

UCH-FC

Doc-EBE

C. 824

C. 2

**VARIACIÓN MORFOLÓGICA EN ADULTOS DE *RHINELLA ATACAMENSIS*  
(ANURA, BUFONIDAE): EVALUACIÓN DE LA IMPORTANCIA DE  
FACTORES PRÓXIMOS E HISTÓRICOS COMO AGENTES CAUSALES**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas, con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

por

**Claudio Luis Correa Quezada**

Julio, 2010

Director de Tesis: Dr. Marco Méndez T.

Codirector: Prof. Alberto Veloso M.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

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

CLAUDIO LUIS CORREA QUEZADA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 2 de julio de 2010

Director de Tesis:

Dr. Marco Méndez T.

Codirector de Tesis:

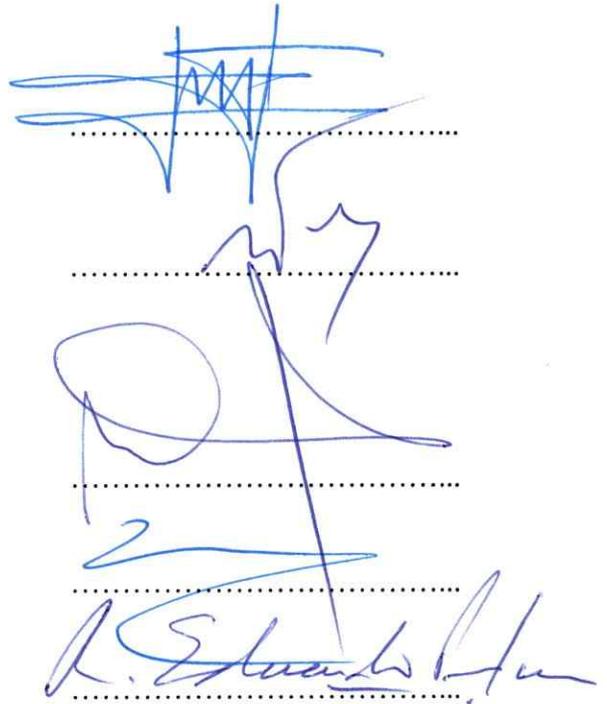
Prof. Alberto Veloso M.

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Mauricio Canals

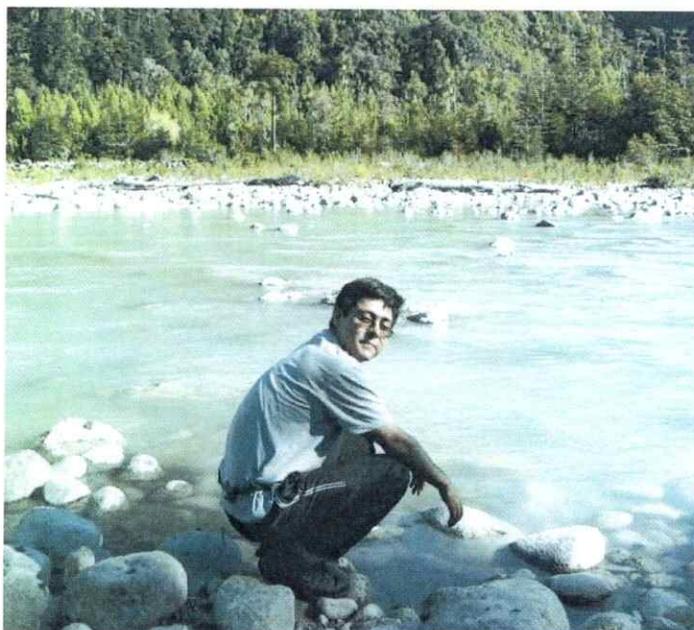
Dr. Rodrigo Ramos

Dr. Eduardo Palma



Handwritten signatures in blue ink on dotted lines. The signatures are: 1. A complex, scribbled signature at the top. 2. A signature that appears to be 'A. Veloso M.'. 3. A signature that appears to be 'M. Canals'. 4. A signature that appears to be 'R. Ramos'. 5. A signature that appears to be 'E. Palma'.

Dedicado a mi polola, mi familia, mis amigos y mis maestros. Y a todos quienes con igual pasión dedican su vida al estudio de la biodiversidad



Nací el 6 de agosto de 1972 en Santiago, donde he vivido toda mi vida. Desde mi infancia me interesó la historia natural y particularmente los animales. Nunca fue un interés afectivo, sino que me llamaba la atención, entre otras muchas cosas, por qué existían tantas especies. Más tarde me aficioné al estudio de las aves, pero fue un pasatiempo más bien teórico que práctico ya que no disponía de muchos recursos.

Al salir del colegio entré a estudiar Química y Farmacia y luego Pedagogía en Biología, pero por falta de una verdadera vocación no terminé ninguna de las dos carreras. Mientras tanto, continuaba con mi pasión por el estudio de las aves y otros animales. En el año 1996, después de un corto período de inactividad académica, entré a la carrera de Biotecnología en la Universidad de Chile. Al principio, me pareció una posibilidad interesante, dado mi interés en el área biológica, pero al poco tiempo me di cuenta que no era lo que realmente quería. Sin embargo, dada mi edad y la falta de otras posibilidades más concretas, decidí terminar esa carrera.

Dos acontecimientos ocurridos antes de recibirme de Ingeniero en Biotecnología definieron mi futuro académico. Tomé el curso electivo de Evolución dictado por Carlos Medina, donde comprendí cómo la teoría evolutiva podía explicar toda la diversidad que me había impresionado desde mi niñez. Lo otro fue conocer a Marco Méndez, que en ese tiempo trabajaba en sistemática de especies chilenas de *Bufo* (ahora *Rhinella*). Le pregunté si podía hacer mi tesis de pregrado con él, lo cual aceptó y desde ese tiempo hemos trabajado juntos.

El siguiente paso fue ingresar al Programa de Postgrado en Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Chile, donde obtuve el grado de Magíster y ahora el de Doctor. Ha sido la consolidación de mis pasiones actuales –el estudio de la biodiversidad desde un punto de vista histórico y biogeográfico, y de los anfibios– lo cual se ha concretado en varias publicaciones. Espero que mi carrera en el futuro sea tan satisfactoria y fructífera como hasta ahora.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi polola y a mi familia (a mi madre, a mi padre y a mi hermano) por el constante apoyo y darme la confianza necesaria para terminar este trabajo.

Agradezco especialmente a mis tutores, Marco Méndez y Alberto Veloso, por la enorme confianza que depositaron en mí, por su constante guía y por permitirme cierta libertad intelectual y de acción durante el desarrollo de esta tesis.

Finalmente, agradezco a todas las personas, miembros o no del laboratorio de Genética y Evolución, que me ayudaron en las actividades de laboratorio y/o terreno. La mayoría son amigos y/o compañeros que me han acompañado y apoyado durante este largo camino. Aquí están ellos, más o menos en un orden que refleja su contribución a este trabajo. A Gabriel Lobos, Michel Sallaberry, Eduardo Soto, Javiera Cisternas, Sergio Araya, Paola Jara, Luis Pastenes, Marcelo Correa, Gonzalo Collado y Juan Pablo Valladares por su invaluable asistencia en la exploración y recolección de ejemplares en distintas zonas de la distribución de *Rhinella atacamensis* y *R. arunco*. A Dayana Vásquez por su ayuda en la obtención de los datos morfométricos. A Luis Pastenes y Pamela Morales por su valiosa colaboración en el desarrollo y puesta a prueba de los protocolos para obtener los marcadores AFLP fluorescentes, y a Marjorie Correa por su invaluable ayuda en la crianza de los descendientes de las parejas provenientes del estero Pupío.

Esta tesis fue financiada parcialmente por la beca de apoyo de tesis otorgada por CONICYT (AT-24071045) a Claudio Correa y el Proyecto FONDECYT 1061256.

## ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xiii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Marco teórico.....	1
1.2. Modelo de estudio y planteamiento del problema.....	3
1.3. Hipótesis y objetivos.....	5
1.4. Referencias.....	7
CAPÍTULO 2: AMPHIBIA, ANURA, BUFONIDAE, <i>RHINELLA ATACAMENSIS</i> : ALTITUDINAL DISTRIBUTION EXTENSION, NEW RECORDS AND GEOGRAPHIC DISTRIBUTION MAP. CHECK LIST 4(4): 478-484.....	10
CAPÍTULO 3: DIVERGENCIA MORFOLÓGICA Y GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DE <i>RHINELLA ATACAMENSIS</i> (ANURA, BUFONIDAE): ESTABLECIENDO LA CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE FACTORES PRÓXIMOS E HISTÓRICOS (MANUSCRITO EN PREPARACIÓN).....	22
3.1. Resumen.....	22
3.2. Introducción.....	24
3.3. Materiales y métodos.....	30

3.4. Resultados.....	37
3.5. Discusión.....	42
3.6. Referencias.....	48
CAPÍTULO 4: EFECTOS DE LA ARIDEZ EN LA ESTRUCTURA FILOGEOGRÁFICA DE <i>RHINELLA ATACAMENSIS</i> (ANURA, BUFONIDAE), UN ANFIBIO ENDÉMICO DE CHILE (MANUSCRITO EN PREPARACIÓN).....	53
4.1. Resumen.....	53
4.2. Introducción.....	55
4.3. Materiales y métodos.....	59
4.4. Resultados.....	69
4.5. Discusión.....	77
4.6. Referencias.....	84
CAPÍTULO 5: EVIDENCIA GENÉTICA DE HIBRIDACIÓN NATURAL ENTRE LAS ESPECIES HERMANAS <i>RHINELLA ATACAMENSIS</i> Y <i>R. ARUNCO</i> (ANURA, BUFONIDAE) (MANUSCRITO EN PREPARACIÓN).....	89
5.1. Resumen.....	89
5.2. Introducción.....	91
5.3. Materiales y métodos.....	95
5.4. Resultados.....	106
5.5. Discusión.....	115
5.6. Referencias.....	119
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	123
6.1. Preguntas abordadas en esta Tesis.....	123
6.2. Conclusiones.....	124
6.3. Proyecciones.....	128

## LISTA DE TABLAS

	Página
Table 1. Coordinates and altitudes for <i>Rhinella atacamensis</i> localities reported in the literature and others recently discovered.....	18
Tabla 3.1. Coordenadas y alturas de las localidades de <i>Rhinella atacamensis</i> incluidas en este estudio (Capítulo 3).....	32
Tabla 3.2. Tabla de clasificación de 83 ejemplares de <i>Rhinella atacamensis</i> de seis localidades obtenida con un análisis discriminante.....	40
Tabla 3.3. Valores de $P_{ST}$ y $F_{ST}$ correspondientes a las comparaciones entre localidades contiguas de <i>Rhinella atacamensis</i> a lo largo de su distribución.....	41
Tabla 4.1. Coordenadas y alturas de las localidades de <i>Rhinella atacamensis</i> incluidas en este estudio (Capítulo 4).....	62
Tabla 4.2. Medidas de variación intrapoblacional calculadas con las secuencias de la región control mitocondrial de 16 localidades representativas de todo el rango de distribución de <i>Rhinella atacamensis</i> .....	70
Tabla 4.3. Componentes de varianza de los AMOVAs realizados con las secuencias de la región control mitocondrial con el programa Arlequin.....	75
Tabla 4.4. Índices de fijación ( $F_{STs}$ ) entre las seis localidades foco de <i>Rhinella atacamensis</i> calculados con las secuencias mitocondriales y marcadores AFLP.....	76
Tabla 4.5. Medidas de diversidad intrapoblacional para las seis localidades foco de <i>Rhinella atacamensis</i> calculadas con 179 marcadores AFLP.....	77
Tabla 5.1. Coordenadas y alturas de las localidades de <i>Rhinella atacamensis</i> , <i>R. arunco</i> y de la zona de hibridación (estero Pupío) incluidas en este estudio.....	99
Tabla 5.2. Probabilidades de asignación a distintas categorías de híbridos obtenidas con el programa NewHybrids para 25 ejemplares de tres localidades del estero Pupío.....	109
Tabla 5.3. Información fenotípica, genotípica y reproductiva de 25 ejemplares de <i>Rhinella</i> capturados en época de reproducción en tres localidades del estero Pupío....	114

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figure 1. Distribution map of <i>Rhinella atacamensis</i> showing the 25 localities known to date.....	14
Figure 2. New localities and specimens of <i>Rhinella atacamensis</i> photographed in the field.....	15
Figure 3. Current state of some localities of <i>Rhinella atacamensis</i> located in the regions of Antofagasta and Atacama.....	19
Figura 3.1. Ubicación geográfica de las seis localidades de <i>Rhinella atacamensis</i> incluidas en este estudio.....	31
Figura 3.2. Longitud hocico-cloaca en función de la latitud para seis poblaciones representativas de la distribución de <i>Rhinella atacamensis</i> .....	38
Figura 3.3. Puntuaciones factoriales de los primeros dos componentes principales (CPs) para 83 ejemplares de <i>Rhinella atacamensis</i> provenientes de seis localidades.....	39
Figura 4.1. Ubicación geográfica de las 23 localidades de <i>Rhinella atacamensis</i> incluidas en este estudio.....	60
Figura 4.2. Red de los 62 haplotipos (210 ejemplares) muestreados en 23 localidades representativas de toda la distribución de <i>Rhinella atacamensis</i> .....	71
Figura 4.3. Estructura filogeográfica de <i>Rhinella atacamensis</i> obtenida con las secuencias de la región control mitocondrial.....	72
Figura 4.4. Variación genética intra e interpoblacional a lo largo de la distribución de <i>Rhinella atacamensis</i> .....	76
Figura 4.5. Análisis de UPGMA y Structure para los marcadores AFLP de las seis localidades foco.....	79
Figura 5.1. Ubicación geográfica de las localidades de <i>Rhinella atacamensis</i> , de <i>R. arunco</i> y de la zona de hibridación entre estas dos especies incluidas en este estudio....	98
Figura 5.2. Divergencia genética mitocondrial entre los ejemplares de <i>Rhinella atacamensis</i> , <i>R. arunco</i> e híbridos de las 15 localidades incluidas en este estudio.....	107

Figura 5.3. Ejemplo de codificación de marcadores AFLP en ejemplares representativos de *Rhinella atacamensis*, *R. arunco* y de la zona de hibridación.....108

Figura 5.4. Probabilidades de asignación de todos los ejemplares de *Rhinella* de los cuales se obtuvieron AFLPs.....111

## RESUMEN

La variación geográfica fenotípica es el resultado de la interacción de factores históricos y ecológicos, cuyos efectos diferenciadores pueden ser influidos por la geografía y los ambientes donde las poblaciones se distribuyen. Desde un punto de vista evolutivo, la importancia de establecer la contribución relativa de estos factores radica en que el proceso de especiación consiste en la transformación de la divergencia fenotípica intraespecífica en diferencias entre especies. En especies con amplio rango geográfico, donde la heterogeneidad ambiental y espacial es mayor, es posible que se generen mayores niveles de variación geográfica, en particular para aquellas que poseen una menor capacidad de dispersión.

Las especies hermanas *Rhinella atacamensis* y *R. arunco* se distribuyen en forma sucesiva entre los 25 y 38°S en la zona costera e interior de Chile, en un área que representa la transición gradual entre un clima desértico y uno mediterráneo. Recientemente se extendió el límite sur de distribución de *R. atacamensis*, por lo que el límite entre ambas especies quedó definido aproximadamente a los 32°S donde se descubrió una zona de contacto. Previamente se consideraba que *R. atacamensis* estaba conformada solo por unas pocas poblaciones aisladas en la zona desértica entre los 25 y 30°S, en las cuales se describió una alta variación morfológica interpoblacional. A su vez, estas poblaciones desérticas difieren notablemente, por su tamaño corporal y patrones de coloración, de las nuevas localidades descritas más al sur (30-32°S).

En este estudio se analizó la variación morfológica (17 medidas morfométricas de adultos) y genética de *R. atacamensis* en todo su rango de distribución. Los niveles de

variación morfométrica y genética entre poblaciones fueron comparados explícitamente por medio de una aproximación  $P_{ST}$ - $F_{ST}$  para evaluar la importancia relativa de la deriva génica y la selección natural como causas de su diferenciación fenotípica. Por otra parte, los patrones de variación genética de secuencias de la región control mitocondrial y marcadores AFLP fueron analizados con una serie de herramientas filogeográficas para establecer hasta que punto el gradiente de aridez ha afectado su estructura poblacional. Además, se investigó la genética poblacional de la zona de contacto para determinar si esta especie híbrida con *R. arunco*.

Los análisis multivariados muestran un patrón gradual de variación de norte a sur de manera que las poblaciones de extremos opuestos de la distribución no se sobreponen en un espacio morfométrico. También hay un aumento gradual en el tamaño corporal de los adultos de norte a sur, patrón que concuerda con la regla de Bergmann. El contraste  $P_{ST}$ - $F_{ST}$  mostró valores relativos opuestos a lo largo de la distribución de *R. atacamensis* sugiriendo que los procesos de deriva génica y selección natural han actuado con distinta intensidad en diferentes partes de la distribución. Los análisis filogeográficos muestran una escasa estructura filogeográfica para esta especie en todo su rango de distribución. La variación genética intrapoblacional disminuye mientras que la variación entre poblaciones aumenta de sur a norte. El patrón general de variación genética nuclear se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia cuando se excluye la población que define el límite norte de distribución, Papos, la cual muestra un alto grado de divergencia genética. Las secuencias mitocondriales proveen evidencia de cuellos de botella en poblaciones de la zona desértica del norte y retención de polimorfismos ancestrales en toda la distribución.

En conjunto, la comparación  $P_{ST}$ - $F_{ST}$  y los niveles de estructura filogeográfica sugieren que la selección natural ha sido el principal factor que ha determinado la diferenciación morfométrica en *R. atacamensis*. Por otra parte, el análisis genético y observaciones reproductivas de terreno en dos localidades ubicadas en el estero Pupío (32°S), donde pueden encontrarse individuos con patrones de coloración intermedia entre *R. atacamensis* y *R. arunco*, indica que estas dos especies hibridan en forma frecuente. Sin embargo, la presencia de una población de *R. atacamensis* genéticamente casi pura en la parte alta del estero sugiere que ambas especies están segregadas espacialmente a lo largo de este sistema hídrico.

## SUMMARY

Phenotypic geographic variation is the result of the interaction of historical and ecological factors, whose differentiating effects may be influenced by the geography and environments in which populations are distributed. From an evolutionary point of view, the importance of establishing the relative contribution of these factors resides in the fact that the process of speciation consists of the transformation of intraspecific phenotypic divergence into differences between species. Greater geographic variation is expected for species with a wide geographic range in which there is environmental and spatial heterogeneity, especially for those species with less capacity for dispersion.

The sister species *Rhinella atacamensis* and *R. arunco* are distributed successively between 25° and 38° S in the coast and the interior of Chile, in an area with a gradual transition from a desert a Mediterranean climate. The known southern limit of *R. atacamensis* was recently extended southward to 32° S, where a zone of contact with *R. arunco* was found. It had previously been thought that was formed only by a few isolated populations in the desert between 25° and 30° S, in which a large amount of morphological inter-population variation has been described. These desert populations are also notably different from the new localities discovered farther south (30°-32° S), both in body size and patterns of coloration.

In this study, the morphological (17 morphometric measures in adults) and genetic variation of *R. atacamensis* in its entire range of distribution was analyzed. The levels of morphometric and genetic variation among populations were compared using a comparative  $P_{ST}$ - $F_{ST}$  approximation to evaluate the relative importance of genetic drift

and natural selection as causes of the phenotypic differentiation. The patterns of genetic variation in the sequences of the mitochondrial control region and ALFP markers were analyzed with several phylogeographic tools to estimate the degree to which the gradient of aridity has affected its population structure. Also, the population genetics of the contact zone was studied to determine if *R. atacamensis* hybridizes with *R. arunco*.

The multivariate analyses showed a gradual variation pattern from north to south; the populations from the extremes of the distribution were not superimposed in the morphometric space. There was also a gradual increase in adult body size from north to south, in agreement with Bergmann's Rule. The  $P_{ST}$ - $F_{ST}$  contrast showed opposite relative values along the distribution of *R. atacamensis*, suggesting that the processes of genetic drift and selection have acted with different intensities in different parts of the distribution. The phylogeographic analyses found little phylogeographic structure for this species in its entire distribution range. The within-population genetic variation decreased and the variation between populations increased from south to north. The overall pattern of genetic nuclear variation fitted a model of isolation by distance when the most northern population, Paposo, was excluded; this population had the highest degree of genetic divergence. The mitochondrial sequences provided evidence of bottlenecks in the northern desert populations, and retention of ancestral polymorphisms in the entire distribution range. Taken together, the  $P_{ST}$ - $F_{ST}$  comparison and the levels of phylogeographic structure suggest that natural selection has been the main force driving the morphological differentiation of *R. atacamensis*.

Genetic analysis and reproductive observations in the field in two localities of Pupio Creek (32° S), in which there are individuals with intermediate coloration patterns

between *R. atacamensis* and *R. arunco*, indicated that these species hybridize frequently. However, the presence of an almost genetically “pure” population of *R. atacamensis* in the upper part of the creek suggests that these species are spatially segregated in this watershed.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. Marco teórico

Los patrones de variación geográfica en atributos morfológicos (u otro tipo de caracteres fenotípicos) pueden ser producidos tanto por condiciones ecológicas actuales como por factores históricos (i.e. filogénesis) (Thorpe 1987). La variación geográfica fenotípica es un fenómeno prácticamente universal que ha menudo puede adoptar complejos patrones espaciales (clinal, discontinuo, en mosaico, etc.) (Gould y Johnston 1972, Thorpe 2002, Ridley 2003, Futuymia 2005). En especies que poseen un amplio rango de distribución, donde sus poblaciones pueden experimentar una mayor heterogeneidad espacial y ambiental, es esperable que haya altos niveles de variación fenotípica entre poblaciones (Jetz et al. 2009). La importancia de establecer la contribución relativa de los factores ecológicos e históricos que han producido este tipo de variación radica en que el proceso de especiación involucra la transformación de la variación dentro de una especie en diferencias entre especies (Ridley 2003, Futuyma 2005, Mallet 2008). Un factor histórico adicional que puede modificar los patrones y niveles de variación genética poblacional, y por ende los patrones de variación geográfica fenotípica, es la hibridación introgresiva, la cual se define como la infiltración de material genético de una especie en otra (Arnold y Martin 2009).

La extensión de la variación geográfica es el resultado de un balance de fuerzas que tienden a producir diferenciación genética local (mutación, deriva génica y selección) y fuerzas que tienden a producir homogeneidad genética (flujo génico), las cuales a su vez son moduladas por la geografía y la historia poblacional (Slatkin 1987).

Se han propuesto varias aproximaciones metodológicas para establecer cuál de los factores que promueven diferenciación poblacional es más relevante, pero una de las más utilizadas es la comparación  $Q_{ST}$ - $F_{ST}$ , la cual ha servido para establecer los roles relativos de la deriva y la selección natural (McKay y Latta 2002, Leinonen et al. 2008).  $Q_{ST}$  es una medida de la diferenciación fenotípica interpoblacional en rasgos cuantitativos, calculada a partir de la varianza genética aditiva del rasgo, mientras que  $F_{ST}$  es una medida de diferenciación genética entre poblaciones que puede ser calculada utilizando marcadores moleculares neutrales. La inferencia se basa en la comparación de estos valores: si  $Q_{ST}$  es significativamente mayor o menor que  $F_{ST}$ , la diferenciación puede atribuirse principalmente a los efectos de selección diversificadora o estabilizadora, respectivamente; si estos valores son casi iguales, la contribución relativa de la deriva génica y la selección no puede ser establecida. Aunque  $Q_{ST}$  debe ser estimado de experimentos de genética cuantitativa, cuando esto es logísticamente prohibitivo se ha utilizado una medida análoga,  $P_{ST}$ , calculada directamente de la variación del o los rasgos en las poblaciones naturales (Pujol et al. 2008, Whitlock 2008). Las limitaciones de esta aproximación han sido discutidas extensamente, por lo que las inferencias obtenidas de una comparación  $Q_{ST}$ - $F_{ST}$  deben ser interpretadas con precaución y consideradas solo como el paso inicial para la identificación de instancias donde la selección natural es predominante (Pujol et al. 2008).

