruvost P., Causse R., Cruaud C. & P. Gaubert. 2013. Non-invasive ancient DNA protocol for fluid-preserved specimens and phylogenetic systematics of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Zootaxa*, 3640 (3), 373–394.
- Evanno, G., Regnaut S. & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8), 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online* 1(1), 47–50.
- FAO, 2014. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Cordillera de Los Andes, una oportunidad para la integración y desarrollo de América del Sur. 124 pp.

- Formas, J. R., Benavides, E., & Cuevas, C. 2003. A new species of *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from río Vilama, northern Chile, and the redescription of *T. halli* Noble. *Herpetologica*, 59(2), 253-270.
- Formas, J. R., Cuevas, C. C., & Nuñez, J. J. 2006. A new species of *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from northern Chile. *Herpetologica*, 62(2), 173-183.
- Freeland JR. 2005. Molecular ecology. John Wiley & Sons, Ltd., London, United Kingdom. 388 pp.
- French N, Yu S, Biggs P, Holland B, Fearnhead P, Binney B, Fox A, Grove-White D, Leigh JW, Miller W, Muellner P, Carter P. 2013. Evolution of *Campylobacter* species in New Zealand. In: SK Sheppard, G Méric, editors. *Campylobacter Ecology and Evolution*. Chapter 17. Norfolk: Horizon Scientific Press, 221–240.
- Frost, D. R. 2011. Amphibian species of the world: an online reference. *Version*, 5(31), 01.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Funk, D. J., & Omland, K. E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 397-423.
- Funk, W. C., Murphy, M. A., Hoke, K. L., Muths, E., Amburgey, S. M., Lemmon, E. M., & Lemmon, A. R. 2016. Elevational speciation in action? Restricted gene

flow associated with adaptive divergence across an altitudinal gradient. *Journal of evolutionary biology*, 29(2), 241-252.

Gayo, E. M., Latorre, C., Jordan, T. E., Nester, P. L., Estay, S. A., Ojeda, K. F., & Santoro, C. M. 2012. Late Quaternary hydrological and ecological changes in the hyperarid core of the northern Atacama Desert (~ 21 S). *Earth-Science Reviews*, 113(3), 120-140.

Geyh, M.A., Grosjean, M., Núñez, L., Schotterer, U., 1999. Radiocarbon reservoir effect and the timing of the late-Glacial/Early Holocene humid phase in the Atacama Desert (northern Chile). *Quaternary Research* 52, 143–153.

González-Wevar, C. A., David, B., & Poulin, E. 2011. Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58(1), 220-229.

Grosjean, M., Graf, K., Messerli, B., Romero, H., Schereir, H., Schouer, U. & Vuille, M. 1991. Cambio climático y dinámica de los recursos naturales del norte de Chile durante el último período glacial. y el Holoceno- Primera Síntesis. Taller Internacional sobre Geoecología de los Andes. Santiago. Octubre-noviembre 1991: pp. 22-23.

Guarnizo, C. E., Amézquita, A., & Bermingham, E. 2009. The relative roles of vicariance versus elevational gradients in the genetic differentiation of the high Andean tree frog, *Dendropsophus labialis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(1), 84-92.

- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F., & Cosson, J. F. 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170(3), 1261-1280.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*. 41(1), 95-98.
- Hastenrath, S., & Kutzbach, J. 1985. Late Pleistocene climate and water budget of the South American Altiplano. *Quaternary Research*, 24(3), 249-256.
- Ho, S. Y., Shapiro, B., Phillips, M. J., Cooper, A., & Drummond, A. J. 2007. Evidence for time dependency of molecular rate estimates. *Systematic biology*, 56(3), 515-522.
- Huff, D. D., Miller, L. M., Chizinski, C. J., & Vondracek, B. 2011. Mixed-source reintroductions lead to outbreeding depression in second-generation descendants of a native North American fish. *Molecular Ecology*, 20(20), 4246-4258.
- Ihaka, R., & Gentleman, R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics*, 5(3), 299-314.
- Jost, L. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular ecology*, 17(18), 4015-4026.
- Jowett T. 1986. Preparation of nucleic acids. In: Roberts DB, ed. *Drosophila: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 275– 286.
- Kass, R. E., & Raftery, A. E. 1995. Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*, 90(430), 773-795.