Como se mencionó previamente, los procesos de deriva génica y flujo génico tienen efectos opuestos al producir diferenciación genética y fenotípica poblacional (Slatkin 1987). Los estudios filogeográficos proveen el marco conceptual y analítico para investigar los roles de estas fuerzas evolutivas al producir los patrones espaciales de

diferenciación genética intraespecífica e identificar las causas históricas que los generan, es decir, inferir la filogénesis de una especie (Avice 2000, 2004). Los anfibios presentan varias características que los convierten en sujetos ideales para este tipo de estudios: una distribución global, alto grado de estructura genética y una facilidad para obtener muestras (Zeisset y Beebee 2008). Estos organismos en general tienen una baja capacidad de dispersión y presentan filopatría a los sitios natales debido principalmente a restricciones ecofisiológicas relacionadas con la dependencia del agua para su balance hídrico y reproducción (Beebee 1996). Consecuentemente las poblaciones de anfibios tienden a ser altamente estructuradas genéticamente sobre distancias geográficas cortas y a una escala mayor, muchas de estas especies presentan fuertes estructuras filogeográficas (revisado en Vences y Wake 2007; algunas excepciones son Burns et al. 2007 y Makowsky et al. 2009).

## **1.2. Modelo de estudio y planteamiento del problema**

La configuración geográfica y la topografía del territorio de Chile, en combinación con gradientes latitudinales de precipitación y temperatura, han producido una gran variedad de climas que han influido en los patrones de distribución y diversificación de su flora y fauna (Pliscoff y Luebert 2008). Esta heterogeneidad espacial y ambiental tiene el potencial de producir diferenciación genética y/o fenotípica en especies con amplios rangos de distribución latitudinal. Uno de los grupos de vertebrados que presenta una amplia distribución en Chile es el género de anuros *Rhinella*, que ha sido capaz de persistir en todo tipo de hábitats, abarcando desde las alturas cordilleranas en la zona altiplánica del extremo norte hasta los bosques

templados de Chiloé continental ( $17^{\circ}30'$ - $43^{\circ}S$ ; Cei 1962, Veloso 2006). Las especies hermanas *R. atacamensis* y *R. arunco* se distribuyen en forma sucesiva entre los  $25$  y  $38^{\circ}S$  aproximadamente, con poblaciones tanto en la costa como el interior del país. El rango de distribución de *R. atacamensis* ha sido extendido recientemente desde los  $30$  a los  $32^{\circ}S$  por lo que el límite entre ambas especies estaría ubicado alrededor de esta última latitud (revisado en Correa et al. 2008, Capítulo 2 de esta tesis). *R. atacamensis* habita una región de creciente aridez hacia el norte y es uno de los pocos anfibios que ha logrado persistir en el límite sur del desierto de Atacama (Correa et al. 2008). Cei (1961, 1962) describió un alto nivel de divergencia morfológica, principalmente en los patrones de coloración, entre poblaciones de *R. atacamensis* del extremo norte de la distribución que fueron atribuidas a “equilibrios génicos propios” producto de su aislamiento. Sin embargo, Cei (1962) asignó algunas poblaciones de *R. atacamensis* ubicadas entre los  $30$  y  $31^{\circ}S$  a *R. arunco*, debido al alto grado de divergencia en el tamaño corporal y los patrones de coloración con respecto a las poblaciones del norte (ver resultados del Capítulo 3 y Capítulo 5).

En este estudio se analiza la variación genética y morfométrica de poblaciones de *R. atacamensis* que representan toda su distribución geográfica. Se escogió este modelo porque presenta una alta variación geográfica en características morfológicas que pueden haberse generado por el aislamiento geográfico producido por el gradiente de aridez que caracteriza su rango de distribución. Por lo tanto, se consideró como un modelo adecuado para investigar la importancia relativa de los procesos ecológicos e históricos que pueden generar variación geográfica fenotípica en especies que poseen un rango de distribución amplio y ambientalmente heterogéneo. Además, un aspecto particular de

esta especie es que en el extremo sur de su distribución parece formar una zona de hibridación con *R. arunco* (aspecto desarrollado en esta tesis), lo cual tiene consecuencias importantes para el estudio del proceso de especiación entre ellas y puede añadir una nueva dimensión a la problemática del estudio de la variación geográfica.

### 1.3. Hipótesis y objetivos

El estudio está organizado en cuatro capítulos. En el Capítulo 2, que corresponde a un artículo publicado en la revista en línea Check List, se revisan los cambios en la definición de los límites de distribución de *R. atacamensis*, incluyendo el reporte de nuevas localidades y evidencia fotográfica que muestra el estado actual de algunas localidades de la zona norte de su distribución. Los tres capítulos siguientes están dedicados a evaluar cada una de las siguientes hipótesis, para las cuales se indican los objetivos específicos que se plantearon al inicio del estudio:

Hipótesis 1 (Capítulo 3): La historia filogenética es el principal factor que explica la variación morfológica entre poblaciones de *R. atacamensis* (objetivos 2 y 5).

Hipótesis 2 (Capítulo 4): La divergencia genética entre poblaciones es mayor en la zona norte del rango de distribución de esta especie (Regiones de Antofagasta y Atacama) que en la zona sur (Región de Coquimbo), debido al mayor aislamiento geográfico de las poblaciones de la zona norte (objetivos 3 y 4).

Hipótesis 3 (Capítulo 5): El extremo sur de la distribución de *R. atacamensis* corresponde a una zona de contacto con *R. arunco* (= *Bufo chilensis*) donde existen formas morfológica y genéticamente intermedias entre estas dos especies debido a hibridación (objetivo 6).

A continuación se detallan los objetivos específicos planteados para someter a prueba estas hipótesis, como fueron redactados en la propuesta original, siguiendo la numeración utilizada más arriba:

1. Definir el límite de distribución sur de *R. atacamensis* con respecto a su especie hermana *R. arunco*.
2. Describir la variación morfológica intra e interpoblacional de los adultos de *R. atacamensis* en todo su rango de distribución.
3. Establecer la historia de esta especie utilizando aproximaciones filogeográficas.
4. Estimar los niveles de diferenciación genética dentro y entre las poblaciones.
5. Analizar la contribución relativa de los factores próximos e históricos (filogenia) en la variación morfológica de las poblaciones.

6. Encontrar marcadores moleculares y caracteres morfológicos para distinguir individuos de las especies *R. atacamensis* y *R. arunco* (e híbridos si son hallados).

El objetivo 1 fue abordado en el Capítulo 2, el cual corresponde a la revisión de la distribución de *R. atacamensis* publicada en la revista Check List. En el Capítulo 6 (Conclusiones y Proyecciones) se resumen los principales resultados de este estudio en el contexto de las hipótesis evaluadas, se detallan las conclusiones por capítulo y se sugieren algunas líneas de investigación que permitirían profundizar el conocimiento acerca de la biología poblacional de las dos especies.

#### 1.4. Referencias

- Arnold, M. L. y N. H. Martin. 2009. Adaptation by introgression. *Journal of Biology* 8: 82.
- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.
- Avice, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)*. Sinauer, Sunderland, MA. 684 pp.
- Beebee, T. J. C. 1996. *Ecology and Conservation of Amphibians*. Chapman & Hall, London. 214 pp.
- Burns, E. L., M. D. B. Eldridge, D. M. Crayn y B. A. Houlden. 2007. Low phylogeographic structure in a wide spread endangered Australian frog *Litoria aurea* (Anura: Hylidae). *Conservation Genetics* 8: 17-32.
- Cei, J. M. 1961. *Bufo arunco* (Molina) y las formas chilenas de *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 8: 59-81.
- Cei, J. M. 1962. *Batracios de Chile*. Ediciones Universidad de Chile, Santiago, Chile. 128 + cviii pp.

- Correa, C., M. Sallaberry, P. Jara-Arancio, G. Lobos, E. R. Soto y M. A. Méndez. 2008. Amphibia, Anura, Bufonidae, *Rhinella atacamensis*: Altitudinal distribution extention, new records and geographic distribution map. Check List 4(4): 478-484 (ver Capítulo 2 de esta tesis).
- Futuyma, D. 2005. Evolution. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 543 pp.
- Gould, S. J. y R. F. Johnston. 1972. Geographic variation. Annual Review of Ecology and Systematics 3: 457-498.
- Jetz, W., K. G. Ashton y F. A. La Sorte. 2009. Phenotypic population divergence in terrestrial vertebrates at macro scales. Ecology Letters 12: 1137-1146.
- Leinonen, T., R. B. O'Hara, J. M. Cano y J. Merilä. 2008. Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. Journal of Evolutionary Biology 21: 1-17.
- Makowsky, R., J. Chesser y L. J. Rissler. 2009. A striking lack of genetic diversity across the wide-ranging amphibian *Gastrophryne carolinensis* (Anura: Microhylidae). Genetica 135: 169-183.
- Mallet, J. 2008. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. Philosophical Transactions of the Royal Society B 363: 2971-2986.
- McKay, J. K. y R. G. Latta. 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. Trends in Ecology and Evolution 17: 285-291.
- Plischoff, P. y F. Luebert. 2008. Ecosistemas terrestres. En: Biodiversidad de Chile: Patrimonio y Desafíos. Segunda Edición. Varios editores. CONAMA.
- Pujol, B., A. J. Wilson, R. I. C. Ross y J. R. Pannell. 2008. Are  $Q_{ST}$ - $F_{ST}$  comparisons for natural populations meaningful? Molecular Ecology 17: 4782-4785.
- Ridley, M. 2003. Evolution. 3rd Edition. Blackwell Publishing, Malden, USA. 751 pp.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236(4803): 787-792.
- Thorpe, R. S. 1987. Geographic variation: a synthesis of cause, data, pattern and congruence in relation a subspecies, multivariate analysis and phylogenesis. Bolletino di Zoologia 54(1): 3-11.

Thorpe, R. S. 2002. Geographic variation. En: *Encyclopedia of Evolution*, pp. 430-435. Pagel, M., Ed., Oxford University Press.

Veloso, A. 2006. Batracios de las cuencas hidrográficas de Chile: origen, diversidad y estado de conservación. En: *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*, pp. 103-140. Vila, I., A. Veloso, R. Schlatter y C. Ramírez, Eds., Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

Vences, M. y D. B. Wake. 2007. Speciation, Species Boundaries and Phylogeography of Amphibians. En: *Amphibian Biology. Volume 7, Systematics*, pp. 2613-2671. Heatwole, H., Ed., Tyler, M. J., Co-ed., Surrey Beatty & Sons, Australia.

Whitlock, M. C. 2008. Evolutionary inference from  $Q_{ST}$ . *Molecular Ecology* 17: 1885-1896.

Zeisset, I. y T. J. C. Beebee. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101: 109-119.

**CAPÍTULO 2:****AMPHIBIA, ANURA, BUFONIDAE, *RHINELLA ATACAMENSIS*:  
ALTITUDINAL DISTRIBUTION EXTENSION, NEW RECORDS AND  
GEOGRAPHIC DISTRIBUTION MAP.****CHECK LIST 4(4): 478-484\***

Amphibian distribution patterns in Chile have been strongly influenced by the formation of physiographic and climatic barriers, mainly the Atacama Desert in the north, the Andes Mountains in the east, and cold Patagonian steppes in the southeast (Cei 1962; Veloso and Navarro 1988). The other fundamental factor that has influenced the distribution of these organisms in Chile, as well as that of other groups of plants and animals, is a climatic gradient characterized by a sustained increment of precipitation level from north to south (Di Castri 1968; Veloso 2006). Along this gradient, the highest degree of species richness among the amphibians is concentrated between 38° and 46° S (Veloso and Navarro 1988; Ortiz and Díaz-Páez 2006), which is a zone dominated by humid temperate forests (Gajardo 1995). Northward, temperate forests give way to the sclerophyllic forests and shrublands of central Chile, which gradually gives way to the Atacama Desert beginning at about 28° S. The vegetational changes here mentioned may be directly related to the gradual decrease in the richness of the amphibian fauna progressing northward, both in the coast and in the interior of the country (Cei 1962; Veloso 2006).

---

\*Transcripción íntegra del artículo, cuyos autores son: Correa, C., M. Sallaberry, P. Jara-Arancio, G. Lobos, E. R. Soto y M. A. Méndez.

The situation is different in the Andes, since northward from 23°47' S, the region corresponding to the Chilean Altiplano, populations of *Rhinella spinulosa*, *Pleurodema marmorata* and various species of the genus *Telmatobius* may be found (Veloso et al. 1982; Formas et al. 2005). In contrast, there are no records of amphibian populations above 2000 m between 23°47' S (Tilomonte, which is known to be the southern limit of the Altiplano populations of *R. spinulosa* in Chile, Méndez et al., unpublished data) and 31°45' S (Vega Piuquenes, a locality where *P. thaul* was recently recorded, Correa et al. 2007).

*Rhinella atacamensis*, an endemic Chilean species known until recently as *Bufo atacamensis*, is one of the few amphibians inhabiting the Atacama Desert (Figures 1 and 2). Cei (1961, 1962) indicated that the species (referred to as *Bufo spinulosus atacamensis*) consisted only of populations in coastal ravines (Paposo and Aguada de Chorrillos) and the Copiapó and Huasco rivers in the interior desert region (Copiapó and Vallenar) (Figure 1). This author suggested that the subspecies *B. s. atacamensis* is replaced by the subspecies *B. s. arunco* (now *R. arunco*) from the city of Coquimbo south (30° S). With regard to altitudinal limits, Cei (1962) pointed out that the altitude reached by *B. s. atacamensis* in the Andes was unknown along the Copiapó and Huasco rivers. Veloso and Navarro (1988) defined the altitudinal range for *B. atacamensis* as being between sea level and 2000 m.

Forty years after the Cei (1962) publication, various studies have allowed the redefinition of the southern limit of the distribution of *R. atacamensis*. Sallaberry and Méndez (2002) reported new localities which extended this limit to Socos (30°44' S). Furthermore, Moreno et al. (2002) reported the presence of the species in the Llanos de

Challe National Park (28°10' S). Subsequently, Sallaberry et al. (2007) added new localities within the range defined by Sallaberry and Méndez (2002) and also extended the distribution by more than 150 km southward, to Mauro (31°57' S) (Figure 1). The implications of these changes in the southern distributional limit of *R. atacamensis* is that the distribution of this species and that of *R. arunco* should overlap between 30° and 31°57' S, if we accept the limits established by Cei (1961, 1962) for both species. Nevertheless, intense explorations between Paposo and Mauro carried out between 2005 and 2007 were only able to find populations of *R. atacamensis* in this area, whose specific status can be established without ambiguity based on external morphological characteristics of individuals. Also, the 2007 expeditions revealed new localities of occurrence of *R. atacamensis*.

The main objective of the present study was to define more precisely the distributional range of *R. atacamensis* by reviewing all its recorded localities cited in the literature, as well as adding the new discoveries from 2007. We also present photographic material to demonstrate how human activities have altered the habitat of the species, particularly in the northern region of its distribution. We found a total of 15 localities in the literature (Cei 1961; 1962; Moreno et al. 2002; Sallaberry and Méndez 2002; Sallaberry, et al. 2007), to which we have added the 10 new ones discovered in 2007, which are located within the latitudinal limits defined in those references (Table 1; Figures 1 and 2). Both adults and juveniles were identified from their external morphological characters. Among the new localities, three are included in which the species was recorded from individuals which were photographed (El Pino, Las Barrancas and Río del Totoral). The altitudes of the 25 localities ranged between 20 m

(Las Bandurrias) and 2574 m (Mostazal). The latter locality, a ravine within the Atacama Desert, represents the highest record for the species to date. As a group, the 25 known localities are distributed more or less equidistantly along both the coast and the interior of the country, over a range of approximately 750 km (25°-32° S; Figure 1). From a hydrogeographic perspective, these localities occur both in Andean (representing those with the largest extensions) and pre-Andean basins, and in basins of the coastal range.

The finding of new localities for *R. atacamensis* and the absence of any indication of the presence of *R. arunco* between 30° and 32° S, reported in publications since 2002, indicates that there is no overlap of these two species as suggested from an analysis of all the literature available to date. Thus, *R. arunco* effectively replaces *R. atacamensis* from the Pupío stream basin southward. These limits are confirmed by a phylogeographic study of mitochondrial DNA which includes populations of both species located between 25° and 36°15' S (Correa et al., unpublished data). With regard to *R. spinulosa*, it also appears there is no overlap, since this species has not been collected between 23°47' S (Tilomonte) and 32°51' S (Portillo). The finding of populations of *R. atacamensis* above 1500 m suggests that is the only amphibian species which inhabits the piedmont and mountains between 23°47' and 31°45' S. It would also be the only species that inhabits the coast and interior of Chile between 25° S and Carrera Pinto (27°07' S), which is the northern distributional limit of *P. thaul* (Correa et al. 2007).

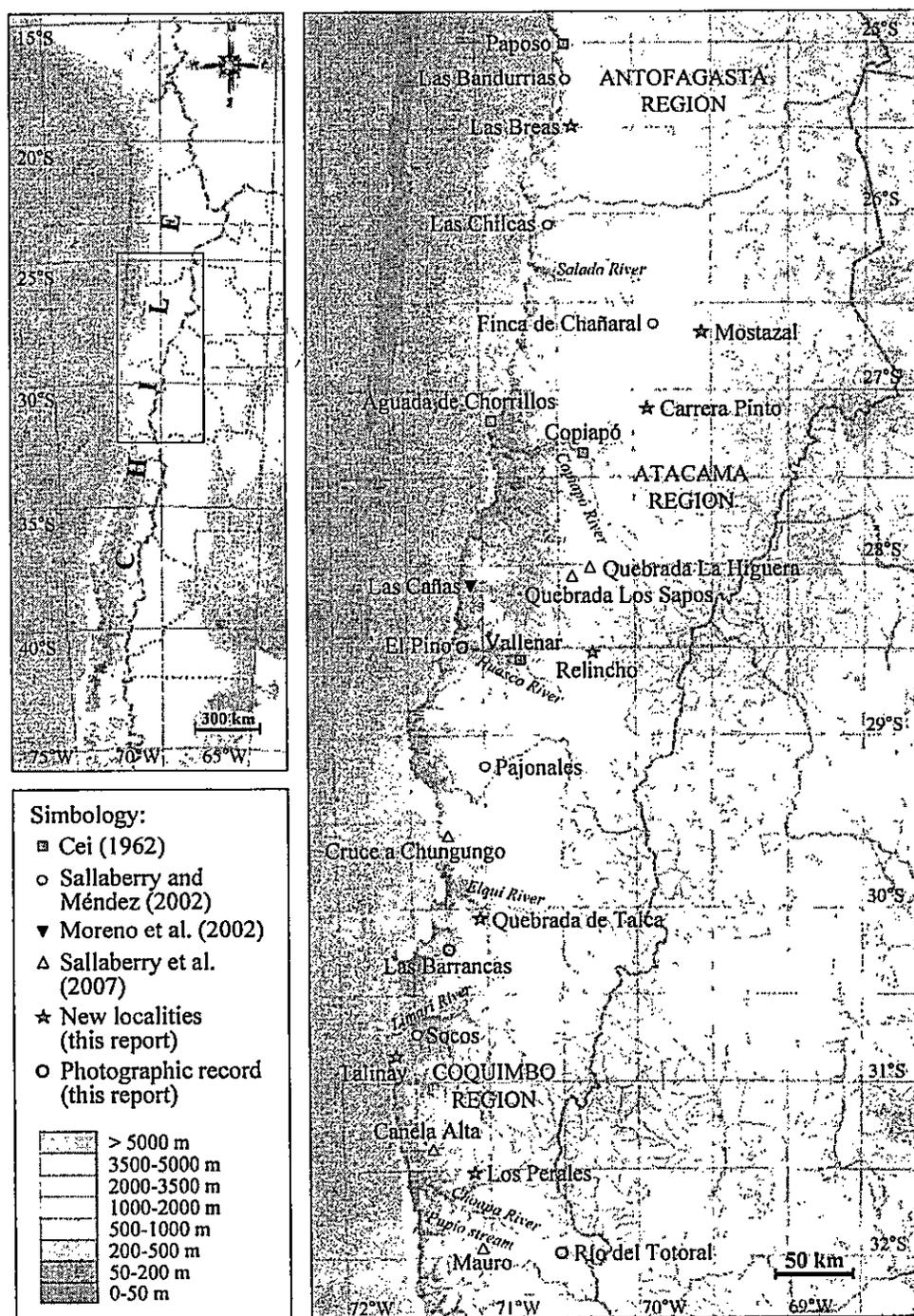


Figure 1. Distribution map of *Rhinella atacamensis* showing the 25 localities known to date. The boundaries of the administrative regions and the principal rivers located between 25° and 32° S are also shown. The Choapa River and Pupio stream basins constitute the southern known limit for this species.

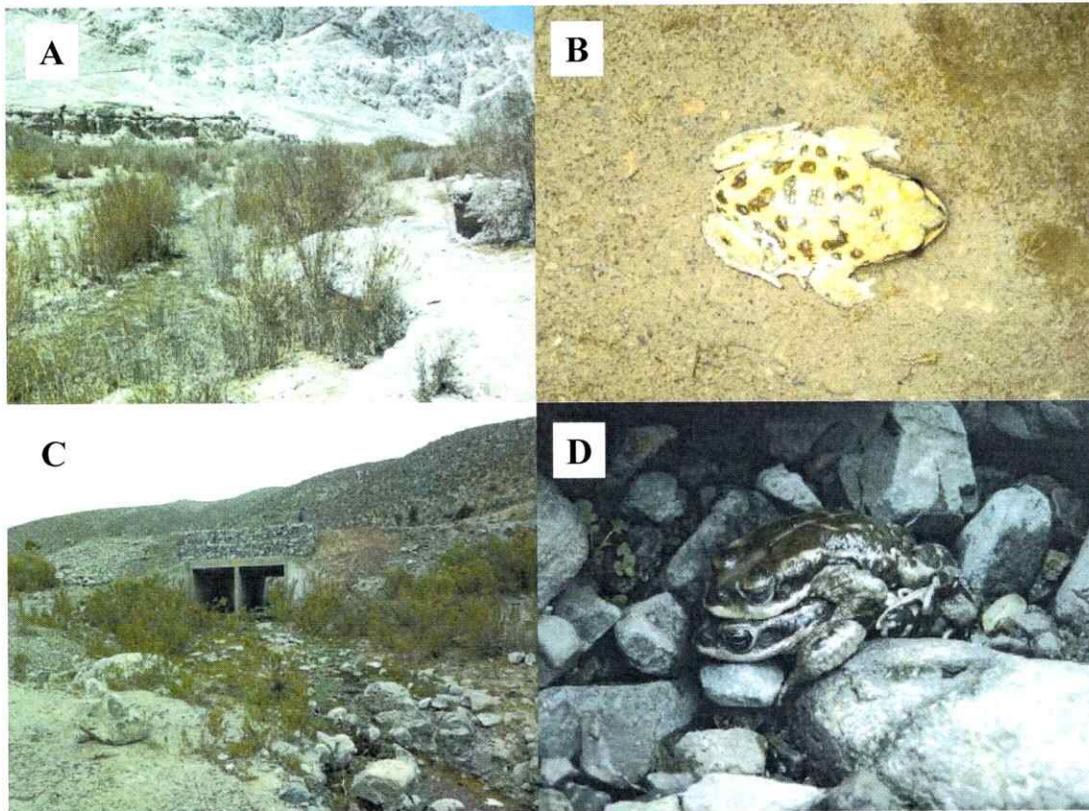


Figure 2. New localities and specimens of *Rhinella atacamensis* photographed in the field. A and B: Carrera Pinto Oasis, Atacama Region. This locality is threatened by massive extraction of water for agricultural and mining activities developed along the watercourse. On the right, a partially submerged male individual photographed at night. C and D: Los Perales locality, Coquimbo Region. Although occurring along a highway, this site appears unaltered by human activities. On the right, a pair of specimens in amplexus photographed in July 2007. *R. atacamensis* shares the habitat with *Pleurodema thaul* in both localities.

The continuing discovery of new locations of occurrence of *R. atacamensis* has decreased the gaps previously observed in its distribution, which suggests that the species is more common than previously supposed and may be present in a large number of freshwater bodies between Paposo and Mauro (25-32° S) (Figures 1 and 2). Nevertheless, in parallel with the increase in the number of localities cited for the species, environmental deterioration has been noticed at some of these, particularly in

the northern part of the distributional range. For example, two of the localities mentioned by Cei (1961, 1962), Copiapó and Vallenar, have been strongly affected by the modification of the courses of the Copiapó and Huasco rivers, respectively. In concrete terms, the Copiapo River is becoming dry over a large part of its middle and lower portions due to removal of water for intense agricultural use (Hajek et al. 1990; Figure 3B). Among the localities recently described, Finca de Chañaral has become totally desiccated due to removal of water (Figure 3A), while Mauro, representing the southern limit of the distribution, has been practically destroyed by mining activity. Other localities have been drastically modified by road work, as is the case of the El Peral grade in Paposo and also Quebrada Los Sapos, where road construction has had serious effects on the reproductive sites of the species (Figure 3). At present there are only two localities within protected areas; Las Chilcas, in the Pan de Azúcar National Park and Las Cañas, in the Llanos de Challe National Park (Table 1), which represent only a small proportion of the area occupied by the species. All the other remaining localities occur near human settlements where mining, farming, ranching, and/or tourist activities develop, exerting a strong pressure on local water resources.

Based on recent evaluations of the conservation state of amphibians in Chile, *R. atacamensis* is classified as “out of danger”, or of least concern (Díaz-Páez and Ortiz 2003; Veloso 2006). Likewise, it is considered as a species of least concern by the International Union for the Conservation of Nature (Veloso and Nuñez 2004). These classifications differ from previous evaluations which had considered it as a vulnerable species (Glade 1988; Formas 1995; Núñez et al. 1997). It should be noted that most of these evaluations were based fundamentally on judgments made by experts (qualitative

information), following the guidelines of the IUCN (Thornback and Jenkins 1982). Only recently have quantitative data been taken into account to define the threatened species categories, including population sizes, geographic distribution, and analyses of the probability of extinction (IUCN 2001). Some of the preceding data have been incorporated into recent evaluations of the state of conservation of Chilean amphibians (Díaz-Páez and Ortiz 2003). Nevertheless, it is difficult to establish a correct categorization for *R. atacamensis*, since population studies have not as yet been carried out on the species, and thus it is only possible to speculate on some aspects such as size and connection of its populations. Also, as the present report shows, information on its real distribution in Chile is still being developed. Within this context, and in the absence of quantitative information, the lack of protection over most of its range, accelerated destruction and modification of its habitats and threats due to human management of water resources over its entire distribution need to be considered in order to reevaluate the status of conservation of *R. atacamensis*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Benito González and Oscar Parada for providing the information and photographic material on Río del Totoral, and Gonzalo Benavides for that on El Pino. The authors also thank Javiera Cisternas and Patricio Saldivia for the photography of the amphibians from Los Perales. C. Correa, P. Jara A. and G. Lobos acknowledge Grant CONICYT for Doctoral Studies. C. Correa also acknowledges Grant CONICYT AT-24071045. M. Méndez acknowledges FONDECYT 1061256 and CASEB.

Locality	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)	Reference
Paposo	25° 01' 33.2"	70° 27' 10.3"	332	Cei (1962)
Las Bandurrias	25° 12' 01.0"	70° 26' 01.0"	30	Sallaberry and Méndez (2002)
Las Breas	25° 30' 00.3"	70° 24' 01.7"	611	This report
Las Chilcas	26° 03' 48.8"	70° 32' 18.3"	407	Sallaberry and Méndez (2002)
Finca de Chañaral	26° 38' 57.9"	69° 51' 38.4"	1504	Sallaberry and Méndez (2002)
Mostazal	26° 40' 53.9"	69° 34' 14.8"	2574	This report
Carrera Pinto	27° 06' 40.2"	69° 53' 44.3"	1565	This report
Aguada de Chorrillos	27° 12' 49.8"	70° 56' 52.0"	27	Cei (1962)
Copiapó	27° 21' 55.7"	70° 20' 32.7"	381	Cei (1962)
Quebrada La Higuera	28° 01' 21.3"	70° 16' 29.5"	1100	Sallaberry et al. (2007)
Quebrada Los Sapos	28° 04' 48.4"	70° 24' 35.2"	1002	Sallaberry et al. (2007)
Las Cañas	28° 10' 12.1"	71° 06' 11.5"	323	Moreno et al. (2002)
El Pino	28° 29' 03.6"	71° 08' 45.0"	25	This report
Relincho	28° 32' 16.5"	70° 16' 03.3"	1546	This report
Vallenar	28° 35' 07.7"	70° 44' 38.9"	403	Cei (1962)
Pajonales	29° 08' 42.9"	70° 59' 45.2"	1010	Sallaberry and Méndez (2002)
Cruce a Chungungo	29° 35' 12.5"	71° 15' 10.4"	161	Sallaberry et al. (2007)
Quebrada de Talca	30° 03' 49.2"	71° 04' 21.7"	515	This report
Las Barrancas	30° 12' 43.4"	71° 16' 25.9"	209	This report
Socos	30° 43' 52.4"	71° 29' 27.8"	96	Sallaberry and Méndez (2002)
Talinay	30° 48' 39.5"	71° 36' 46.4"	250	This report
Canela Alta	31° 23' 08.2"	71° 25' 11.7"	307	Sallaberry et al. (2007)
Los Perales	31° 28' 46.3"	71° 07' 24.6"	653	This report
Mauro	31° 56' 59.5"	71° 03' 50.7"	764	Sallaberry et al. (2007)
Río del Totoral	31° 59' 04.0"	70° 30' 58.8"	1581	This report

Table 1. Coordinates and altitudes for *Rhinella atacamensis* localities reported in the literature (where it appears as *Bufo atacamensis*), and others recently discovered (this report), ordered by latitude from north to south. See map in Figure 1.

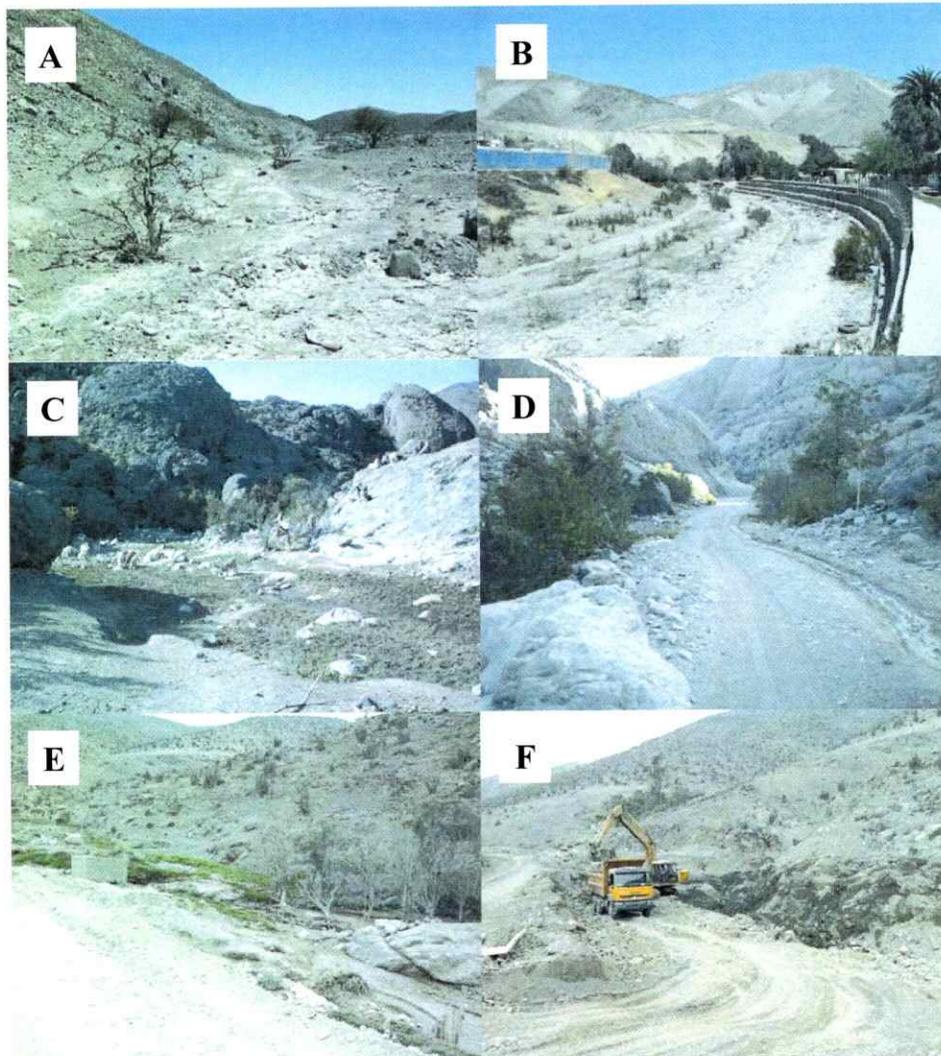


Figure 3. Current state of some localities of *Rhinella atacamensis* located in the regions of Antofagasta and Atacama. A. Finca de Chañaral, Atacama Region, October 2007. This site, fully within the Atacama Desert, was the northernmost locality described in the interior of Chile. It is at present completely dry due to intensive human use of the water. B. City of Copiapó, Atacama Region, October 2007. The bed of the Copiapó River close to the city is at present completely dry. *R. atacamensis* used to inhabit this site of the river 30 years ago. C: Quebrada Los Sapos, Atacama Region, November 2005. D: The same location in February 2008. A road built in the middle of the ravine restricted the water to a few pools which form on its edges. E: Paposos, Antofagasta Region, November 2005. F: The same location in January 2007. This locality was recognized by Cei (1962) as the northern distribution limit, and held an abundant population. This site is now affected by road construction which almost completely destroyed the reproductive sites of the population. The species was sympatric with *Pleurodema thaul* only in the Copiapó locality.

## LITERATURE CITED

- Cei, J. M. 1961. *Bufo arunco* (Molina) y las formas chilenas de *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 7: 59-81.
- Cei, J. M. 1962. *Batracios de Chile*. Santiago. Ediciones Universidad de Chile. 128 + cviii p.
- Correa, C., M. Sallaberry, B. A. González, E. R. Soto, and M. A. Méndez. 2007. Amphibia, Anura, Leiuperidae, *Pleurodema thaul*: Latitudinal and altitudinal distribution extension in Chile. *Check List* 3(3): 267-270.
- Di Castri, F. 1968. Esquisse écologique du Chili. Pp. 7-52. In C. Delamare-Deboutteville and E. Rapaport (eds.), *Biologie de l'Amérique australe*, Vol. IV. Paris. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique.
- Díaz-Páez, H. and J. C. Ortiz. 2003. Evaluación del estado de conservación de los anfibios en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 76(3): 509-525.
- Formas, J. R. 1995. Anfibios. Pp. 314-325. In J. A. Simonetti, M. T. K. Arroyo, A. E. Spotorno and E. Lozada (eds.), *Diversidad biológica de Chile*. Santiago. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica.
- Formas, J. R., A. Veloso and J. C. Ortiz. 2005. Sinopsis de los *Telmatobius* de Chile. *Monografías de Herpetología* 7: 103-114.
- Gajardo, R. 1995. *La Vegetación Natural de Chile: clasificación y distribución geográfica*. Santiago. Editorial Universitaria. 165 p.
- Glade, A. 1988. *Libro Rojo de los Vertebrados Terrestres Chilenos*. Santiago. Corporación Nacional Forestal, Impresiones Comerciales S.A. 67 p.
- Hajek, E. R., P. Gross and G. A. Espinoza. 1990. *Problemas ambientales de Chile*. Santiago. Agencia Internacional para el Desarrollo, Pontificia Universidad Católica and CONAMA. 206 p.
- IUCN. 2001. *Categorías y criterios de la Lista Roja de la UICN: versión 3.1*. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom. ii + 33 p.
- Moreno, R., J. Moreno, J. C. Ortiz, P. Victoriano, and F. Torres-Pérez. 2002. Herpetofauna del Parque Nacional Llanos de Challe (III Región, Chile). *Gayana (Chile)* 66(1): 7-10.
- Núñez, H., V. Maldonado, and R. Pérez. 1997. Reunión de trabajo con especialistas de herpetología para categorización de especies según estados de conservación. *Noticiario Mensual del Museo Nacional de Historia Natural (Chile)* 329: 12-19.
- Ortiz, J. C. and H. Díaz-Páez. 2006. Estado de conocimiento de los anfibios de Chile. *Gayana* 70(1): 114-121.
- Sallaberry, M. and M. A. Méndez. 2002. Geographic Distribution: *Bufo atacamensis*. *Herpetological Review* 33(3): 218-219.
- Sallaberry, M., E. Soto, C. Correa, and M. A. Méndez. 2007. Geographic Distribution: *Bufo atacamensis*. *Herpetological Review* 38: 214.
- Thornback, J. and M. Jenkins. 1982. *The IUCN Mammal Red Data Book, Part 1*. Gland, Switzerland. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 516 p.
- Veloso, A. 2006. Batracios de las cuencas hidrográficas de Chile: origen, diversidad y estado de conservación. Pp. 103-140. In I. Vila, A. Veloso, R. Schlatter and C

- Ramírez (eds.), *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*. Santiago. Editorial Universitaria.
- Veloso, A. and J. Navarro. 1988. Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. *Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino* 6(2): 481-539.
- Veloso, A. and H. Núñez. 2004. *Bufo atacamensis*. In IUCN 2007, 2007 IUCN Red List of Threatened Species. Electronic database accessible at [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Captured on 28 April 2008.
- Veloso, A., M. Sallaberry, J. Navarro, P. Iturra, J. Valencia, M. Penna, and N. Díaz. 1982. Contribución al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile. Pp. 135-268. In A. Veloso and E. Bustos (eds.), *La Vegetación y Vertebrados Ectotérmicos del Transecto Arica-Lago Chungará, Vol. I*. Montevideo. ROSTLAC, UNESCO.

**CAPÍTULO 3:**  
**DIVERGENCIA MORFOLÓGICA Y GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DE**  
***RHINELLA ATACAMENSIS* (ANURA, BUFONIDAE): ESTABLECIENDO LA**  
**CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE FACTORES PRÓXIMOS E HISTÓRICOS**  
**(MANUSCRITO EN PREPARACIÓN)**

### **3.1. Resumen**

La variación geográfica en atributos morfológicos es un fenómeno común, particularmente en especies que tienen amplios rangos de distribución donde las poblaciones pueden experimentar mayores niveles de heterogeneidad ambiental y espacial. La variación geográfica es el resultado de un balance entre fuerzas que producen diferenciación (esencialmente deriva génica y selección natural) y fuerzas que se oponen a esta diferenciación (flujo génico). La relevancia del estudio de la variación geográfica y la importancia relativa de los procesos evolutivos que la generan radica en que este tipo de variación puede dar origen a diferencias entre especies.

*Rhinella atacamensis* es un anfibio anuro endémico de Chile que tiene un extenso rango de distribución que abarca desde el límite sur del desierto de Atacama hasta la zona mediterránea de Chile central (25-32°S). Esta especie se caracteriza por un alto grado de variación fenotípica interpoblacional, principalmente en el tamaño corporal y los patrones de coloración, lo que provocó que las poblaciones del norte y el sur fueran consideradas como especies distintas. En este estudio se describe la variación en el tamaño corporal y en caracteres morfométricos de la morfología externa de adultos de poblaciones representativas de toda la distribución de esta especie por medio de análisis multivariados tradicionales. Además, se utiliza una aproximación comparativa  $P_{ST}$ - $F_{ST}$

para evaluar la importancia relativa de la deriva génica y la selección natural al producir la diferenciación morfométrica entre poblaciones.

El tamaño corporal promedio de las poblaciones aumenta gradualmente de norte a sur de manera que los rangos de variación de este carácter no se sobreponen entre las poblaciones de los extremos opuestos de la distribución. Algo similar ocurre con la variación morfométrica, donde las poblaciones ubicadas en los extremos norte y sur se segregan completamente en un espacio morfométrico. No hay una correlación entre los valores de  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  a lo largo de la distribución ya que solo  $F_{ST}$  muestra un patrón de variación regular, aumentando progresivamente de sur a norte.

El aumento de tamaño corporal con la latitud, que es consistente con la regla ecogeográfica de Bergmann, sugiere que la variación interpoblacional en este carácter es influenciado por gradientes selectivos asociados a gradientes ambientales. Por otra parte,  $P_{ST}$  es mayor que  $F_{ST}$  para las localidades ubicadas en el centro de la distribución, que en conjunto representan la máxima variación morfométrica observada en la especie, lo cual puede interpretarse como un efecto de selección natural diversificadora. En contraste,  $P_{ST}$  es menor que  $F_{ST}$  entre las dos localidades del extremo norte, lo cual puede ser explicado por selección estabilizadora. En el caso de las dos localidades del extremo sur, los valores de  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  se pueden considerar iguales, por lo que no es posible postular un rol preponderante para la deriva génica o la selección natural como causa principal de la diferenciación fenotípica entre esas poblaciones. En conjunto, estos resultados sugieren que la diferenciación genética no es suficiente para explicar el patrón de variación morfométrica entre las poblaciones de *R. atacamensis* y que hay que invocar causas ecológicas como la selección natural que han actuado con distinta intensidad a lo largo de la distribución.

**Palabras clave:** variación geográfica, morfometría, tamaño corporal,  $P_{ST}$ ,  $F_{ST}$ , deriva génica, selección natural.

### 3.2. Introducción

La variación geográfica es un fenómeno ubicuo que se define como la existencia de diferencias fenotípicas y/o genéticas entre poblaciones de una misma especie (Gould y Johnston 1972, Thorpe 2002, Ridley 2003). Debido a que las características que presentan variación geográfica tienen algún componente de control genético, sus patrones de variación pueden ser influenciados por factores históricos (donde se incluyen los efectos a largo plazo de la deriva génica), factores ecológicos (como la selección natural), o ambos (Thorpe 1987). Establecer la importancia relativa de los factores ecológicos e históricos que han moldeado esta variación es uno de los problemas fundamentales de la biología evolutiva, ya que la evolución de nuevas especies consiste en la transformación de la variación intraespecífica en diferencias entre especies (Ridley 2003, Futuyma 2005, Mallet 2008).

La extensión de la variación geográfica es el resultado de un balance de fuerzas que tienden a producir diferenciación genética local (mutación, deriva génica y selección natural) y fuerzas que tienden a producir homogeneidad genética (flujo génico) (Slatkin 1987). La interacción entre estas fuerzas puede ser modulada por las condiciones ambientales y la geografía por lo que es esperable que especies con amplia distribución muestren un mayor grado de variación debido a una mayor heterogeneidad ambiental y espacial (Jetz et al. 2009). Bajo ciertas circunstancias se pueden producir gradientes o clinas, que pueden definirse como cambios graduales en caracteres morfológicos o genéticos (e.g. frecuencias alélicas de algún gen) en función de la distancia geográfica (Endler 1977, Thorpe 1987). A modo de ejemplo, la relación positiva entre el tamaño corporal y la latitud, conocida como regla de Bergmann, es un patrón común en

mamíferos y aves (Meiri y Dayan 2003). Aunque los mecanismos postulados para explicar este tipo de patrón no están del todo claros y pueden diferir entre organismos (por ejemplo, entre endotermos y ectotermos), la existencia de esta relación provee importante evidencia de variación geográfica adaptativa debido a selección natural (Futuyma 2005, Lomolino et al. 2006).

Varios trabajos se han enfocado en la comparación de niveles de diferenciación entre rasgos morfológicos y marcadores genéticos neutrales a través de gradientes ecológicos para establecer si un patrón de variación morfológico, clinal o no, ha sido producido principalmente por selección natural (e.g. Thorpe et al. 1996, Schneider et al. 1999, Storz 2002, Mullen et al. 2009). En este contexto, las estimaciones de divergencia genética neutral, la cual en teoría es efecto de la deriva, proveen una hipótesis nula a la alternativa de divergencia adaptativa (Lynch 1990, Spitze 1993, Schluter 2000). Una de las aproximaciones más utilizadas para evaluar la importancia relativa de la selección y de la deriva génica (que puede ser importante en poblaciones pequeñas) en la variación de rasgos fenotípicos a nivel intraespecífico consiste en comparar el grado de subdivisión genética poblacional para rasgos cuantitativos ( $Q_{ST}$ ) con la divergencia alélica neutral entre poblaciones ( $F_{ST}$ ) (Merilä y Crnokrak 2001, McKay y Latta 2002, Leinonen et al. 2008, Whitlock 2008). Cuando la diferenciación poblacional en marcadores genéticos neutrales iguala a aquella exhibida por rasgos cuantitativos ( $Q_{ST} = F_{ST}$ ), la hipótesis nula no puede ser rechazada y la deriva no puede ser descartada como la causa de la divergencia poblacional (Lynch et al. 1999, Leinonen et al. 2008; una interpretación diferente es dada por Whitlock 2008). Cuando  $Q_{ST}$  y  $F_{ST}$  difieren significativamente, la selección posiblemente es responsable de ese patrón. Cuando  $Q_{ST}$

>  $F_{ST}$ , un régimen de selección direccional o disruptiva habría promovido la divergencia morfológica, mientras si  $Q_{ST} < F_{ST}$  una selección estabilizante se habría opuesto a la divergencia en los rasgos cuantitativos a pesar de la deriva (e.g. Spitze 1993, Long y Singh 1995, Petit et al. 2001, Steinger et al. 2002, Storz 2002, Gomez-Mestre y Tejedo, 2004, Manier et al. 2007, Ramírez-Valiente et al. 2009, Meyer et al. 2010).

Una revisión reciente ha mostrado, en concordancia con estudios previos, que en general los valores de  $Q_{ST}$  son en promedio más altos que los de  $F_{ST}$ , sugiriendo un rol mayor para la selección natural direccional como una fuerza conductora detrás de la diferenciación intraespecífica en rasgos cuantitativos (Leinonen et al. 2008).  $Q_{ST}$  es una razón calculada a partir de la varianza genética aditiva de un rasgo dentro de una población y la varianza genética entre poblaciones, por lo que se requieren cuidadosos experimentos de genética cuantitativa para obtener esas cantidades (Whitlock 2008). Debido a la excesiva dificultad de realizar ese tipo de experimentos en la mayoría de los sistemas naturales,  $Q_{ST}$  se ha estimado directamente a partir de la diferenciación fenotípica de las poblaciones (e.g. Merilä 1997, Storz 2002, Østbye et al. 2005, Sæther et al. 2007). El  $Q_{ST}$  calculado de esta manera recibe el nombre de  $P_{ST}$  (Pujol et al. 2008). Cuando  $P_{ST} > F_{ST}$  no es posible concluir que la selección natural ha jugado un rol relevante en la diferenciación poblacional, pero si es posible afirmar que la deriva génica ha sido insuficiente para explicar la divergencia fenotípica observada (Pujol et al. 2008). Es así como varios estudios en que se han comparado  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  han considerado sus hallazgos como evidencia preliminar para la hipótesis de adaptación local que requiere investigación adicional (Merilä 1997, Storz 2002, Leinonen et al. 2006).

La configuración geográfica de Chile, una estrecha franja limitada al este por la cordillera de Los Andes, y su enorme extensión latitudinal (17-56°S) determinan en gran medida la amplia gama de climas a lo largo del territorio (Santibáñez et al. 2008). La variación climática está dada principalmente por un aumento gradual de las precipitaciones y una disminución de la temperatura en sentido norte-sur (Luebert y Plissock 2006). Estos gradientes ambientales, modulados localmente por acentuados cambios topográficos, son los principales factores que han influido en la distribución de las formaciones vegetales (y su fauna asociada) a lo largo y ancho del territorio (Plissock y Luebert 2008).

Los anuros del género *Rhinella*, representados por cuatro o cinco especies (según los autores), en conjunto poseen el rango de distribución más amplio entre los anfibios de Chile, abarcando desde las alturas cordilleranas en la zona altiplánica del extremo norte hasta los bosques templados de Chiloé continental (Ceí 1962, Veloso y Navarro 1988, Veloso 2006). Dos de estas especies, *R. atacamensis* y *R. arunco*, se distribuyen en forma sucesiva entre los 25 y 38°S aproximadamente, con poblaciones tanto en la costa como el interior del país. El área habitada por estas especies corresponde a una transición gradual entre un bioclima mediterráneo hiperárido en el norte y uno mediterráneo pluviestacional-oceánico en el sur (Luebert y Plissock 2006), abarcando desde el límite sur del desierto de Atacama hasta el límite norte de los bosques templados australes. Ceí (1962) indicó que la distribución de *R. atacamensis* estaba conformada solo por unas pocas localidades en la zona desértica entre los 25 y 30°S, y que desde ahí hacia el sur era remplazada por su especie hermana *R. arunco*. Sin embargo, reportes recientes han extendido la distribución de *R. atacamensis* hasta los

32°S, indicando además, que *R. arunco* no estaría presente entre los 30 y 32°S (Correa et al. 2008, Capítulo 2).