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Keely, C. C., Hale, J. M., Heard, G. W., Parris, K. M., Sumner, J., Hamer, A. J., & Melville, J. (2015). Genetic structure and diversity of the endangered growling grass frog in a rapidly urbanizing region. *Royal Society open science*, 2(8), 140-255.
- Lavilla, E. O. 1985. Diagnósis genérica y agrupación de las especies de *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) en base a caracteres larvales. *Physis*, 43, 63-67.
- Lavilla E, 1988. Lower Telmatobiinae (Anura: Leptodactylidae): generic diagnoses based on larval characters. Occasional Papers, Museum of Natural History, University of Kansas 124: 1-19.
- Latorre, C., J.L. Betancourt, K.A. Rylander & J. Quade 2002. Vegetation invasions into absolute desert: A 45,000 yr rodent midden record from the Calama-Salar de Atacama basins, northern Chile (lat 22°-24° S). *Geological Society of America Bulletin* 114(1), 349-366.
- Latorre, C., Santoro, C. M., Ugalde, P. C., Gayo, E. M., Osorio, D., Salas-Egafía, C., & Rech, J. A. 2013. Late Pleistocene human occupation of the hyperarid core in the Atacama Desert, northern Chile. *Quaternary Science Reviews*, 77(1), 19-30.

- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Maldonado, A., & Rozas, E. (2008). Clima y paleoambientes durante el Cuaternario Tardío en la Región de Atacama. Libro Rojo de la Flora Nativa y de los Sitios Prioritarios para su Conservación. Editorial de la Universidad de la Serena, 16(1), 293-304.
- Mock, K. E., Latch, E. K., & Rhodes, O. E. 2004. Assessing losses of genetic diversity due to translocation: long-term case histories in Merriam's turkey (*Meleagris gallopavo merriami*). *Conservation Genetics*, 5(5), 631-645.
- Morales, P., Vila, I., & Poulin, E. 2011. Genetic structure in remnant populations of an endangered cyprinodontid fish, *Orestias ascotanensis*, endemic to the Ascotán salt pan of the Altiplano. *Conservation Genetics*, 12(6), 1639-1643.
- Morales, M. S., Christie, D. A., Villalba, R., Argollo, J., Pacajes, J., Silva, J. S., ... & Gamboa, C. S. 2012. Precipitation changes in the South American Altiplano since 1300 AD reconstructed by tree-rings. *Climate of the Past*, 8(2), 653.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press New York.
- Nester, P. L., Gayo, E., Latorre, C., Jordan, T. E., & Blanco, N. 2007. Perennial stream discharge in the hyperarid Atacama Desert of northern Chile during the latest Pleistocene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19724-19729.
- Ochsenius C. 1986. La Glaciación Puna durante el Wisconsin, deglaciación y máximo lacustre en la transición Wisconsin-Holoceno y refugios de mega-

- fauna postglaciales en la Puna y Desierto de atacama. *Revista de Geografía Norte Grande*. 13 (1), 29–58.
- Placzek, C. J., Quade, J., & Patchett, P. J. 2011. Isotopic tracers of paleohydrologic change in large lakes of the Bolivian Altiplano. *Quaternary Research*, 75(1), 231-244.
- Placzek, C. J., Quade, J., & Patchett, P. J. 2013. A 130ka reconstruction of rainfall on the Bolivian Altiplano. *Earth and Planetary Science Letters*, 363, 97-108.
- Placzek, C. J., Quade, J., & Patchett, P. J. 2013. A 130ka reconstruction of rainfall on the Bolivian Altiplano. *Earth and Planetary Science Letters*, 363, 97-108.
- Primmer, C. R., & Ellegren, H. 1998. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, 15(8), 997-1008.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Rhymer, J. M., & Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1), 83-109.
- Sáez, P. A., Fibla, P., Correa, C., Sallaberry, M., Salinas, H., Veloso, A., & Méndez, M. A. 2014. A new endemic lineage of the Andean frog genus *Telmatobius* (Anura, Telmatobiidae) from the western slopes of the central Andes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 171(4), 769-782.
- Seppä, P. & Laurila, A. 1999. Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity* 82(3): 309-317.
- Soriguer, R. C. 1998. Las translocaciones (introducciones y reintroducciones) de especies cinegéticas y sus efectos medioambientales. *Galemys*, 10, 2.

- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Rogers, A. R., & Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, 9(3), 552-569.
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145(4), 1219-1228.
- Rigsby, C. A., Bradbury, J. P., Baker, P. A., Rollins, S. M. & Warren, M. R. 2005. Late quaternary paleolakes, rivers and wetlands on the Bolivian Altiplano and their paleoclimatic implications. *Journal of Quaternary Science* 20(7-8), 671–691.
- Rowe, G., Beebee, T.J.C., Burke, T., 2000. A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, Metapopulations. *Oikos* 88(3), 641–651.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPN, Shipley P. 2004. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4(3):535–538.
- Veloso A, Sallaberry M, Navarro J, Iturra P, Valencia J, Penna M, Díaz N. 1982. Contribución sistemática al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile. In: Veloso A, Bustos E, eds. La Vegetación y vertebrados ectotérmicos del transecto Arica- Lago Chungará. Montevideo: ROSTLAC, 135–268.4
- Victoriano, P. F., Muñoz-Mendoza, C., Sáez, P. A., Salinas, H. F., Muñoz-Ramírez, C., Sallaberry, M., ... & Méndez, M. A. (2015). Evolution and Conservation on

- Top of the World: Phylogeography of the Marbled Water Frog (*Telmatobius marmoratus* Species Complex; Anura, Telmatobiidae) in Protected Areas of Chile. *Journal of Heredity*, 106(1), 546-559.
- Vila, G. 1975. Geología de los depositos salinos andinos, Provincia de Antofagasta, Chile. *Revista Geológica de Chile* 2, 41-55.
- Vila, I., Morales, P., Scott, S., Poulin, E., Véliz, D., Harrod, C., & Méndez, M. A. 2013. Phylogenetic and phylogeographic analysis of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the southern Chilean Altiplano: the relevance of ancient and recent divergence processes in speciation. *Journal of fish Biology*, 82(3), 927-943.
- Villagrán C. 1993. Una interpretación climática del registro palinológico del Ultimo Máximo Glacial-Postglacial en Sudamérica. *Bulletin de l'Institut Francais d'Études Andines*. 22(1), 243-258.
- Waples, R. S. (1995). Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. In *American Fisheries Society Symposium* 17(1), 8-27.
- Wiens, J.J., Fetzner, J.W., Parkinson, C.L., Reeder, T.W., 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology* 54 (5), 719-748.
- Wilson, G. & B. Rannala. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes, *Genetics*, 163 (3), 1177-1191.
- Weir, B.S. & C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(1), 1358-1370.

- Wiegmann, A. F. A. 1834. Amphibien. Meyen, F. J. F. ed., Reise um die Erde ausgeführt auf dem Königlich Preussischen Seehandlungs-Schiffe Prinzes Louise, comandiert von Captain W. Wendt, in den Jahren 1830, 1831 und 1832 von Dr. F. J. F. Meyen. Dritter Theil. Zoologischer Bericht: 433–522. Berlin, Sander'schen Buchhandlung (C. W. Eichhoff).
- Wright S. 1949. The genetical structure of populations. *Ann Hum Genet* 15 (1):323–354
- Wright, D. J., Spurgin, L. G., Collar, N. J., Komdeur, J., Burke, T., & Richardson, D. S. 2014. The impact of translocations on neutral and functional genetic diversity within and among populations of the Seychelles warbler. *Molecular ecology*, 23(9), 2165-2177.
- Zeisset, I., & Beebee, T. J. C. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, 101(2), 109-119.
- Zhou J, Lau K. 1998. Does a monsoon climate exist over South America? *Journal of Climate* 11(5): 1020–1040.