Cei (1961, 1962) describió un alto nivel de divergencia morfológica entre dos poblaciones de *R. atacamensis*: Paposo, en el extremo norte de la distribución (25°S), y Vallenar (28°30'S). Las diferencias descritas no solo se restringían a ciertas medidas morfométricas sino que también involucraban características de los patrones de coloración e incluso el nivel de dimorfismo sexual (según este autor casi inexistente en la población de Paposo). Estas diferencias fueron atribuidas a “equilibrios génicos propios”, particularmente en la población de Paposo (Cei 1962). El descubrimiento de nuevas localidades de *R. atacamensis* entre los 30 y 32°S amplió considerablemente su rango de variación geográfica. Aunque las nuevas poblaciones fueron identificadas principalmente por el acentuado dimorfismo sexual en los patrones de coloración y características de la piel (lisa y sin cornificaciones), el tamaño de los individuos adultos es mayor (80-125mm) y sus patrones de coloración son diferentes (ver Resultados y Capítulo 5). Cei (1962) definió entre 60 y 82mm la longitud corporal para los adultos de las poblaciones de la zona norte (25-28°30'S) por lo que prácticamente no habría sobreposición de tamaño entre los dos grupos de poblaciones (aunque no se puede descartar que ejemplares de tamaño intermedio se encuentren en el área geográfica que los separa).

La notable divergencia morfológica entre las poblaciones del norte y del sur de *R. atacamensis* fue la causa probable de que Cei (1962) clasificara a las poblaciones de Ovalle y Talinay como *R. arunco*. La descripción que él hace de los ejemplares de algunas poblaciones de *R. arunco*, “Los individuos de la zona costera son generalmente

más claros con manchas oscuras definidas y escasa cornificación epidérmica. Estas manchas son muy extensas, especialmente en los ejemplares de Ovalle y Talinay”, concuerda con las características típicas de las nuevas poblaciones de *R. atacamensis* descritas en el área costera entre los 30 y 32°S (ver Capítulo 4). Aunque no se puede descartar completamente que haya poblaciones de *R. arunco* en esa zona, una exploración intensa y un estudio filogeográfico en todo el rango de *R. atacamensis*, que incluye las localidades de Talinay y Socos (32km al suroeste de Ovalle), muestran que toda esa área estaría ocupada por esta especie (Capítulo 4).

Uno de los objetivos de este estudio fue describir la variación geográfica en la morfología externa de *R. atacamensis* mediante análisis multivariados tradicionales, en ejemplares adultos de seis localidades representativas de todo su rango de distribución, para establecer si hay diferencias morfométricas entre las poblaciones del norte y del sur que sean concordantes con la divergencia descrita en sus patrones de coloración y tamaño corporal. Este estudio morfométrico fue profundizado con una aproximación comparativa  $P_{ST}$ - $F_{ST}$  entre las poblaciones contiguas para evaluar si la deriva génica es suficiente o no como explicación de la divergencia morfométrica observada entre ellas (Pujol et al. 2008). Los valores de  $F_{ST}$  se obtuvieron de marcadores AFLP, los cuales se utilizaron junto con secuencias mitocondriales para un estudio filogeográfico de *R. atacamensis* en toda su distribución (Capítulo 4). Aunque en ese estudio los patrones de diferenciación genética intra e interpoblaciones encontrados con ambos marcadores fueron ampliamente concordantes, para el presente estudio se escogieron las medidas de diferenciación interpoblacional obtenidas con los AFLPs debido a que en conjunto estos marcadores proporcionan una mayor cobertura del genoma.

### 3.3. Materiales y métodos

#### *Material y sitios de estudios*

Se incluyeron ejemplares de seis localidades de *Rhinella atacamensis* ubicadas a lo largo de toda la distribución de esta especie, la cual ha sido definida entre los 25 y 32°S (Correa et al. 2008, Capítulo 2; Figura 3.1; Tabla 3.1). Los ejemplares de Paposo y Cochiguaz Alto fueron recolectados en más de un sitio, pero en los dos casos los sitios se ubican a menos de 10km y a lo largo del mismo sistema hídrico. Estos ejemplares fueron reunidos para simplificar el esquema de muestreo y aumentar el número de muestras por localidad. Para el estudio genético, la gran mayoría de los ejemplares utilizados fueron adultos, pero también se incluyeron larvas, postmetamórficos y juveniles. Para el estudio morfológico, se utilizaron exclusivamente ejemplares adultos, identificados principalmente por sus caracteres sexuales secundarios, callosidades en los dedos en el caso de los machos, y por la presencia de huevos maduros en el caso de las hembras. La mayor parte de los especímenes medidos fueron utilizados también para obtener los marcadores moleculares.

Las seis localidades foco fueron escogidas para tratar de representar la mayor parte de la variación genética de la especie, considerando la variación observada con secuencias de la región control mitocondrial y marcadores AFLP (Capítulo 4): tres de ellas se ubican más o menos equidistantemente en la zona más árida de la distribución (al norte de los 30°S) y las otras tres se ubican en cada una de las tres principales cuencas que conforman el tercio sur del rango (Figura 3.1), donde se observó la mayor variación mitocondrial y nuclear. Todos los especímenes fueron depositados en la colección herpetológica del Departamento de Biología Celular y Genética de la

Universidad de Chile (DBGUCH). Los permisos para la captura y recolección de los animales fueron proporcionados por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) (resoluciones 3085/2000, 2105/2004 y 13/2006).

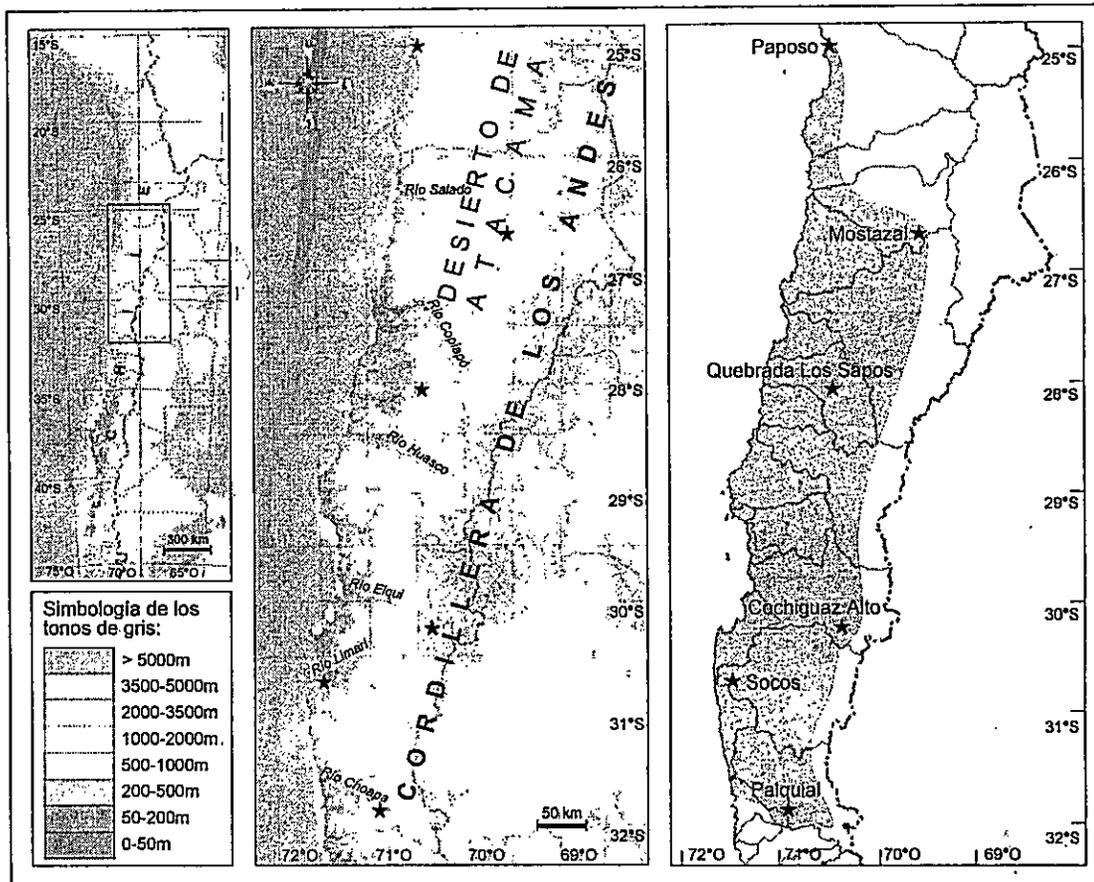


Figura 3.1.- Ubicación geográfica de las seis localidades de *Rhinella atacamensis* incluidas en este estudio. En el mapa del medio se señalan las localidades (estrellas) y los principales rasgos geográficos y ríos dentro de la distribución de esta especie (25-32°S). El mapa del extremo derecho muestra los nombres de las localidades y los límites de las cuencas hidrográficas donde éstas se ubican. El área sombreada de ese mapa representa la distribución aproximada de *R. atacamensis*.

Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (msnm)	Morfometría	AFLPs
Paposo	25° 01' 33,2"	70° 27' 10,3"	332	16	19
Mostazal	26° 40' 53,9"	69° 34' 14,8"	2574	16	19
Quebrada Los Sapos	28° 04' 48,4"	70° 24' 35,2"	1002	16	16
Cochiguaz Alto	30° 15' 38,5"	70° 19' 33,8"	2277	9	11
Socos	30° 43' 52,4"	71° 29' 27,8"	96	16	12
Palquial	31° 53' 17,0"	70° 56' 42,5"	596	10	18

Tabla 3.1.- Coordenadas y alturas de las localidades de *Rhinella atacamensis* incluidas en este estudio, ordenadas de norte a sur (ver mapa de la Figura 3.1). Se indica además el número de ejemplares por localidad utilizados para obtener los datos morfométricos y los marcadores AFLP.

#### *Análisis morfométricos y cálculo de $P_{ST}$*

Se obtuvieron medidas morfométricas de un número variable de machos y hembras adultos por localidad (Tabla 3.1). Las variables corresponden a 17 medidas lineales de la morfología externa: longitud hocico-cloaca (LHC), ancho de la cabeza (AnC), altura de la cabeza (AlC), ancho de la mandíbula (AM), longitud del antebrazo (LA), longitud de la pata (LP), longitud de la tibia (LT), longitud del fémur (LF), distancia boca-narina (DBN), distancia ojo-narina (DON), ancho interorbital (AI), distancia de la boca al eje interorbital (DBEI), diámetro parótida (DP), distancia internarina (DI), diámetro del ojo (DO), diámetro del tímpano (DT) y longitud de la cabeza (LC). Para el caso de los atributos bilaterales se utilizó el promedio de las medidas de ambos lados. Para todos los análisis multivariados se utilizó el logaritmo en base diez de todas las medidas. Para examinar si existen diferencias morfométricas entre las poblaciones se realizó un análisis de covarianza multivariado (MANCOVA), utilizando la longitud hocico-cloaca como covariable, y la localidad y sexo como factores. Adicionalmente, se realizó un MANCOVA utilizando solo la localidad como

variable predictora. También se realizaron pruebas univariadas para cada una de las 17 variables (utilizando los mismos factores) para establecer si presentaban diferencias entre poblaciones. Para visualizar el patrón de diferenciación poblacional e identificar las variables más relevantes que lo determinan, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando la matriz de correlación. La diferenciación morfométrica entre poblaciones fue explorada también con un Análisis Discriminante (AD), en que se utilizó la localidad como variable discriminante. Las funciones discriminantes fueron obtenidas a partir de las puntuaciones factoriales (“factor scores”) de los primeros componentes del ACP que en conjunto acumularon al menos el 95% de la varianza. La tabla de clasificación del AD se obtuvo con un procedimiento de “jackknife”. Todos los análisis fueron realizados con el programa STATISTICA v8.0 (StatSoft 2007), excepto el AD, que se realizó con el programa SYSTAT v12 (Systat Software, Inc., San José, California, USA).

Las medidas de diferenciación poblacional para el conjunto de los rasgos morfométricos medidos,  $P_{ST}$ , fueron calculadas siguiendo el procedimiento descrito en Spitze (1993) y Storz (2002). Por definición,  $P_{ST} = \sigma^2_{entre} / (\sigma^2_{entre} + 2\sigma^2_{dentro})$ , donde  $\sigma^2_{entre}$  y  $\sigma^2_{dentro}$  corresponden a los componentes de varianza genética del rasgo entre y dentro de las poblaciones comparadas, respectivamente (Spitze 1993). Estos componentes fueron igualados a sus estimaciones,  $Var(entre)$  y  $Var(dentro)$ , las cuales fueron obtenidas a partir de análisis de ANOVA de las puntuaciones del primer CP del ACP para cada par de localidades, según las siguientes equivalencias:  $Var(dentro) = CM_{dentro}$  (cuadrados medios dentro de las poblaciones) y  $Var(entre) = (CM_{entre} - CM_{dentro})/n_0$ , donde  $n_0$  es el tamaño de muestra promedio que se calculó con la fórmula

especificada en Storz (2002, p. 2539). Los valores de  $P_{ST}$  fueron calculados para cada par de localidades contiguas geográficamente remplazando en la fórmula  $\sigma^2_{entre}$  y  $\sigma^2_{dentro}$  por  $Var(entre)$  y  $Var(dentro)$  (Storz 2002).

#### *Obtención de DNA y marcadores AFLP*

El DNA para obtener los marcadores AFLP se extrajo exclusivamente de músculo: del muslo en el caso de adultos, de la lengua en el caso de juveniles y postmetamórficos, y de la cola en el caso de las larvas. Para la extracción se utilizó un método de sales modificado de Jowett (1986). El DNA total fue previamente purificado antes de realizar la digestión. La purificación se realizó agregando al DNA 0,1 volumen de NaAc 3M, pH 5,2 y luego 2,5 volúmenes de etanol absoluto con respecto al volumen anterior. Esta mezcla se dejó por toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ , luego se centrifugó y finalmente se suspendió en un volumen variable de agua dependiendo del tamaño del "pellet" observado.

Para la etapa de digestión y ligación se prepararon diluciones de  $50\text{ng}/\mu\text{L}$ . El DNA fue digerido con dos enzimas de restricción en una mezcla de  $25\mu\text{L}$  que contenía  $0,2\text{mg}/\mu\text{L}$  de BSA, 5U de endonucleasa MseI (New England Biolabs), 5U de endonucleasa EcoRI (New England Biolabs) y 250ng de DNA durante 3h a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguidos por 15 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  para desactivar las enzimas. Inmediatamente, se continuó con la etapa de ligación para lo cual se agregó a la reacción de digestión una mezcla de  $10\mu\text{L}$  compuesta por adaptador MseI  $0,5\mu\text{M}$  ( $5'$ -GACGATGAGTCCTGAG- $3'$ /'-TACTCAGGACTCAT- $5'$ ), adaptador EcoRI  $0,05\mu\text{M}$  ( $5'$ -

CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5') y 132U de ligasa de DNA T4 (New England Biolabs). Esta reacción se mantuvo a 16°C por toda la noche.

Las concentraciones o cantidades de reactivos para la PCR preselectiva fueron las siguientes (25µL de volumen total): 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,36mM de cada dNTP, 0,24µM de cada partidor preselectivo (EcoRI-A: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' y MseI-C: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'), 1U de polimerasa Taq (Invitrogen) y 5µL de DNA digerido-ligado, diluido 10 veces. El perfil térmico para esta reacción fue el siguiente: 94°C por 2min, seguido por 28 ciclos de 94°C por 45s, 56°C por 45s y 72°C por 2min, y una extensión final de 72°C por 5min. Para escoger los partidores para las PCR selectivas, previamente se realizó un "screening" con unas pocas muestras seleccionadas de las seis localidades foco en que se probaron 16 combinaciones de estos partidores (todas las combinaciones entre los cuatro partidores EcoRI-ACX y los cuatro MseI-CAX, donde X representa una A, C, G o T).

La PCR selectiva se realizó con la siguiente combinación de reactivos, donde el partidor EcoRI-ACX fue marcado en su extremo 5' con uno de cuatro fluoróforos (6FAM, VIC, NED o PET): 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,45mM de cada dNTP, 0,25µM de partidor MseI-CAX, 0,15µM de partidor EcoRI-ACX marcado, 0,9U de polimerasa Taq (Invitrogen) y 5µL de producto de la PCR preselectiva, diluido 25 veces. El perfil térmico de esta reacción fue: 94°C por 2min, seguido por 12 ciclos de 94°C por 45s, 65 hasta 57°C por 45s (disminuyendo en un grado cada ciclo) y 72°C por 2min, seguidos por 23 ciclos de 94°C por 45s, 56°C por 45s y 72°C por 2min, y finalmente una etapa de extensión a 72°C por 5min. Para optimizar los costos de genotipificación se escogieron ocho combinaciones de partidores, dos por cada uno de los fluoróforos: MseI-

CAC/6FAM-EcoRI-ACT, MseI-CAT/6FAM-EcoRI-ACT, MseI-CAA/VIC-EcoRI-ACC, MseI-CAG/VIC-EcoRI-ACC, MseI-CAG/NED-EcoRI-ACG, MseI-CAT/NED-EcoRI-ACG, MseI-CAC/PET-EcoRI-ACA y MseI-CAT/PET-EcoRI-ACA. La genotipificación se realizó mezclando cuatro de los productos fluorescentes de las PCRs selectivas (en una proporción 1:1:1:2, 6FAM:VIC:NED:PET), mezcla que fue separada por electroforesis capilar en un equipo ABI3730XL con un filtro G5.

#### *Análisis de los AFLPs y cálculo de $F_{ST}$*

Los electroferogramas de los AFLPs fueron visualizados y procesados con el programa GeneMarker v1.85 (SoftGenetics) manteniendo la mayor parte de las opciones por defecto y aplicando un proceso de normalización. Las bandas fueron codificadas con ayuda de un panel construido con algunas muestras representativas de las localidades foco, el cual permite definir las ubicaciones en pares de bases donde se encuentran las bandas ("bins") y, al ser aplicado, reconocerlas automáticamente. Debido a que la aplicación del panel y las opciones por defecto del programa no permitieron reconocer algunas bandas intensas y claramente definidas como tales, se revisaron todos los perfiles de fluorescencia y se codificaron manualmente las bandas omitidas. En este último proceso solo se reconocieron como bandas las señales con una intensidad sobre 200 unidades de fluorescencia, siempre y cuando este valor fuera superior a la oscilación de fondo (ruido). Para minimizar la subjetividad de este procedimiento la codificación se restringió a aquellas bandas que presentaran una señal intensa y que fueran claramente distinguibles de señales próximas y del ruido. Además, este análisis se restringió a las bandas de bajo tamaño, en general entre 70 y 300 pares de bases dependiendo de la

combinación de partidores. Con esto se obtuvo una matriz de presencia (1) y ausencia (0) de bandas para cada uno de los "bins" definidos con cada fluoróforo. Cada "bin" es un marcador AFLP que se considera, para los análisis genéticos, como un locus que segrega independientemente. Los índices de fijación ( $F_{ST}$ ) entre todas las localidades fueron calculados con el programa AFLP-SURV (Vekemans 2002) utilizando solamente los marcadores AFLP variables.

### 3.4. Resultados

#### *Análisis morfométricos*

El MANCOVA realizado con la longitud hocico-cloaca como covariable y localidad y sexo como factores, indicó que ambas variables y su interacción explican la variación morfométrica multivariada entre adultos de las seis poblaciones de *R. atacamensis* (localidad: lambda de Wilks = 0,016,  $P < 0,01$ ; sexo: lambda de Wilks = 0,424,  $P < 0,01$ ; interacción: lambda de Wilks = 0,198,  $P = 0,04$ ). Desde un punto de vista univariado, casi todas las variables medidas contribuyen a la diferenciación entre localidades (excepto el ancho interorbital), pero solo cuatro a la diferenciación entre sexos (altura de la cabeza, longitud de la tibia, longitud del fémur y distancia ojo-narina) y tres a la interacción entre localidad y sexo (altura de la cabeza, distancia internarina y diámetro del ojo),

A pesar de que este análisis revela que hay diferencias morfométricas entre sexos en esta especie (e interacción entre factores), se decidió no considerar este factor en los otros análisis multivariados debido a que el número de ejemplares por sexo es distinto o muy bajo para uno de ellos en algunas localidades. Al graficar la longitud hocico-cloaca

en función de la latitud se aprecia un aumento gradual de tamaño corporal de norte a sur (Figura 3.2). La diferencia de tamaño entre los extremos de la distribución es de tal magnitud que no se observa superposición de rangos entre esas poblaciones, aunque hay que tener en cuenta el bajo número de ejemplares incluidos por localidad.

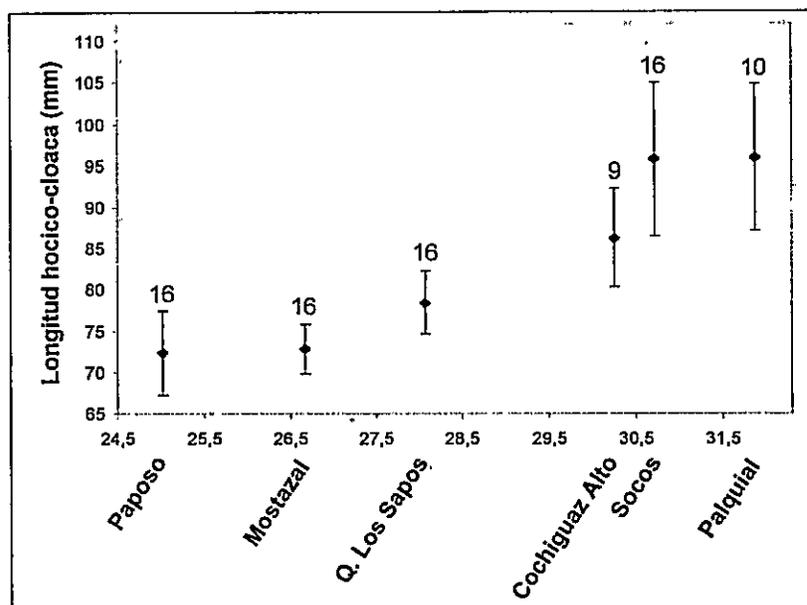


Figura 3.2.- Longitud hocico-cloaca en función de la latitud para seis poblaciones representativas de la distribución de *Rhinella atacamensis* (25-32°S). El rombo indica el promedio, mientras que las barras representan la desviación estándar. La latitud es expresada en grados centesimales. Los números sobre las barras indican el número de ejemplares medidos por localidad, incluyendo machos y hembras.

Los primeros seis ejes del análisis de componentes principales (ACP) explican el 95,27% de la varianza (84,17; 3,50; 2,72; 2,15; 1,46 y 1,27, sucesivamente). Las correlaciones de las variables ("factor loadings") con el primer eje variaron entre -0,972 (longitud hocico-cloaca) y -0,720 (altura de la cabeza), pero la mayoría fue mayor, en valor absoluto, a 0,9 (13 de las 17 variables). El patrón de diferenciación poblacional encontrado con este análisis se muestra en la Figura 3.3, donde se grafican las

puntuaciones factoriales para los dos primeros componentes principales (CPs), que en total explican 87,67% de la varianza. En este gráfico se observa que las poblaciones se ordenan, con cierto grado de sobreposición, de derecha a izquierda a lo largo del primer CP siguiendo el mismo orden de ubicación norte-sur, de manera que las poblaciones representativas de los extremos geográficos de la distribución no se sobreponen en el espacio morfométrico (Paposo y Mostazal del extremo norte y Socos y Palquial del extremo sur). Además, se aprecia cierta segregación entre las poblaciones ubicadas sobre los 2000m (Mostazal y Cochiguaz Alto) y bajo los 2000m a lo largo del segundo componente principal (Figura 3.3). El patrón general de diferenciación morfométrica revelado en el análisis de ACP (i.e. el patrón correspondiente al primer CP) concuerda con el aumento gradual de tamaño corporal que se observa entre las poblaciones de *R. atacamensis* en un sentido norte-sur (Figura 3.2).

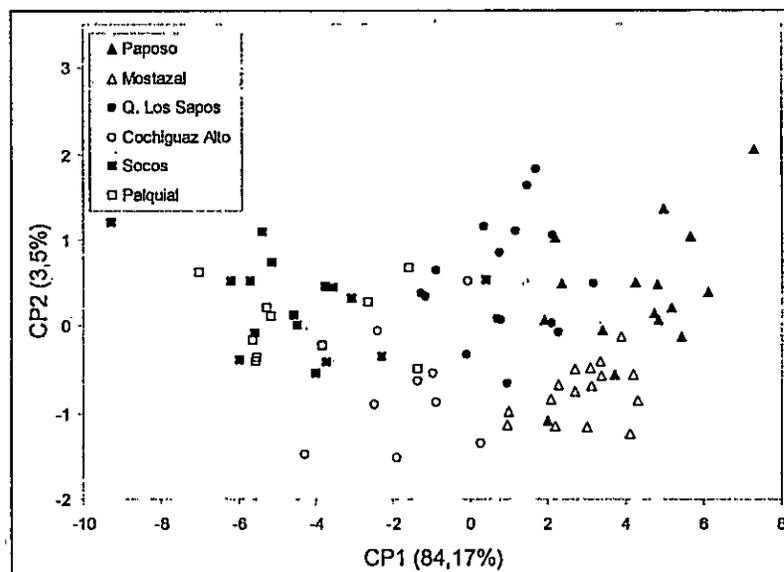


Figura 3.3.- Puntuaciones factoriales de los primeros dos componentes principales (CPs) para 83 ejemplares de *Rhinella atacamensis* provenientes de seis localidades representativas de toda la distribución de esta especie. Junto a cada eje se indica el porcentaje de varianza explicado por cada componente.

El análisis discriminante se realizó con las puntuaciones factoriales de cada ejemplar correspondientes a los seis primeros componentes del ACP (95,27% de la varianza). Los valores de clasificación obtenidos con este análisis fluctuaron entre 67% para Cochiguaz Alto y 88% para cuatro localidades (Tabla 3.2). La mayor parte de los ejemplares mal clasificados se asignaron a las poblaciones contiguas, lo cual es consistente con el patrón de diferenciación gradual y la sobreposición de las poblaciones observado en el ACP (Figura 3.3).

Localidad	1	2	3	4	5	6	n	Clasificación correcta (%)
1. Paposo	14	2	0	0	0	0	16	88
2. Mostazal	2	14	0	0	0	0	16	88
3. Q. Los Sapos	0	1	14	1	0	0	16	88
4. Cochiguaz Alto	0	1	1	6	0	1	9	67
5. Socos	0	0	1	0	14	1	16	88
6. Palquial	0	0	1	1	1	7	10	70
Total	16	18	17	8	15	9	83	

Tabla 3.2.- Tabla de clasificación de 83 ejemplares de *Rhinella atacamensis* de seis localidades obtenida con un análisis discriminante aplicando un procedimiento de "jackknife". Las celdas indican el número de ejemplares clasificados en la localidad respectiva y la última fila el número total clasificado en cada localidad independientemente de su origen. El análisis se realizó con las puntuaciones factoriales de cada ejemplar correspondientes a los seis primeros componentes del análisis de componentes principales (95,27% de la varianza).

#### Cálculos de $P_{ST}$ y $F_{ST}$

Los valores de  $P_{ST}$ , calculados a partir de las puntuaciones del primer CP del ACP, se muestran en la Tabla 3. Los valores fluctúan entre -0,041 y 0,451 y no muestran una correlación con la latitud. Los valores más altos corresponden a las comparaciones entre las localidades del centro de la distribución. En el caso de Palquial y Socos, el  $P_{ST}$  tiene un valor negativo debido a que la varianza intrapoblacional es extremadamente alta

en comparación a la varianza entre esas poblaciones. Ya que  $P_{ST}$  está definido entre 0 y 1, este valor fue considerado como cero para la comparación.

Para los análisis de diferenciación genética, un total de 179 marcadores AFLP se codificaron a partir de cinco combinaciones de partidores. Tres de las ocho combinaciones consideradas inicialmente fueron excluidas por producir pocas bandas informativas, y/o perfiles de baja calidad, que no pudieron ser codificados para algunas muestras. De los 179 marcadores, 78 fueron constantes, o sea, fueron codificados como presentes en todas las muestras, por lo que los cálculos de  $F_{ST}$  se hicieron utilizando solo los 101 marcadores variables. Los valores de  $F_{ST}$  fluctuaron entre 0,0270 y 0,5868 y, en contraste con los  $P_{ST}$ , muestran una clara correlación con la latitud (aumentando de sur a norte) que refleja un aumento cada vez mayor de la diferenciación genética a medida que aumenta la aridez del área de distribución.

Localidades	$P_{ST}$	$F_{ST}$
Paposo-Mostazal	0,198	0,587
Mostazal-Q. Los Sapos	0,417	0,297
Q. Los Sapos-Cochiguaz Alto	0,451	0,157
Cochiguaz Alto-Socos	0,366	0,048
Socos-Palquial	-0,040*	0,027

Tabla 3.3.- Valores de  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  correspondientes a las comparaciones entre localidades contiguas de *Rhinella atacamensis* a lo largo de su distribución (seis localidades). Las localidades son ordenadas de norte a sur (ver Figura 3.1). \*Este valor fue considerado como cero para efectos comparativos.

Los valores de  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  para todas las comparaciones de localidades se muestran en la Tabla 3.3. Aquí se puede apreciar que los valores de  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  no están correlacionados y que en general los  $P_{ST}$  son mayores que los  $F_{ST}$  (tres de cinco comparaciones). En un caso, Paposo-Mostazal, el  $F_{ST}$  es mayor que  $P_{ST}$  y para la

comparación Socos-Palquial estos dos valores pueden considerarse equivalentes ya que el  $P_{ST}$  es prácticamente cero y el  $F_{ST}$  presenta el valor más bajo entre todas las comparaciones.

### 3.5. Discusión

Los análisis morfométricos multivariados muestran que *Rhinella atacamensis* tiene un alto grado de variación geográfica en la morfología externa entre poblaciones, particularmente entre las que se ubican en los extremos norte y sur de su rango de distribución. Estos niveles de variación son esperables en especies con extensos rangos de distribución y alto grado de heterogeneidad ambiental como en este caso (Jetz et al. 2009). Los patrones de variación geográfica descritos en este estudio deben ser considerados en el contexto de los estudios morfológicos de Cei (1961, 1962) y de las ampliaciones de rango entre los 30 y 32°S reportadas desde 2002 (Correa et al. 2008, Capítulo 2). Estos últimos hallazgos no solo permitieron aumentar significativamente el área geográfica donde esta especie se distribuye sino también el rango de variación geográfica en características morfológicas como el tamaño y los patrones de coloración.

Cei (1961, 1962) destacó las diferencias en los patrones de coloración entre la población de Paposo y Vallenar (28°30'S), mencionando además algunas pequeñas diferencias morfométricas entre ellas, pero no señala diferencias en el tamaño corporal (aunque sus datos sugieren un tamaño levemente mayor para los ejemplares machos de Vallenar, algo similar a lo que se observó en este estudio entre las poblaciones de Paposo y Q. Los Sapos). La identificación inicial de las poblaciones ubicadas entre 30 y 32°S como *R. atacamensis*, basada principalmente en el dimorfismo sexual de la

coloración, fue ratificada con marcadores moleculares mitocondriales y nucleares (Capítulo 4). Esto significa no solo un aumento notable del rango de variación en el tamaño corporal de esta especie, como se desprende de los análisis realizados en este estudio, sino también de la variación geográfica en los patrones de coloración, la cual aún no ha sido descrita formalmente para la especie en su totalidad. Las diferencias de tamaño y patrón de coloración entre las nuevas localidades descubiertas en el sur de la distribución y las descritas por Cei (1961, 1962) en el extremo norte son tan grandes que constituyen probablemente la causa de que este autor las haya incluido en especies diferentes (Cei 1962).

Aunque los datos morfométricos obtenidos en este estudio muestran que no habría sobreposición en el tamaño de los individuos adultos ni en el espacio morfométrico de las poblaciones de extremos geográficos opuestos, hay poblaciones ubicadas entre ellas que presentan valores intermedios. Es evidente que en esta especie hay un aumento de norte a sur en el tamaño corporal de los adultos, pero el número de localidades y la cobertura geográfica utilizada en este estudio son insuficientes para establecer si este patrón es gradual o presenta discontinuidades geográficas. El mismo argumento puede aplicarse a la diferenciación morfométrica entre poblaciones a lo largo de su distribución. El gradiente de aridez de esta zona, producido por la disminución constante de las precipitaciones de sur a norte (Luebert y Plischoff 2006), implica una escasez creciente de hábitats para esta especie a medida que la aridez aumenta. Esto sugiere que la mayoría de las poblaciones están aisladas, particularmente en la parte norte de la distribución, por lo que es posible que presenten cambios abruptos en todo tipo de caracteres con respecto a poblaciones cercanas.

Independientemente de si el aumento de tamaño con la latitud es gradual o discontinuo, el patrón se ajusta a la regla de Bergmann, una regla ecogeográfica que en su formulación original establecía que entre especies endotermas del mismo género las que ocupan ambientes más fríos (asociados a altas latitudes) tienen un mayor tamaño (Watt et al. 2010). Sin embargo, los estudios posteriores han ampliado la definición (para incluir poblaciones), el rango taxonómico (e.g. a ectotermos) y los mecanismos postulados para explicar esta tendencia (Lomolino et al. 2006). Esta regla se ha establecido como una generalización válida para mamíferos y aves (e.g. Meiri y Dayan 2003), pero su aplicación en vertebrados ectotérmicos ha sido intensamente debatida (Belk y Houston 2002, Ashton y Feldman 2003, Olalla-Tárraga y Rodríguez 2007, Adams y Church 2008). En el caso de *R. atacamensis*, es necesario un muestreo más extenso, que considere además la variable altitud, para establecer si el patrón se ajusta a la regla de Bergmann antes de hipotetizar acerca de los mecanismos.

Todos los mecanismos postulados para explicar la existencia de este tipo de patrón son de tipo ecológico y se relacionan principalmente con la termorregulación o la disponibilidad de alimento (Watt et al. 2010). Independientemente de si la variación interpoblacional en el tamaño corporal de *R. atacamensis* se ajusta o no a la regla de Bergmann, el patrón de variación geográfica observado en las variables morfométricas y particularmente en el tamaño corporal, requiere considerar además causas históricas en su generación (Thorpe 1987). Uno de los factores históricos que puede producir diferenciación en cualquier tipo de rasgos entre poblaciones es la deriva génica, la cual puede ser la fuerza evolutiva preponderante en poblaciones de pequeño tamaño (Slatkin 1987, Thorpe 1987). El enfoque comparativo  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  puede servir para establecer si la

deriva es suficiente para explicar la diferenciación poblacional de rasgos fenotípicos (Pujol et al. 2008). En el caso de las poblaciones analizadas de *R. atacamensis* no hay una correlación entre los valores de  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$ , pero sí se observa una tendencia clara en los valores de  $F_{ST}$ , los cuales aumentan progresivamente de sur a norte. Esta tendencia puede atribuirse a los efectos del aislamiento prolongado, combinados con cuellos de botella, producidos por el acentuamiento de la aridez hacia el norte de la distribución, como se desprende de un estudio filogeográfico en esta especie (Capítulo 4). En contraste, no hay una tendencia clara en los valores de  $P_{ST}$  a lo largo de la distribución de *R. atacamensis*.

Al considerar individualmente los valores de  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  se aprecia que en tres de las cinco comparaciones, que involucran las localidades geográficamente intermedias,  $P_{ST}$  es mayor que  $F_{ST}$ . En conjunto estas localidades son las que presentan los valores más heterogéneos de tamaño corporal y valores altos de clasificación en el análisis discriminante (con excepción de Cochiguaz Alto), por lo que se puede considerar que representan casi la totalidad de la variación morfométrica observada en la especie. De acuerdo a la interpretación más aceptada para  $P_{ST} > F_{ST}$  (en estricto rigor  $Q_{ST} > F_{ST}$ , Leinonen et al. 2008), la causa probable de la diferenciación podría ser la selección natural direccional favoreciendo distintos fenotipos en las diferentes poblaciones. Como destacan Pujol et al. (2008) y Whitlock (2008), este resultado no puede ser utilizado para inferir que la selección natural ha jugado un rol en la diferenciación fenotípica, particularmente cuando se utiliza  $P_{ST}$ , pero en el caso de estas poblaciones la diferenciación genética neutral, medida como  $F_{ST}$ , es consistentemente más baja y no alcanza los valores extremos observados dentro de la especie. Estos últimos resultados

muestran que la deriva génica no ha sido tan intensa en estas poblaciones, lo cual sugiere que otros procesos (selección natural, plasticidad fenotípica) pueden ser responsables de la diferenciación fenotípica (Pujol et al. 2008).

Las comparaciones de las localidades extremas requieren explicaciones adicionales. En el caso de Paposo-Mostazal el  $P_{ST}$  es menor que el  $F_{ST}$ . La interpretación para este resultado es que el grado de diferenciación observado es menor al esperado si la deriva génica fuera el único proceso responsable, por lo que la causa más probable sería un régimen de selección estabilizadora (Leinonen et al. 2008). Estas dos poblaciones poseen tamaños corporales similares, pero pueden distinguirse morfométricamente según el análisis discriminante. Este último resultado es difícil de conciliar con el bajo valor de  $P_{ST}$ , aunque hay que considerar que este último valor no toma en cuenta la diferenciación contenida en el resto de los componentes del ACP. Es posible que estas dos poblaciones posean adaptaciones comunes a la vida en pequeños cursos de agua aislados en un ambiente desértico, entre ellas un tamaño similar (relativamente pequeño en comparación a las poblaciones del sur). Sin embargo, las condiciones ambientales (e.g. temperatura, humedad, nivel de precipitaciones) pueden diferir entre estas poblaciones debido a la diferencia de altura, por lo que es esperable que haya diferencias en otros rasgos como ocurre con los patrones de coloración (Correa, Méndez, observaciones personales).

Para las localidades del extremo sur de la distribución, Socos y Palquial, los valores de  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  son muy bajos y parecidos. Esto significa que no es posible establecer la contribución relativa de la deriva génica y la selección natural al producir la diferenciación fenotípica (Leinonen et al. 2008). El valor negativo de  $P_{ST}$  significa que

hay una variación morfométrica muy alta dentro de ambas poblaciones que supera ampliamente a la variación entre ellas. Esto concuerda con el bajo valor de  $F_{ST}$ , el cual indica que hay una baja diferenciación genética entre estas poblaciones. Ambos resultados son consistentes con un efecto homogeneizador producido por flujo génico, el cual puede contrarrestar la producción de adaptaciones locales producidas por selección natural (Slatkin 1987).

El enfoque comparativo  $P_{ST}$ - $F_{ST}$  utilizado en este estudio permite sugerir que los procesos evolutivos que producen divergencia entre poblaciones, deriva génica y selección natural, han contribuido en forma distinta al producir la diferenciación morfométrica de los adultos a lo largo de la distribución de *R. atacamensis*. Esta aproximación permitió profundizar y complementar las inferencias obtenidas al comparar directamente los patrones de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) y morfométrica revelada por los análisis multivariados tradicionales. Se ha enfatizado que es inadecuado (por definición) obtener una medida de diferenciación genética en rasgos cuantitativos a partir de la diferenciación fenotípica observada entre las poblaciones, por lo que este tipo de aproximación es válida solo al comparar  $Q_{ST}$  con  $F_{ST}$  (Pujol et al. 2008, Whitlock 2008). Ya que el  $Q_{ST}$  debe ser calculado a partir de cuidadosos experimentos de genética cuantitativa (Whitlock 2008), hay una amplia variedad de sistemas y tipos de caracteres donde no es posible aplicar esta aproximación. El estudio de la variación en caracteres morfológicos de adultos, en especies de anfibios con crecimiento lento como *R. atacamensis*, es uno de esos casos donde una aproximación experimental es impráctica por lo que hay que recurrir a métodos indirectos como  $P_{ST}$  vs.  $F_{ST}$ .

Se ha discutido extensamente acerca de los mecanismos intrínsecos y/o extrínsecos que podrían producir patrones consistentes de variación en el tamaño corporal en función de la latitud en organismos ectotérmicos, lo que podría asociarse a la regla de Bergmann (e.g. Ashton y Feldman 2003, Adams y Church 2008), pero en los pocos casos en que se han evaluado explícitamente han emergido complejos patrones causales (Cvetković et al. 2009). En este contexto, el presente estudio puede considerarse como un punto de partida para identificar los mecanismos y procesos evolutivos, tanto históricos como ecológicos, que han producido el patrón latitudinal y el alto grado de variación morfológica observado entre las poblaciones de *R. atacamensis*.

### 3.6. Referencias

- Adams, D. C. y J. O. Church. 2008. Amphibians do not follow Bergmann's rule. *Evolution* 62(2): 413-420.
- Ashton, K. G. y C. R. Feldman. 2003. Bergmann's rule in nonavian reptiles: turtles follow it, lizards and snakes reverse it. *Evolution* 57: 1151-1163.
- Belk, M. C. y D. D. Houston. 2002. Bergmann's rule in ectotherms: a test using freshwater fishes. *American Naturalist* 160: 803-808.
- Cei, J. M. 1961. *Bufo arunco* (Molina) y las formas chilenas de *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 8: 59-81.
- Cei, J. M. 1962. Batracios de Chile. Ediciones Universidad de Chile, Santiago, Chile. 128 + cviii pp.
- Correa, C., M. Sallaberry, P. Jara-Arancio, G. Lobos, E. R. Soto y M. A. Méndez. 2008. Amphibia, Anura, Bufonidae, *Rhinella atacamensis*: Altitudinal distribution extension, new records and geographic distribution map. *Check List* 4(4): 478-484.
- Cvetković, D., N. Tomašević, G. F. Ficetola, J. Crnobrnja-Isailović y C. Miaud. 2009. Bergmann's rule in amphibians: combining demographic and ecological parameters to explain body size variation among populations in the common toad *Bufo bufo*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47(2): 171-180.

Endler, J. A. 1977. Geographic Variation, Speciation, and Clines. Princeton University Press, Princeton, NJ. 246 pp.

Futuyma, D. 2005. Evolution. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 543 pp.

Gomez-Mestre, I. y M. Tejedo. 2004. Contrasting patterns of quantitative and neutral genetic variation in locally adapted populations of the natterjack toad, *Bufo calamita*. *Evolution* 58(10): 2343-2352.

Gould, S. J. y R. F. Johnston. 1972. Geographic variation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 3: 457-498.

Jetz, W., K. G. Ashton y F. A. La Sorte. 2009. Phenotypic population divergence in terrestrial vertebrates at macro scales. *Ecology Letters* 12: 1137-1146.

Jowett, T. 1986. Preparation of nucleic acids. En: *Drosophila: a Practical Approach*, pp. 275-286. Roberts, D. B., Ed., Oxford, IRL Press.

Leinonen, T., J. M. Cano, H. Makinen y J. Merilä. 2006. Contrasting patterns of body shape and neutral genetic divergence in marine and lake populations of threespine sticklebacks. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1803-1812.

Leinonen, T., R. B. O'Hara, J. M. Cano y J. Merilä. 2008. Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1-17.

Lomolino, M. V., B. R. Riddle y J. H. Brown. 2006. Biogeography. Third Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 845 pp.

Long, A. D. y R. S. Singh. 1995. Molecules versus morphology: the detection of selection acting on morphological characters along a cline in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 74: 569-581.

Luebert, F. y P. Pliscoff. 2006. Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 316 pp.

Lynch, M. 1990. The rate of morphological evolution in mammals from the standpoint of the neutral expectation. *American Naturalist* 136: 727-741.

Lynch, M., M. Pfrender, K. Spitze, N. Lehman, J. Hicks, D. Allen, L. Latta, M. Ottene, F. Bogue y J. Colbourne. 1999. The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution* 53: 100-110.

- Mallet, J. 2008. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 2971-2986.
- Manier, M. K., C. M. Seyler y S. J. Arnold. 2007. Adaptive divergence within and between ecotypes of the terrestrial garter snake, *Thamnophis elegans*, assessed with  $F_{ST}$ - $Q_{ST}$  comparisons. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1705-1719.
- McKay, J. K. y R. G. Latta. 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 285-291.
- Meiri, S. y T. Dayan. 2003. On the validity of Bergmann's rule. *Journal of Biogeography* 30: 331-351.
- Merilä, J. 1997. Quantitative trait and allozyme divergence in the greenfinch (*Carduelis chloris*, Aves: Fringillidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 243-266.
- Merilä, J. y P. Crnokrak. 2001. Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 892-903.
- Meyer, C.-L., A. A. Kostecka, P. Saumitou-Laprade, A. Créach, V. Castric, M. Pauwels y H. Frérot. 2010. Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist* 185: 130-142.
- Mullen, L. M., S. N. Vignieri, J. A. Gore y H. E. Hoekstra. 2009. Adaptive basis of geographic variation: genetic, phenotypic and environmental differences among beach mouse populations. *Proceedings of the Royal Society B* 276: 3809-3818.
- Olalla-Tárraga, M. A y M. A. Rodríguez. 2007. Energy and interspecific body size patterns of amphibian faunas in Europe and North America: anurans follow Bergmann's rule, urodeles its converse. *Global Ecology and Biogeography* 16: 606-617.
- Østbye, K., T. F. Næsje, L. Bernatchez, O. T. Sandlund y K. Hindar. 2005. Morphological divergence and origin of sympatric populations of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) in Lake Femund, Norway. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 683-702.
- Petit, C., H. Freville, A. Mignot, B. Colas, M. Riba, E. Imbert, S. Hurtrezboussets, M. Virevaire y I. Olivieri. 2001. Gene flow and local adaptation in two endemic plant species. *Biological Conservation* 100: 21-34.
- Plissock, P. y F. Luebert. 2008. Ecosistemas terrestres. En: Biodiversidad de Chile: Patrimonio y Desafíos. Segunda Edición. Varios editores. CONAMA.

- Pujol, B., A. J. Wilson, R. I. C. Ross y J. R. Pannell. 2008. Are  $Q_{ST}$ - $F_{ST}$  comparisons for natural populations meaningful? *Molecular Ecology* 17: 4782-4785.
- Ramírez-Valiente, J. A., Z. Lorenzo, A. Soto, F. Valladares, L. Gil y I. Aranda. 2009. Elucidating the role of genetic drift and natural selection in cork oak differentiation regarding drought tolerance. *Molecular Ecology* 18(18): 3803-3815.
- Ridley, M. 2003. *Evolution*. 3rd Edition. Blackwell Publishing, Malden, USA. 751 pp.
- Sæther, S. A., P. Fiske, J. A. Kålås, A. Kuresoo, L. Luigujõe, S. B. Piirtney, T. Sahlman y J. Höglund. 2007. Inferring local adaptation from  $Q_{ST}$ - $F_{ST}$  comparisons: neutral genetic and quantitative trait variation in European populations of great snipe. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1563-1576.
- Santibáñez F, P. Roa y P. Santibáñez. 2008. El medio físico. En: *Biodiversidad de Chile: Patrimonio y Desafíos*. Segunda Edición. Varios editores. CONAMA.
- Schluter, D. 2000. *The ecology of adaptive radiation*. Oxford University Press, Oxford, U.K. 288 pp.
- Schneider, C. J., T. B. Smith, B. Larison y C. Moritz. 1999. A test of alternative models of diversification in tropical rainforests: ecological gradients vs. rainforest refugia. *Proceedings of the National Academy of Science* 96: 13869-13873.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236(4803): 787-792.
- Spitze, K. 1993. Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* 135: 367-374.
- StatSoft, Inc. 2007. *STATISTICA* (data analysis software system), version 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Steinger, T., P. Haldimann, K. A. Leiss y H. Müller-Schärer. 2002. Does natural selection promote population divergence? A comparative analysis of population structure using amplified fragment length polymorphism markers and quantitative traits. *Molecular Ecology* 11: 2583-2590.
- Storz, J. F. 2002. Contrasting patterns of divergence in quantitative traits and neutral DNA markers: analysis of clinal variation. *Molecular Ecology* 11: 2537-2551.
- Thorpe, R. S. 1987. Geographic variation: a synthesis of cause, data, pattern and congruence in relation a subspecies, multivariate analysis and phylogenesis. *Bolletino di Zoologia* 54(1): 3-11.

- Thorpe, R. S. 2002. Geographic variation. En: *Encyclopedia of Evolution*, pp. 430-435. Pagel, M., Ed., Oxford University Press.
- Thorpe, R. S., H. Black y A. Malhotra. 1996. Matrix correspondence tests on the DNA phylogeny of the Tenerife lacertid elucidate both historical causes and morphological adaptation. *Systematic Biology* 45: 335-343.
- Vekemans, X. 2002. AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Veloso, A. 2006. Batracios de las cuencas hidrográficas de Chile: origen, diversidad y estado de conservación. En: *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*, pp. 103-140. Vila, I., A. Veloso, R. Schlatter y C. Ramírez, Eds., Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Veloso, A. y J. Navarro. 1988. Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. *Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino* 6: 481-539.
- Watt, C., S. Mitchell y V. Salewski. 2010. Bergmann's rule; a concept cluster? *Oikos* 119: 89-100.
- Whitlock, M. C. 2008. Evolutionary inference from  $Q_{ST}$ . *Molecular Ecology* 17: 1885-1896.

**CAPÍTULO 4:**  
**EFFECTOS DE LA ARIDEZ EN LA ESTRUCTURA FILOGEOGRÁFICA DE**  
***RHINELLA ATACAMENSIS* (ANURA, BUFONIDAE), UN ANFIBIO**  
**ENDÉMICO DE CHILE**  
**(MANUSCRITO EN PREPARACIÓN)**

**4.1. Resumen**

Los anfibios presentan características ecofisiológicas y conductuales, relacionadas principalmente con el balance de agua y su dependencia de este elemento para su reproducción, que limitan su presencia en ambientes áridos. Estas características implican dinámicas poblacionales que a la larga producen fuertes estructuras poblacionales en aquellas especies que han logrado colonizar ese tipo de ambientes.

*Rhinella atacamensis* es un anuro endémico de Chile que habita entre los 25 y 32°S, zona que presenta una transición gradual de sur a norte entre un clima mediterráneo y uno desértico. En el extremo norte de su distribución hay poblaciones actualmente aisladas en pequeñas quebradas del desierto de Atacama, mientras que en el sur la especie habita sistemas hídricos más extensos que permitirían la existencia de poblaciones mayores. Este gradiente climático se ha mantenido desde fines del Cenozoico debido a la formación del desierto de Atacama, pero se han descrito importantes fluctuaciones norte-sur en la posición de las formaciones vegetales en esta zona debido a cambios climáticos pleistocénicos y holocénicos, los cuales podrían haber modificado los rangos de distribución de otros organismos terrestres.

Para evaluar hasta que punto la estructura filogeográfica de *R. atacamensis* puede ser asociada a este escenario histórico y climático, se examinaron los patrones espaciales

y niveles de variación genética de poblaciones representativas de todo el rango de distribución de esta especie utilizando secuencias mitocondriales y marcadores nucleares AFLP. Los marcadores mitocondriales y nucleares muestran patrones de variación concordantes, revelando una escasa estructura filogeográfica en la mayor parte del rango de distribución. Sólo en la zona norte, desde los 29°S aproximadamente, se aprecia un aumento de la diferenciación genética entre poblaciones y, paralelamente, una disminución de la variación intrapoblacional, patrón que es consistente con la mayor aridez que presenta esta región. Aquí se encuentran la población más divergente, Paposo, que define actualmente el extremo norte de la distribución, y las poblaciones menos diversas, Las Breas, Mostazal y Carrera Pinto, ubicadas en quebradas aisladas del desierto de Atacama. Por otro lado, la mayor parte de la variación dentro de la especie se concentra entre los 29°30' y 32°S, donde se ubican las tres principales cuencas hidrográficas que conforman el extremo sur de la distribución.

La falta de estructuración en la mayor parte del rango podría explicarse parcialmente por los cambios climáticos pleistocénicos y holocénicos, que habrían permitido la conexión de las poblaciones entre cuencas hidrográficas. La amplia distribución de ciertos haplotipos, presentes en varias cuencas hidrográficas contiguas, es consistente con esta explicación. Sin embargo, la presencia de haplotipos altamente divergentes y únicos en la mayoría de las localidades, cuya divergencia está al nivel de la divergencia máxima observada dentro de la especie, sugiere que la retención de polimorfismos ancestrales ha jugado un rol importante en la variación mitocondrial de esta especie.

**Palabras clave:** mtDNA, AFLPs, desierto de Atacama, retención de polimorfismos ancestrales.

## 4.2. Introducción

Los estudios filogeográficos han permitido investigar aspectos históricos de la biogeografía y la estructura poblacional de una amplia variedad de organismos (Avice 2000, 2004). En particular, los anfibios presentan varias características que los convierten en sujetos ideales para este tipo de estudios: una distribución global, alto grado de estructura genética y una facilidad para obtener muestras (Zeisset y Beebee 2008). El agua es un recurso esencial para los anfibios debido a la alta permeabilidad de su piel y la necesidad de este elemento para su reproducción (Hillman et al. 2008). Estas limitaciones ecofisiológicas restringen la capacidad de dispersión y el rango de hábitats que estos organismos pueden ocupar por lo que en general éstos exhiben baja movilidad individual, a menudo acompañada por una alta filopatría a los sitios natales (Beebee 1996). Consecuentemente las poblaciones de anfibios tienden a ser altamente estructuradas genéticamente sobre distancias geográficas cortas y a una escala mayor, muchas de estas especies presentan fuertes estructuras filogeográficas (e.g. Crottini et al. 2007, Edwards et al. 2007, Koscinski et al. 2008, Fitzpatrick et al. 2009, Gonçalves et al. 2009, revisado en Vences y Wake 2007; pero véase Burns et al. 2007, Makowsky et al. 2009).

A pesar de las restricciones ecofisiológicas y conductuales mencionadas, los anfibios tienen una distribución prácticamente cosmopolita y han sido capaces de colonizar todo tipo de ambientes, con excepción de los desiertos más áridos, las zonas polares y la mayoría de las islas oceánicas (Duellman y Trueb 1994). Sin embargo, los patrones de distribución geográfica a nivel local son fuertemente influenciados por la disponibilidad de agua y la temperatura ambiental (Buckley y Jetz 2007). Estos factores

limitan la dispersión y persistencia de este tipo de organismos en ambientes áridos por lo que la mayoría de las especies que han sido capaces de colonizarlos presentan adaptaciones particulares a la escasez temporal y espacial de agua (e.g. Cartledge et al. 2006, Carvalho et al. 2010). Estas limitaciones tienen consecuencias en la estructura y variación genética de sus poblaciones, por lo que muchas especies desérticas presentan acentuadas estructuras filogeográficas a distintas escalas espaciales (e.g. Jaeger et al. 2005, Edwards 2007, Wang 2009).

Desde un punto de vista biogeográfico, Chile se caracteriza por el alto nivel de endemismo en su flora y fauna debido al aislamiento producido por la cordillera de Los Andes a lo largo del borde este y las condiciones climáticas extremas al norte y sur (Armesto et al. 1995). Una de estas barreras climáticas, el desierto de Atacama, se ubica en el extremo norte del país, aproximadamente desde los 27°S, y puede considerarse como la culminación de un gradiente de precipitaciones que disminuye de sur a norte (Luebert y Plissock 2006). Los patrones de distribución de los anfibios reflejan este escenario climático, de manera que la mayoría de las especies se concentra en la zona centro-sur (38-48°S), disminuyendo progresivamente hacia el norte y el sur (Vidal 2008). A nivel poblacional se observa un patrón similar. Las dos especies que habitan al norte de los 30°S, *Pleurodema thaul* y *Rhinella atacamensis*, están representadas por un escaso número de poblaciones (Correa et al. 2008, Capítulo 2; Correa et al. 2010) y solo *R. atacamensis* ha logrado persistir en la zona desértica entre los 25 y 27°S. Esta última especie, endémica de Chile, se distribuye en la costa y el interior del país entre los 25 y 32°S (Correa et al. 2008, Capítulo 2). Dentro de este rango, ha sido descrita en casi todas las cuencas hidrográficas, tanto en las grandes cuencas de origen andino (cuyos ríos

principales son indicados en la Figura 1) como en las cuencas de la costa, de menor extensión (Correa et al. 2008, Capítulo 2). Al norte de los 29°30'S, la mayoría de las localidades conocidas, con excepción de las ubicadas en los ríos Huasco y Copiapó y sus afluentes, corresponden a pequeñas quebradas actualmente aisladas con aguas permanentes o semipermanentes.

Cei (1962) consideró que *R. atacamensis* estaba constituida solo por unas pocas poblaciones aisladas en la zona subdesértica entre los 25 y 30°S, y desde ahí hacia el sur era reemplazada por *R. arunco*. Sin embargo, desde 2002 varios reportes documentaron nuevas localidades para *R. atacamensis* que extendieron su distribución hasta los 32°S (revisado en Correa et al. 2008, Capítulo 2), implicando que ese sería el límite norte de *R. arunco*. Actualmente, se sabe que la situación es más compleja: estas dos especies son simpátricas e hibridizan en una estrecha zona ubicada entre los 32 y 33°S (Capítulo 5; Correa et al., datos no publicados). Cei (1961) describió un alto nivel de divergencia morfológica entre dos poblaciones de *R. atacamensis* (Paposo y Vallenar) sugiriendo, además, que la uniformidad intrapoblacional en los patrones de coloración estaría en concordancia con la “tendencia genotípica a la homocigosis” de esas poblaciones (Cei 1962). Posteriormente, Cei (1972) planteó la hipótesis de que *R. atacamensis* se había originado de poblaciones periféricas de *R. arunco* que penetraron en el desierto de Atacama. Esta hipótesis debe ser reformulada a la luz del conocimiento actual de la biogeografía de estas especies: las poblaciones de *R. atacamensis* actualmente aisladas en la zona desértica y subdesértica de Chile (al norte de los 30°S), se habrían originado y diferenciado a partir de poblaciones más meridionales de la misma especie.

Las observaciones e hipótesis de Cei (1961, 1962) son consistentes con un proceso prolongado de diferenciación genética y morfológica producido por las condiciones de aridez de esta zona de Chile. El establecimiento del desierto de Atacama en el Plioceno (Hinojosa y Villagrán 1997; compárese con Clarke 2006) indica que un gradiente climático similar al actual podría haber existido desde esa época. La aridez se acrecentó por una serie de eventos masivos ocurridos durante el Plioceno y Pleistoceno, principalmente el levantamiento final de Los Andes, la formación del campo de hielo Antártico oeste y la vigorización de la corriente fría de Humboldt y del anticiclón subtropical del Pacífico Sur (Hinojosa y Villagrán 1997). Sin embargo, las extensiones de las formaciones vegetales asociadas al gradiente climático no han permanecido estáticas y han sido modificadas continuamente como resultado de los ciclos glaciales del Pleistoceno y las oscilaciones climáticas del Holoceno (Villagrán 1995, 2001, Villagrán y Armesto 2005). Estos cambios se han traducido principalmente en desplazamientos de las formaciones vegetales en sentido norte-sur, lo cual habría provocado cambios en la distribución de otros organismos terrestres.

En este estudio se analiza la variación genética de las poblaciones de *R. atacamensis* en todo su rango de distribución utilizando secuencias mitocondriales y marcadores nucleares AFLP, con el objetivo de evaluar los efectos del escenario histórico y climático antes descrito sobre su estructura filogeográfica. Específicamente, se evaluó si el gradiente de aridez, que presumiblemente se ha mantenido en el área al menos desde finales del Plioceno, ha tenido efectos en la diferenciación genética de sus poblaciones. Si este gradiente se ha mantenido por un tiempo suficiente, se espera que hacia el norte la estructura aumente, o sea que la divergencia entre las poblaciones sea

mayor, mientras que la variación intrapoblacional disminuya, siendo estos efectos más notorios en las secuencias mitocondriales. Por otra parte, si ha habido cambios significativos en el rango de distribución y conexiones entre poblaciones, posibilitados por los cambios climáticos pleistocénicos y holocénicos, se espera que la estructura filogeográfica a una escala amplia sea débil y que no esté asociada a las cuencas hidrográficas.

### **4.3. Materiales y métodos**

#### *Sitios y material de estudio*

Se incluyeron 210 ejemplares de 23 localidades que representan toda la distribución de *Rhinella atacamensis*, la cual ha sido establecida entre las localidades de Paposo y Mauro (25-32°S; Correa et al. 2008, Capítulo 2; Figura 4.1; Tabla 4.1). Los ejemplares de Paposo, Hacienda Atacama, Río Pulido, Relincho, Cochiguaz Alto y Caimanes fueron recolectados en más de un sitio, pero en todos los casos los sitios se ubican a menos de 10km y a lo largo del mismo sistema hídrico. Estos ejemplares fueron reunidos para simplificar el esquema de muestreo y aumentar el número de muestras por localidad. La mayoría de los ejemplares utilizados fueron adultos, pero también se incluyeron larvas, postmetamórficos y juveniles, todos los cuales se depositaron en la colección herpetológica del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Chile (DBGUCH). Los permisos para la captura y recolección de los animales fueron proporcionados por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) (resoluciones 3085/2000, 2105/2004 y 13/2006). El muestreo fue definido para incluir las principales cuencas hidrográficas que conforman la distribución de *R. atacamensis* (Figura 4.1). En

el límite sur de distribución de esta especie se descubrió recientemente una zona de hibridación con su especie hermana *R. arunco* en la cuenca del estero Pupío (32°S; Capítulo 5). Sin embargo, se incluyó la localidad de Caimanes, ubicada en dicha cuenca, porque es la más sureña donde se han observado exclusivamente ejemplares con fenotipo y haplotipo mitocondrial de *R. atacamensis*.

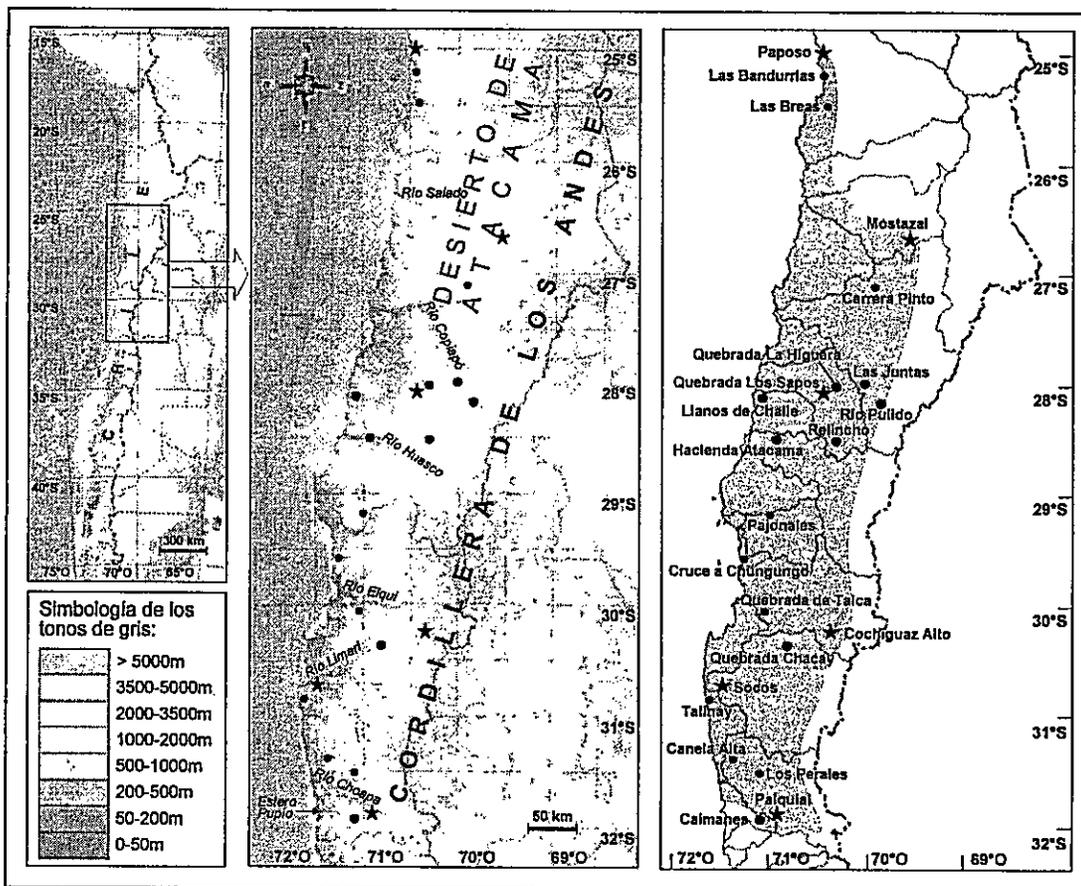


Figura 4.1.- Ubicación geográfica de las 23 localidades de *Rhinella atacamensis* incluidas en este estudio. En el mapa del medio se señala la ubicación de las localidades y los principales rasgos geográficos y ríos dentro de la distribución de esta especie (25-32°S). El mapa del extremo derecho muestra los nombres de las localidades y los límites de las cuencas hidrográficas donde éstas se ubican. El área sombreada de ese mapa representa la distribución de *R. atacamensis*. Hay que tener en cuenta que al norte de los 30°S aproximadamente, la distribución conocida de esta especie está formada principalmente por poblaciones aisladas. Las seis localidades foco, de las cuales se obtuvieron marcadores mitocondriales y nucleares, se indican con una estrella.

Los datos de secuencias mitocondriales fueron obtenidos de las 23 localidades mientras que los marcadores AFLP fueron obtenidos sólo de seis, para las cuales el número de muestras por localidad fue mayor para ambos tipos de marcadores (ver localidades en la Figura 4.1 y número de muestras en la Tabla 4.1). Estas localidades, de ahora en adelante localidades foco, fueron escogidas para tratar de representar la mayor parte de la variación genética de la especie: tres de ellas se ubican más o menos equidistantemente en la zona más árida de la distribución (al norte de los 30°S) y las otras tres se ubican en cada una de las tres principales cuencas que conforman su límite sur (Figura 4.1), donde se observó la mayor variación mitocondrial.

#### *Obtención de DNA y secuencias mitocondriales*

El DNA para obtener las secuencias mitocondriales se extrajo principalmente de músculo: del muslo en el caso de adultos, de la lengua en el caso de juveniles y postmetamórficos, y de la cola en el caso de las larvas. Excepcionalmente se utilizó hígado, dedo o membrana interdigital. Para la extracción se utilizó un método de sales modificado de Jowett (1986). El fragmento de DNA mitocondrial secuenciado comprende el extremo 3' del gen citocromo *b* y aproximadamente 850 bases del extremo contiguo de la región control (no codificante). Los partidores utilizados para amplificar este fragmento fueron CytbA-L (5'-GAATYGGRRGGWCAACCAGTAGAAGACCC-3') y ControlP-H (5'-GTCCATAGATTCASTTCCGTCAG-3') diseñados por Goebel et al. (1999). Las concentraciones o cantidades de reactivos para la PCR fueron las siguientes (30µL de volumen total): 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16mM de cada dNTP, 0,26µM de cada partidor, 1,5U de polimerasa Taq (Invitrogen) y 10-200ng de DNA total. El perfil

térmico para la reacción fue el siguiente: 94°C por 2min, seguido por 36 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 45s y 72°C por 90s, y una extensión final a 72°C por 10min. Los productos de la PCR fueron secuenciados en ambos sentidos mediante secuenciación automática utilizando un equipo ABI3730XL.

Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (msnm)	Secuencias	AFLPs
Paposo	25° 01' 33,2"	70° 27' 10,3"	332	20	19
Las Bandurrias	25° 12' 56,1"	70° 26' 03,5"	58	1	
Las Breas	25° 30' 00,3"	70° 24' 01,7"	611	8	
Mostazal	26° 40' 53,9"	69° 34' 14,8"	2574	20	19
Carrera Pinto	27° 06' 40,2"	69° 53' 44,3"	1565	10	
Las Juntas	28° 00' 16,0"	69° 58' 37,0"	1161	2	
Quebrada La Higuera	28° 01' 21,3"	70° 16' 29,5"	1100	7	
Quebrada Los Sapos	28° 04' 48,4"	70° 24' 35,2"	1002	20	16
Llanos de Challe	28° 06' 57,9"	71° 05' 09,9"	123	4	
Río Pulido	28° 10' 56,2"	69° 48' 38,0"	2013	2	
Relincho	28° 32' 16,5"	70° 16' 03,3"	1546	7	
Hacienda Atacama	28° 30' 32,4"	70° 59' 47,3"	186	2	
Pajonales	29° 08' 42,9"	70° 59' 45,2"	1010	8	
Cruce a Chungungo	29° 35' 12,5"	71° 15' 10,4"	161	10	
Quebrada de Talca	30° 03' 49,2"	71° 04' 21,7"	515	2	
Cochiguaz Alto	30° 15' 38,5"	70° 19' 33,8"	2277	12	11
Quebrada Chacay	30° 22' 52,5"	70° 49' 02,8"	821	5	
Socos	30° 43' 52,4"	71° 29' 27,8"	96	20	12
Talinay	30° 48' 39,5"	71° 36' 46,4"	250	1	
Canela Alta	31° 23' 08,2"	71° 25' 11,7"	307	6	
Los Perales	31° 28' 46,3"	71° 07' 24,6"	653	6	
Palquial	31° 53' 17,0"	70° 56' 42,5"	596	18	18
Caimanes	31° 55' 50,6"	71° 08' 39,8"	422	19	

Tabla 4.1.- Coordenadas y alturas de las localidades de *Rhinella atacamensis* incluidas en este estudio, ordenadas de norte a sur (ver mapa de la Figura 4.1). Se indica además el número de ejemplares utilizados para obtener secuencias mitocondriales y marcadores AFLP.

### *Obtención de marcadores AFLP*

Se utilizaron las mismas muestras de DNA con que se obtuvieron las secuencias, pero previamente fueron purificadas. La purificación se realizó agregando al DNA 0,1 volumen de NaAc 3M, pH 5,2 y luego 2,5 volúmenes de etanol absoluto con respecto al volumen anterior. Esta mezcla se dejó por toda la noche a -20°C, luego se centrifugó y finalmente se suspendió en un volumen variable de agua dependiendo del tamaño del "pellet" observado.

Para la etapa de digestión y ligación se prepararon diluciones de 50ng/μL. El DNA fue digerido con dos enzimas de restricción en una mezcla de 25μL que contenía 0,2mg/μL de BSA, 5U de endonucleasa MseI (New England Biolabs), 5U de endonucleasa EcoRI (New England Biolabs) y 250ng de DNA durante 3h a 37°C, seguidos por 15 minutos a 70°C para desactivar las enzimas. Inmediatamente, se continuó con la etapa de ligación para lo cual se agregó a la reacción de digestión una mezcla de 10μL compuesta por adaptador MseI 0,5μM (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'/3'-TACTCAGGACTCAT-5'), adaptador EcoRI 0,05μM (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5') y 132U de ligasa de DNA T4 (New England Biolabs). Esta reacción se mantuvo a 16°C por toda la noche.

Las concentraciones o cantidades de reactivos para la PCR preselectiva fueron las siguientes (25μL de volumen total): 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,36mM de cada dNTP, 0,24μM de cada partidor preselectivo (EcoRI-A: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' y MseI-C: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'), 1U de polimerasa Taq (Invitrogen) y 5μL de DNA digerido-ligado, diluido 10 veces. El perfil térmico para esta reacción fue el siguiente: 94°C por 2min, seguido por 28 ciclos de 94°C por 45s, 56°C por 45s y 72°C

por 2min, y una extensión final de 72°C por 5min. Para escoger los partidores para las PCR selectivas, previamente se realizó un “screening” con unas pocas muestras seleccionadas de las seis localidades foco en que se probaron 16 combinaciones de estos partidores (todas las combinaciones entre los cuatro partidores EcoRI-ACX y los cuatro MseI-CAX, donde X representa una A, C, G o T).

La PCR selectiva se realizó con la siguiente combinación de reactivos, donde el partidor EcoRI-ACX fue marcado en su extremo 5' con uno de cuatro fluoróforos (6FAM, VIC, NED o PET): 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,45mM de cada dNTP, 0,25µM de partidor MseI-CAX, 0,15µM de partidor EcoRI-ACX marcado, 0,9U de polimerasa Taq (Invitrogen) y 5µL de producto de la PCR preselectiva, diluido 25 veces. El perfil térmico de esta reacción fue: 94°C por 2min, seguido por 12 ciclos de 94°C por 45s, 65 hasta 57°C por 45s (disminuyendo en un grado cada ciclo) y 72°C por 2min, seguidos por 23 ciclos de 94°C por 45s, 56°C por 45s y 72°C por 2min, y finalmente una etapa de extensión a 72°C por 5min. Para optimizar los costos de genotipificación se escogieron ocho combinaciones de partidores, dos por cada uno de los fluoróforos: MseI-CAC/6FAM-EcoRI-ACT, MseI-CAT/6FAM-EcoRI-ACT, MseI-CAA/VIC-EcoRI-ACC, MseI-CAG/VIC-EcoRI-ACC, MseI-CAG/NED-EcoRI-ACG, MseI-CAT/NED-EcoRI-ACG, MseI-CAC/PET-EcoRI-ACA y MseI-CAT/PET-EcoRI-ACA. La genotipificación se realizó mezclando cuatro de los productos fluorescentes de las PCRs selectivas (en una proporción 1:1:1:2, 6FAM:VIC:NED:PET), mezcla que fue separada por electroforesis capilar en un equipo ABI3730XL con un filtro G5.

### *Análisis genéticos y filogeográficos de las secuencias*

Las secuencias mitocondriales fueron editadas con BioEdit v7.0.7 (Hall 1999). Inicialmente, se realizó un alineamiento con ClustalX v2.0.12 (Larkin et al. 2007) con las primeras secuencias obtenidas, al cual se agregó el resto de las secuencias manualmente. Los haplotipos fueron generados con el programa DnaSP v5.10.01 (Librado y Rozas 2009), incluyendo aquellos producidos por los “indels”. Se obtuvieron las siguientes medidas de diversidad genética para las localidades con 5 o más ejemplares con el programa Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer 2010): número de haplotipos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica. Todas estas medidas se calcularon incluyendo los sitios con “indels”.

Un análisis filogenético preliminar con el método de máxima parsimonia incluyendo algunas de las secuencias más divergentes de las localidades foco no mostró resolución, por lo que se decidió descartar este tipo de aproximación para este estudio (datos no mostrados). Por lo tanto, para visualizar las relaciones filogenéticas entre los haplotipos se construyó una red con el método de “median-joining” utilizando el programa Network v4.5.1.6 (Bandelt et al., 1999). La estructura filogeográfica fue explorada con los programas SAMOVA v1.0 (Dupanloup et al. 2002), que define grupos de localidades geográficamente contiguas que maximizan la varianza genética entre ellos, y Barrier v2.2 (Manni et al. 2004), que permite identificar barreras genéticas dentro de la distribución de una especie (las distancias,  $F_{ST}$ , para este último análisis fueron obtenidas con Arlequin).

Adicionalmente, sin tener en cuenta los resultados de los dos análisis previos, se definieron grupos de localidades contiguas con haplotipos exclusivos, sin considerar sus

relaciones filogenéticas. Esto se realizó uniendo progresivamente de norte a sur las localidades que comparten haplotipos hasta formar los grupos más amplios que poseen haplotipos exclusivos. Esta configuración se consideró como la que mejor representa la segregación espacial de los haplotipos en todo el rango de esta especie. Se realizaron AMOVAs con esta configuración y con la obtenida con el programa Barrier, los cuales fueron comparados con otro en que los grupos de poblaciones fueron formados por las localidades ubicadas en cada una de las cuencas hidrográficas. Las localidades y grupos de localidades considerados para este último análisis fueron (entre paréntesis número de muestras por cuenca): Paposo-Las Bandurrias-Las Breas (29), Mostazal (20), Carrera Pinto-Las Juntas-Río Pulido (14), Quebrada La Higuera-Quebrada Los Sapos-Relincho (34), Llanos de Challe (4), Hacienda Atacama (2), Pajonales (8), Cruce a Chungungo (10), Quebrada de Talca-Cochiguaz Alto (14), Quebrada Chacay-Socos (25), Talinay (1), Canela Alta-Los Perales-Palquiial (30) y Caimanes (19) (ver los límites de las cuencas en la Figura 4.1).

Además, se exploró la relación entre la diferenciación genética y las distancias geográficas por medio de una prueba de Mantel con el programa GeneAIEx v6.3 (Peakall y Smouse 2006), para evaluar si la diferenciación genética a escala general corresponde a un patrón de aislamiento por distancia. Los cálculos de  $F_{ST}$  para este análisis, así como los AMOVAs, fueron realizados con Arlequin.

#### *Análisis genéticos y filogeográficos de los AFLPs*

Los electroferogramas de los AFLPs fueron visualizados y procesados con el programa GeneMarker v1.85 (SoftGenetics) manteniendo la mayor parte de las opciones

por defecto y aplicando un proceso de normalización. Las bandas fueron codificadas con ayuda de un panel construido con algunas muestras representativas de las localidades foco, el cual permite definir las ubicaciones en pares de bases donde se encuentran las bandas ("bins") y, al ser aplicado, reconocerlas automáticamente. Debido a que la aplicación del panel y las opciones por defecto del programa no permitieron reconocer algunas bandas intensas y claramente definidas como tales, se revisaron todos los perfiles de fluorescencia y se codificaron manualmente las bandas omitidas. En este último proceso solo se reconocieron como bandas las señales con una intensidad sobre 200 unidades de fluorescencia, siempre y cuando este valor fuera superior a la oscilación de fondo (ruido). Para minimizar la subjetividad de este procedimiento la codificación se restringió a aquellas bandas que presentaran una señal intensa y que fueran claramente distinguibles de señales próximas y del ruido. Además, este análisis se restringió a las bandas de bajo tamaño, en general entre 70 y 300 pares de bases dependiendo de la combinación de partidores. Con esto se obtuvo una matriz de presencia (1) y ausencia (0) de bandas para cada uno de los "bins" definidos con cada fluoróforo. Cada "bin" es un marcador AFLP que se considera, para los análisis genéticos, como un locus que segrega independientemente.

Se obtuvieron medidas de diversidad intrapoblacional, porcentaje de loci polimórficos y heterocigocidad, con el programa GeneA1Ex. Se calcularon además los índices de fijación ( $F_{ST}$ ) entre todas las localidades con el programa AFLP-SURV (Vekemans 2002). Las medidas de diversidad intrapoblacional e interpoblacional fueron comparadas gráficamente con las respectivas medidas obtenidas con las secuencias para las seis localidades foco.

Para examinar la estructura poblacional en esta especie se estimó el número de poblaciones que mejor representan la variación genética poblacional de las seis localidades foco con el programa Structure v2.3.3 (Falush et al. 2007). Se aplicó el modelo de mezcla (“admixture”) con frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones. También se realizó un análisis independiente considerando la información de las localidades, el cual permite detectar estructura cuando su señal es débil. En ambos análisis se determinó el número óptimo de poblaciones (K) considerando el valor máximo del Ln de la probabilidad de los datos dado K, obtenido al variar K entre 2 y 6. El valor de Ln de la probabilidad de los datos dado K fue obtenido promediando los resultados de cinco corridas independientes para cada valor de K. Todas las corridas tuvieron una longitud de 500000 iteraciones con un “burnin” inicial de 75000.

Debido a que los resultados obtenidos con Structure pueden ser afectados por los efectos de aislamiento por distancia (ver documentación del programa), se evaluó la relación entre la diferenciación genética entre localidades y las distancias geográficas por medio de una prueba de Mantel con el programa GeneA1Ex. Finalmente, para visualizar la diferenciación genética entre las localidades, se realizó un UPGMA a nivel individual con la distancia de Dice utilizando el programa FreeTree v0.9.1.50 (Pavliček et al. 1999). El soporte estadístico de los nodos del dendrograma generado con FreeTree fue calculado con 1000 seudoréplicas de “bootstrap”.

#### 4.4. Resultados

##### *Análisis de las secuencias mitocondriales*

El alineamiento tuvo una longitud de 911 sitios, de los cuales tres contienen "gaps". Los últimos 858 sitios del alineamiento (hebra L en sentido 5' > 3') corresponden a la región control según una comparación con los genomas mitocondriales de tres especies de la misma familia disponibles en el GenBank. Un total de 62 haplotipos se recuperaron entre las 210 secuencias. El número de haplotipos por localidad, así como las otras medidas de diversidad intrapoblacional, se muestran en la Tabla 4.2.

La red de haplotipos se muestra en la Figura 4.2, donde se indica(n) la(s) localidad(es) de origen y la frecuencia de cada haplotipo. Hay varios aspectos destacables en esta red, que en conjunto revelan una escasa estructura filogeográfica para *Rhinella atacamensis*: la escasez de haplotipos con alta frecuencia (exceptuando la mayoría de los del extremo norte), la presencia de una red central de haplotipos no muestreados, la alta divergencia entre los haplotipos dentro de las poblaciones, que muchas veces es superior a la divergencia interpoblacional, y la presencia de varios grupos de haplotipos formados por muestras provenientes de localidades no contiguas. Estos dos últimos aspectos son ilustrados en la Figura 4.3. Ahí se muestra la ubicación en la red de los cuatro grupos de localidades contiguas geográficamente (uno de estos grupos formado por una sola localidad, Cochiguaz Alto) que se definieron por presentar haplotipos exclusivos (Figura 4.3A). Los cuatro grupos fueron: Paposo-Las Bandurrias-Las Breas, Mostazal-Carrera Pinto, Las Juntas-Caimanes (17 localidades en total) y Cochiguaz Alto. No fue posible definir más de un grupo para las localidades ubicadas

entre los 29 y 32°S (Las Juntas-Caimanes), que en conjunto abarcan más de la mitad de la distribución de la especie, pero se observa cierto grado de segregación de haplotipos entre las localidades ubicadas al norte y sur de los 30°S.

Localidad	Nº de secuencias	Nº de haplotipos	Diversidad haplotípica $\pm$ D.e.	Diversidad nucleotídica $\pm$ D.e.
Paposo	20	3	0,616 $\pm$ 0,077	0.0073 $\pm$ 0.0040
Las Breas	8	1	0	0
Mostazal	20	1	0	0
Carrera Pinto	10	1	0	0
Quebrada La Higuera	7	4	0,714 $\pm$ 0,181	0.0036 $\pm$ 0.0024
Quebrada Los Sapos	20	3	0,611 $\pm$ 0,062	0.0054 $\pm$ 0.0031
Relincho	7	2	0,286 $\pm$ 0,196	0.0009 $\pm$ 0.0009
Pajonales	8	4	0,750 $\pm$ 0,139	0.0066 $\pm$ 0.0040
Cruce a Chungungo	10	6	0,889 $\pm$ 0,075	0.0082 $\pm$ 0.0047
Cochiguaz Alto	12	4	0,712 $\pm$ 0,105	0.0055 $\pm$ 0.0032
Quebrada Chacay	5	5	1,000 $\pm$ 0,127	0.0053 $\pm$ 0.0036
Socos	20	11	0,895 $\pm$ 0,052	0.0076 $\pm$ 0.0042
Canela Alta	6	5	0,933 $\pm$ 0,122	0.0065 $\pm$ 0.0042
Los Perales	6	5	0,933 $\pm$ 0,122	0.0074 $\pm$ 0.0047
Palquial	18	12	0,954 $\pm$ 0,030	0.0084 $\pm$ 0.0046
Caimanes	19	11	0,924 $\pm$ 0,038	0.0063 $\pm$ 0.0035

Tabla 4.2.- Medidas de variación intrapoblacional calculadas con las secuencias de la región control mitocondrial de 16 localidades representativas de todo el rango de distribución de *Rhinella atacamensis* (solo localidades con cinco o más muestras). Para todos estos cálculos se incluyeron los sitios con "indels". Los valores de diversidad nucleotídica para las seis localidades foco se graficaron en la Figura 5. D.e. = desviación estándar.

Las cuatro agrupaciones, en ningún caso, corresponden a grupos de haplotipos filogenéticamente relacionados, como puede verse en la red de haplotipos de la Figura 4.3A. Lo mismo ocurre con los haplotipos observados en la mayoría de las localidades (independientemente de su ubicación a lo largo de la distribución), los cuales se



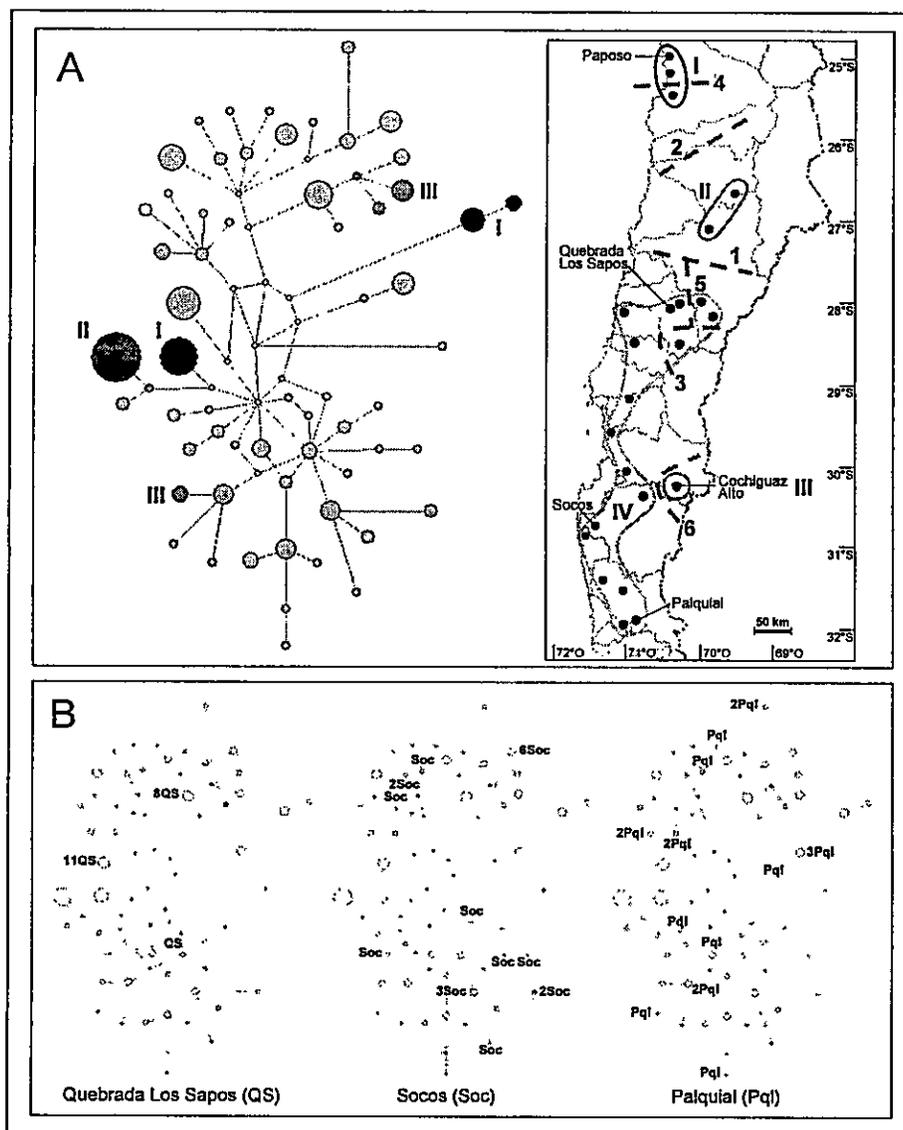


Figura 4.3.- Estructura filogeográfica de *Rhinella atacamensis* obtenida con las secuencias de la región control mitocondrial. A: Distribución geográfica de los cuatro grupos de localidades definidos por poseer haplotipos exclusivos y resultados del análisis con el programa Barrier. Los grupos son simbolizados en la red de haplotipos y en el mapa con negro y distintos tonos de gris (números romanos). Dos de los cinco grupos, II y IV, están conformados por localidades ubicadas en más de una cuenca hidrográfica. En el mapa se muestran, con líneas segmentadas y numeradas en orden de importancia, las barreras inferidas con el programa Barrier. B: Relaciones filogenéticas entre los haplotipos muestreados en algunas localidades representativas. La nomenclatura es la misma utilizada en la Figura 4.2. En la red de haplotipos superior (Figura 4.3A), se puede ver además la posición de los haplotipos de otras dos poblaciones: Paposo (I), y Cochiguaz Alto (III).

El primer análisis de SAMOVA, que se realizó incluyendo todas las localidades, entregó resultados con poco sentido geográfico y escasamente informativos. En este análisis, el número de grupos que maximizó la varianza entre grupos fue cuatro, dos de ellos formados por dos localidades (Las Bandurrias y Relincho), cuyos haplotipos se encuentran también en otras localidades contiguas. Al definir cinco grupos (con una disminución de la varianza entre grupos), se separa otra localidad con un haplotipo muestreado no exclusivo, Talinay, y siguen sin separarse localidades con haplotipos altamente divergentes, Paposo y Las Breas. Estos resultados fueron atribuidos al bajo número de muestras de algunas localidades por lo que se realizaron dos análisis adicionales con SAMOVA excluyendo las localidades con una o dos muestras. No hubo cambios sustanciales en las agrupaciones obtenidas con estos dos últimos análisis.

Los resultados de Barrier, en contraste, concuerdan en gran parte con la definición de grupos de localidades con haplotipos exclusivos (Figura 4.3). Se limitó a seis el número de barreras consideradas ya que la sexta corresponde a la última que separa a una localidad con un número significativo de ejemplares muestreados que posee solo haplotipos exclusivos. Hay que destacar que las cinco primeras barreras se ubican al norte de los 29°S. Los valores de los componentes de varianza para el AMOVA realizado con las agrupaciones definidas por Barrier, para el análisis en que se utilizaron las cuatro agrupaciones de localidades contiguas definidas por la posesión de haplotipos exclusivos (Figura 4.3A) y aquel considerando los grupos de localidades ubicados en distintas cuencas hidrográficas se muestran en la Tabla 4.3.

El coeficiente de correlación de la prueba de Mantel fue bajo, 0,2, pero significativo ( $P = 0,029$ ), lo cual indica que una mínima parte de la diferenciación

revelada por las secuencias mitocondriales a nivel de la especie puede ser explicada por un modelo de aislamiento por distancia. Los índices de fijación para los pares de localidades contiguas en sentido norte-sur fueron (solo para aquellas con siete o más muestras): Paposo-Las Breas, 0,299; Las Breas-Mostazal, 1; Mostazal-Carrera Pinto, 0; Carrera Pinto-Quebrada La Higuera, 0,786; Quebrada La Higuera-Quebrada Los Sapos, 0,157; Quebrada Los Sapos-Relincho, 0,546; Relincho-Pajonales, 0,387; Pajonales-Cruce a Chungungo, 0,056, Cruce a Chungungo-Cochiguaz Alto, 0,117, Cochiguaz Alto-Socos, 0,345; Socos-Palquial 0,087, y Palquial-Caimanes, 0,101. Los índices de fijación entre las poblaciones foco se especifican en la Tabla 4.4 y se muestran gráficamente en la Figura 4.4.

Se codificó un total de 179 bandas obtenidas con cinco combinaciones de partidores. Las otras tres combinaciones consideradas inicialmente fueron excluidas por producir pocas bandas informativas, y/o perfiles de baja calidad, que no pudieron ser codificados para algunas muestras. De las 179 bandas, 78 fueron constantes, o sea, fueron codificadas como presentes en todas las muestras. Las medidas de diversidad intrapoblacional para las seis localidades donde se obtuvieron estos marcadores se muestran en la Tabla 4.5, mientras que los índices de fijación ( $F_{ST}$ ) entre las localidades contiguas (cinco comparaciones) se encuentran en la Tabla 4.4. Los valores de heterocigocidad y  $F_{ST}$  se grafican en la Figura 4.4 junto con los respectivos valores obtenidos con las secuencias para las seis localidades foco.

*Análisis de los marcadores AFLP*

Los dos análisis con Structure, incorporando la información de las localidades o no, indican que las siguientes cuatro agrupaciones y localidades representan mejor la estructura genética dada por las seis localidades examinadas: Paposo, Mostazal, Quebrada Los Sapos y Cochiguaz Alto-Socos-Palquial. En la Figura 4.5 se muestra un resultado representativo (una corrida con  $K = 4$ ) en que se observa la probabilidad de asignación de cada individuo a cada una de las cuatro poblaciones definidas. La prueba de Mantel no fue significativa ( $R_{xy} = 0,431$ ;  $P = 0,069$ ) al considerar las seis localidades, pero el coeficiente de correlación aumentó y fue significativo al excluir la localidad de Paposo ( $R_{xy} = 0,685$ ;  $P = 0,037$ ). Esto significa que hay una mayor divergencia genética de esta localidad con respecto al resto, de lo que se esperaría de un modelo de aislamiento por distancia.

Agrupaciones de localidades:	Componentes de varianza (porcentajes)		
	Entre grupos	Entre poblaciones dentro de grupos	Dentro de las poblaciones
Análisis de Barrier (7 grupos)	35,74	13,45	50,82
Agrupaciones con haplotipos exclusivos (4 grupos)	31,17	18,38	50,45
Agrupaciones por cuencas (13 grupos)	17,36	24,66	57,98

Tabla 4.3.- Componentes de varianza de los AMOVAs realizados con las secuencias de la región control mitocondrial con el programa Arlequin. Se muestran los resultados para las agrupaciones reconocidas en el análisis de Barrier, para las cuatro agrupaciones definidas por poseer haplotipos exclusivos y para la estructura correspondiente a la separación de las localidades por su ubicación en las diferentes cuencas hidrográficas (ver composición de los grupos en el texto y Figura 4.3). Todos los valores son significativos ( $P < 0,01$ ; 1000 permutaciones).

Localidades	Secuencias mitocondriales	Marcadores AFLP
Paposo-Mostazal	0,623	0,587
Mostazal-Quebrada Los Sapos	0,710	0,297
Quebrada Los Sapos-Cochiguaz Alto	0,322	0,157
Cochiguaz Alto-Socos	0,345	0,048
Socos-Palquial	0,087	0,027

Tabla 4.4.- Índices de fijación ( $F_{ST}$ ) entre las seis localidades foco de *Rhinella atacamensis* calculados con las secuencias mitocondriales y marcadores AFLP. Sólo se muestran los valores para las localidades contiguas en sentido norte-sur. Estos valores fueron utilizados para realizar el gráfico de la Figura 4.4.

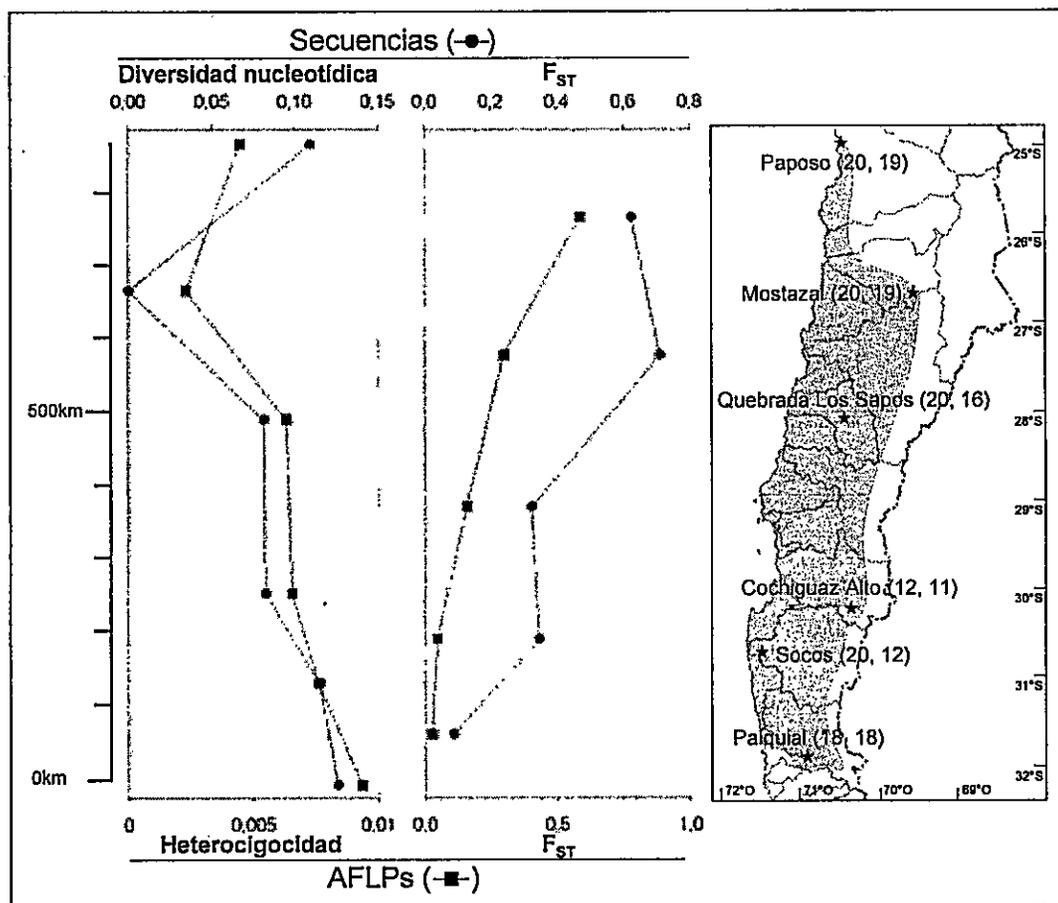


Figura 4.4.- Variación genética intra e interpoblacional a lo largo de la distribución de *Rhinella atacamensis*. Los gráficos muestran los valores de variación intrapoblacional (diversidad nucleotídica y heterocigocidad) e interpoblacional ( $F_{ST}$ ) obtenidos con las secuencias mitocondriales y marcadores AFLP en las seis localidades foco (mapa de la derecha). El eje vertical de los gráficos representa la distancia en kilómetros tomando la localidad de Palquial como el origen. En el mapa se indica además, entre paréntesis, el número de muestras utilizadas para los cálculos (secuencias mitocondriales, AFLPs).

Localidad	Porcentaje de loci polimórficos	Heterocigocidad $\pm$ E.e.
Paposo	20,11	0,065 $\pm$ 0,011
Mostazal	9,50	0,033 $\pm$ 0,008
Quebrada Los Sapos	26,26	0,092 $\pm$ 0,013
Cochiguaz Alto	25,14	0,094 $\pm$ 0,013
Socos	31,84	0,109 $\pm$ 0,013
Palquial	38,55	0,136 $\pm$ 0,014

Tabla 4.5.- Medidas de diversidad intrapoblacional para las seis localidades foco de *Rhinella atacamensis* calculadas con 179 marcadores AFLP. Los valores de heterocigocidad se muestran gráficamente en la Figura 4. E.e.: error estándar.

El árbol de UPGMA concuerda a grandes rasgos con los resultados de Structure. Las dos agrupaciones principales, una correspondiente a Paposo y otra que incluye los ejemplares de las otras cinco localidades, están respaldadas por valores significativos de "bootstrap" (100 y 66, respectivamente) (Figura 4.5). Dentro de este último grupo hay otras dos agrupaciones que definen localidades, una que incluye todos los ejemplares de Mostazal (con alto respaldo de "bootstrap") y otro que incluye todos los ejemplares de Quebrada Los Sapos (con "bootstrap" menor a 50). La alta divergencia de Paposo del resto de las localidades revelada en este análisis es consistente con la interpretación de la prueba de Mantel al excluir esta localidad.

#### 4.5. Discusión

El extenso muestreo y la utilización de un gran número de marcadores nucleares AFLP en conjunto con las secuencias mitocondriales, permitieron establecer con detalle el grado de diferenciación genética que ha alcanzado *R. atacamensis* a través de todo su rango de distribución. En particular, los datos generados en este estudio permitieron reevaluar las hipótesis de Cei (1962, 1972), considerando el conocimiento actual de la

distribución de *R. atacamensis*, las cuales son útiles para abordar algunos aspectos de la diferenciación poblacional de esta especie. La escasa variación intraespecífica observada en las poblaciones de la zona norte de la distribución (al norte de los 29°S) con la región control (Tabla 4.2) y en menor medida con los marcadores AFLP (Tabla 4.5), es consistente con la inferencia de Cei (1962) de “la tendencia genotípica a la homocigosis” de algunas poblaciones de esta especie. Esta inferencia se basó solo en la uniformidad en los patrones de coloración que este autor observó, por lo que ahora es posible someter a prueba esta hipótesis explícitamente utilizando marcadores codominantes y posiblemente otros tipos de caracteres (e.g. morfométricos).

Con respecto a la hipótesis de Cei (1972) de que *R. atacamensis* se habría originado a partir de poblaciones norteñas de *R. arunco*, la evidencia biogeográfica y genética no permiten sostenerla tal como fue planteada originalmente: las distribuciones actuales de ambas especies son de una extensión similar y genéticamente corresponden a dos linajes recíprocamente monofiléticos (Correa et al., datos no publicados; ver también Capítulo 5). De este modo, si alguna de estas especies se originó a partir de poblaciones marginales de la otra especie, no hay evidencia genética o biogeográfica actual para discernir entre estas dos posibilidades. Una reinterpretación de la hipótesis de Cei (1972), teniendo en cuenta el conocimiento actual de la distribución de *R. atacamensis*, es que las poblaciones del extremo norte se originaron a partir de poblaciones sureñas de la misma especie. Sin embargo, esta hipótesis se vuelve trivial al considerar la configuración territorial de Chile y que sólo poblaciones de *R. atacamensis* habitan hasta los 32°S. Por lo tanto una pregunta válida es, por ejemplo, hasta que grado estas poblaciones han divergido de las poblaciones de más al sur.

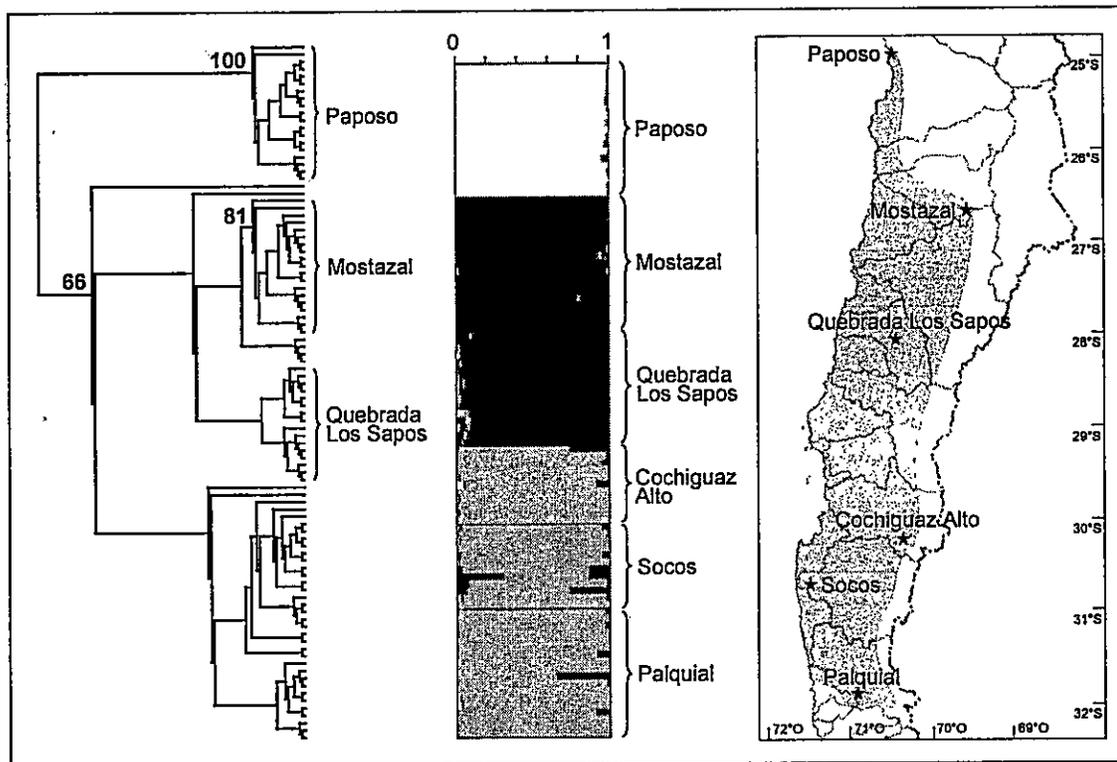


Figura 4.5.- Análisis de UPGMA y Structure para los marcadores AFLP de las seis localidades foco. Los valores sobre los nodos del árbol de UPGMA (izquierda) corresponden a los “bootstrap” obtenidos con 1000 seudoréplicas. El árbol muestra dos agrupaciones principales con valores significativos de “bootstrap”, una de ellas formada por todos los ejemplares de Paposo. Solo otras dos localidades pueden distinguirse en este análisis, Mostazal y Quebrada Los Sapos, la última sin un valor significativo de “bootstrap”. El gráfico de barras del medio corresponde a una de las corridas del programa Structure donde se especificó cuatro poblaciones (representadas por los distintos tonos de gris). Las barras de cada ejemplar, ordenadas de arriba hacia abajo por población, muestran la proporción de ancestralidad en cada una de las cuatro poblaciones definidas por el programa. La escala sobre la barra superior indica la probabilidad a posteriori.

Los patrones de diferenciación genética en la zona norte de la distribución de *R. atacamensis* se pueden explicar por el mantenimiento de las condiciones de aridez en esa zona. La antigüedad del desierto de Atacama (Clarke 2006) y el levantamiento de la cordillera de Los Andes hasta alturas cercanas a las actuales a partir de finales del

Plioceno (Hinojosa y Villagrán 1997) indican que esas barreras geográficas han limitado la dispersión de esta especie hacia el norte y este, respectivamente, al menos desde esa época. La transición desde un clima mediterráneo en el sur de la distribución de esta especie hasta uno desértico en su extremo norte, el cual va acompañado por una disminución concomitante de las precipitaciones (Luebert y Plissock 2006), implica que los ambientes acuáticos se hacen más escasos hacia el norte.

El aislamiento de estos sistemas hídricos en una matriz árida que limita la dispersión de este tipo de organismos, junto a su pequeño tamaño en muchos casos y la impredecibilidad de las precipitaciones que los alimentan, habrían tenido consecuencias en la variación genética de las poblaciones que las ocupan. De hecho, como se mencionó antes, lo que se observa es una disminución de la variación y un aumento de la divergencia entre las poblaciones hacia el norte (Figura 4.4), tendencia que es más acentuada a partir de los 28°S. Un ejemplo que ilustra este patrón lo constituyen las localidades de Las Breas, Mostazal y Carrera Pinto, donde solo se observó un haplotipo en cada una de ellas, sugiriendo que esas poblaciones han pasado por severos cuellos de botella (Figura 4.2, Tabla 4.2). Esta baja diversidad genética (corroborada con los marcadores AFLP para la población de Mostazal) está acompañada de una alta divergencia interpoblacional, como se desprende del resultado del análisis de Barrier, donde Las Breas y Mostazal-Carrera Pinto se separan de las localidades cercanas (Figura 4.3), y los valores de  $F_{ST}$  (Tabla 4.4). Un caso particular es Paposo, donde sólo tres haplotipos fueron detectados, dos de ellos muy divergentes con respecto al tercero y a la mayoría del resto de los haplotipos observados en la especie (Figura 4.3). Es poco probable que este patrón se haya producido por selección natural en los genes

mitocondriales ya que los niveles de variación mitocondrial son similares a los encontrados con los marcadores nucleares en las poblaciones de Paposo, Mostazal y Quebrada Los Sapos, y muchos de los haplotipos mitocondriales muestreados en esta zona son compartidos entre localidades cercanas que actualmente se encuentran aisladas.

En contraste con la diferenciación observada en la zona norte de la distribución, en la zona sur ( $29^{\circ}30'$ - $32^{\circ}$ S), que representa menos de la mitad de la distribución, se concentra la mayor parte de la variación intraespecífica, como puede observarse en la red de haplotipos (Figuras 4.2 y 4.3) y se desprende de los valores relativamente altos de variación intrapoblacional de las localidades de Cochiguaz Alto, Socos y Palquial (Tablas 4.2 y 4.5). Estas localidades representan a las tres cuencas hidrográficas más extensas de esa zona (Figura 4.1), donde los niveles de precipitación son más altos, lo cual permitiría la existencia de poblaciones más numerosas con una mayor posibilidad de conexión. Inversamente a lo que ocurre en la zona norte, esta alta diversidad está acompañada por una baja divergencia interpoblacional, como se desprende de los valores de  $F_{ST}$  (Tabla 4.4), y los análisis con Barrier para las secuencias mitocondriales (Figura 4.3) y con Structure para los marcadores AFLP (Figura 4.5), los cuales no permiten separar a las localidades de esas cuencas entre sí.

La mayor concentración de la variación genética en la zona sur del rango de *R. atacamensis* es esperable ya que a partir de los  $32^{\circ}$ S al sur se encuentra su especie hermana *R. arunco*. Esta desigualdad en la distribución de la variación intraespecífica de *R. atacamensis* se puede relacionar con el origen de las poblaciones del extremo norte, las cuales necesariamente se han originado como producto de expansiones de aquellas situadas más al sur. La red muestra que la mayoría de los haplotipos pertenecientes a las

poblaciones del extremo norte están separados por ramas más largas que se desprenden de un entramado central conformado principalmente por los haplotipos de las localidades de la zona sur (29-32°S). Sin embargo, estas “prolongaciones” no están conectadas directamente y surgen de distintos lugares de la red, lo cual sugiere que ha habido varios eventos de expansión independientes que habrían originado las poblaciones del extremo norte. Tanto la falta de estructura filogeográfica observada entre los 29°30'-32°S como el patrón de colonización sugerido para el norte de la distribución, pueden ser atribuidos a los cambios climáticos ocurridos a finales del Pleistoceno y durante el Holoceno, los cuales produjeron desplazamientos norte-sur de las formaciones vegetales (Villagrán 1995, 2001, Villagrán y Armesto 2005) que afectaron probablemente la distribución de otros organismos terrestres.

Finalmente, hay que destacar la importancia de haber utilizado distintos tipos de marcadores y varias aproximaciones analíticas para identificar algunos procesos históricos y microevolutivos que han determinado el grado de estructura filogeográfica de esta especie a través de su distribución. La concordancia general entre los patrones hallados con los marcadores mitocondriales y nucleares -una escasa estructura en la mayor parte del rango, con la excepción del extremo norte-, fortalece las inferencias que podrían haberse obtenido con cada uno de los marcadores por separado (Tabla 4.4, Figura 4.4). Es así como la diferenciación de la población que define el límite norte de la distribución, Paposo, con respecto a todas las otras localidades, fue detectada con los marcadores AFLP (Figura 4.5), pero fue menos evidente con las secuencias mitocondriales (Figura 4.3). En este caso, el mayor grado de divergencia de Paposo fue

corroborado por la prueba de Mantel en que se excluyó esta población (ver gráfico de  $F_{ST}$  en la Figura 4.4).

Otro ejemplo, ya mencionado, lo constituyen las poblaciones ubicadas al norte de los 28°S, donde la cobertura más amplia obtenida con las secuencias mitocondriales reveló los efectos de cuellos de botella, inferencia que se vio reforzada por la escasa variación nuclear detectada en la población de Mostazal con los marcadores AFLP (Tabla 4.5). Por otra parte, las secuencias mitocondriales revelaron una escasa estructura asociada a las cuencas hidrográficas (Tabla 4.3), que puede explicarse por la presencia de muchos haplotipos compartidos entre varias localidades ubicadas en diferentes cuencas (Figura 4.3). Esta falta de estructura, detectada también por Structure para las localidades ubicadas entre los 29 y 32°S (Figura 4.5), concuerda con los resultados de las pruebas de Mantel, los cuales indican un patrón de aislamiento por distancia en la mayor parte del rango. Sin embargo, hay que señalar que el ajuste a este modelo (dado por la correlación entre las distancias geográficas y la diferenciación genética entre poblaciones, Figura 4.4) es débil para las secuencias y es significativo para los marcadores AFLP, solo cuando se excluye la localidad más divergente, Paposó.

Un último aspecto que hay que resaltar, es la presencia de haplotipos altamente divergentes, no relacionados directamente, en la mayoría de las poblaciones (Figura 4.3), lo cual sugiere que la retención de polimorfismos ancestrales ha sido un fenómeno que ha moldeado en gran medida la variación genética mitocondrial en esta especie (véase los altos valores de variación intrapoblacional, Tablas 4.2 y 4.3). No es sencillo explicar el origen de este patrón, ya que se presenta en todo el rango de distribución, incluyendo Paposó. Una posibilidad es que *R. atacamensis* haya estado formado por poblaciones

mucho más numerosas conectadas entre sí, distribuidas aproximadamente en la misma área que la especie ocupa actualmente, las cuales disminuyeron de tamaño con la consiguiente extinción aleatoria de los linajes mitocondriales. Aunque esta explicación es difícil de corroborar, no es incongruente con el patrón de aislamiento por distancia detectado con ambos marcadores, y es sugerida por la escasez de haplotipos comunes y la presencia de muchos haplotipos inferidos en la parte central de la red (Figura 4.2). Independientemente de las causas que hayan producido este patrón, la presencia de polimorfismos ancestrales retenidos puede oscurecer las señales históricas que pueden detectarse con secuencias mitocondriales, lo que demuestra la importancia de utilizar distintos marcadores y diferentes tipos de análisis para obtener inferencias robustas acerca de la historia filogeográfica de una especie.

#### 4.6. Referencias

- Armesto, J. J., C. Villagrán y M. T. K. Arroyo. 1995. *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 477 pp.
- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.
- Avice, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)*. Sinauer, Sunderland, MA. 684 pp.
- Bandelt, H.-J., P. Forster y A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Beebee, T. J. C. 1996. *Ecology and Conservation of Amphibians*. Chapman & Hall, London. 214 pp.
- Buckley, L. B. y W. Jetz. 2007. Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. *Proceedings of the Royal Society B* 274: 1167-1173.

- Burns, E. L., M. D. B. Eldridge, D. M. Crayn y B. A. Houlden. 2007. Low phylogeographic structure in a wide spread endangered Australian frog *Litoria aurea* (Anura: Hylidae). *Conservation Genetics* 8: 17-32.
- Carvalho, J. E., C. A. Navas y I. C. Pereira. 2010. Energy and water in aestivating amphibians. En: *Aestivation: Molecular and Physiological Aspects, Progress in Molecular and Subcellular Biology* 49, pp. 141-69. Navas, C. A. y J. E. Carvalho, Eds., Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cartledge, V. A., P. C. Withers, K. A. McMaster, G. G. Thompson y S. D. Bradshaw. 2006. Water balance of field-excavated aestivating Australian desert frogs, the cocoon-forming *Neobatrachus aquilonius* and the non-cocooning *Notaden nichollsi* (Amphibia: Myobatrachidae). *The Journal of Experimental Biology* 209: 3309-3321.
- Cei, J. M. 1961. *Bufo arunco* (Molina) y las formas chilenas de *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 8: 59-81.
- Cei, J. M. 1962. *Batracios de Chile*. Ediciones Universidad de Chile, Santiago, Chile. 128 + cviii pp.
- Cei, J. M. 1972. *Bufo* of South America. En: *Evolution in the genus Bufo*, pp. 82-92. Blair, W. F., Ed., Austin, University of Texas Press.
- Clarke, J. D. A. 2006. Antiquity of aridity in the Chilean Atacama Desert. *Geomorphology* 73: 101-114.
- Correa, C., M. Sallaberry, P. Jara-Arancio, G. Lobos, E. R. Soto y M. A. Méndez. 2008. Amphibia, Anura, Bufonidae, *Rhinella atacamensis*: Altitudinal distribution extension, new records and geographic distribution map. *Check List* 4(4): 478-484.
- Correa, C., E. Riveros, G. Lobos y N. Velásquez. 2010. Amphibia, Anura, Leiuperidae, *Pleurodema thaul* (Lesson, 1827): Altitudinal distribution extension and new records from its northern range. *Check List* 6(1): 10-12.
- Crottini, A., F. Andreone, J. Kosuch, L. J. Borkin, S. N. Litvinchuk, C. Eggert y M. Veith. 2007. Fossorial but widespread: the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability. *Molecular Ecology* 16: 2734-2754.
- Dupanloup, I., S. Schneider y L. Excoffier. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
- Duellman, W. E. y L. Trueb. 1994. *Biology of Amphibians*. The John Hopkins University Press, Baltimore, USA. 670 pp.

- Edwards, D. L. 2007. Biogeography and speciation of a direct developing frog from the coastal arid zone of Western Australia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 494-505.
- Edwards, D., J. D. Roberts y J. S. Keogh. 2007. Impact of Plio-Pleistocene arid cycling on the population history of a southwestern Australian frog. *Molecular Ecology* 16: 2782-2796.
- Excoffier, L. y H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. In press.
- Falush, D., M. Stephens y J. K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7(4): 574-578.
- Fitzpatrick, S. W., C. A. Brasileiro, C. F. B. Haddad y K. R. Zamudio. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest endemic reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology* 18: 2877-2896.
- Goebel, A. M., J. M. Donnelly y M. E. Atz. 1999. PCR Primers and Amplification Methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome *b* in Bufonids and Others Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 163-199.
- Gonçalves, H., I. Martínez-Solano, R. J. Pereira, B. Carvalho, M. García-París y N. Ferrand. 2009. High levels of population subdivision in a morphologically conserved Mediterranean toad (*Alytes cisternasii*) result from recent, multiple refugia: evidence from mtDNA, microsatellites and nuclear genealogies. *Molecular Ecology* 18: 5143-5160.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Versión 5.0.9, 2001. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hillman, S. S., P. C. Withers, R. C. Drewes y S. D. Hillyard. 2008. *Ecological and Environmental Physiology of Amphibians*. Oxford University Press. 464 pp.
- Hinojosa, L. F. y C. Villagrán. 1997. Historia de los bosques del sur de Sudamérica, I: antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 225-239.

- Jaeger, J. R., B. R. Riddle y D. F. Bradford. 2005. Cryptic Neogene vicariance and Quaternary dispersal of the red-spotted toad (*Bufo punctatus*): insights on the evolution of North American warm desert biotas. *Molecular Ecology* 14: 3033-3048.
- Jowett, T. 1986. Preparation of nucleic acids. En: *Drosophila: a Practical Approach*, pp. 275-286. Roberts, D. B., Ed., Oxford, IRL Press.
- Koscinski, D., P. Handford, P. L. Tubaro, S. Sharp y S. C. Loughheed. 2008. Pleistocene climatic cycling and diversification of the Andean treefrog, *Hypsiboas andinus*. *Molecular Ecology* 17: 2012-2025.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson y D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Luebert, F. y P. Pliscoff. 2006. Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 316 pp.
- Makowsky, R., J. Chesser y L. J. Rissler. 2009. A striking lack of genetic diversity across the wide-ranging amphibian *Gastrophryne carolinensis* (Anura: Microhylidae). *Genetica* 135: 169-183.
- Pavlíček, A., T. Pavlíček y J. Flegr. 1999. FreeTree V 0.9.1.50. *Folia Biologica (Praha)* 45: 97-99.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Vences, M. y D. B. Wake. 2007. Speciation, Species Boundaries and Phylogeography of Amphibians. En: *Amphibian Biology. Volume 7, Systematics*, pp. 2613-2671. Heatwole, H., Ed., Tyler, M. J., Co-ed., Surrey Beatty & Sons, Australia.
- Vekemans, X. 2002. AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Vidal, M. A. 2008. Biogeografía de anfibios y reptiles. En: *Herpetología de Chile*, pp. 195-231. Vidal, M. A. y A. Labra, Eds., Science Verlag, Santiago, Chile.
- Villagrán, C. 1995. Quaternary history of the Mediterranean vegetation of Chile. En: *Ecology and Biogeographical History of Mediterranean Ecosystems in Chile, California*

& Australia, pp. 3-20. Arroyo, M. T. K., P. H. Zedler y M. D. Fox, Eds., Springer-Verlag, New York.

Villagrán, C. 2001. Un modelo de la historia de la vegetación de la Cordillera de La Costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 793-803.

Villagrán, C. y J. J. Armesto. 2005. Fitogeografía histórica de la Cordillera de la Costa de Chile. En: *Biodiversidad y ecología de los bosques de la Cordillera de la Costa de Chile*, pp. 99-116. Smith, C., J. J. Armesto y C. Valdovinos, Eds., Editorial Universitaria, Santiago.

Wang, I. J. 2009. Fine-scale population structure in a desert amphibian: landscape genetics of the black toad (*Bufo exsul*). *Molecular Ecology* 18: 3847-3856.

Zeisset, I. y T. J. C. Beebee. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101: 109-119.

**CAPÍTULO 5:**  
**EVIDENCIA GENÉTICA DE HIBRIDACIÓN NATURAL ENTRE LAS**  
**ESPECIES HERMANAS *RHINELLA ATACAMENSIS* Y *R. ARUNCO* (ANURA,**  
**BUFONIDAE)**  
**(MANUSCRITO EN PREPARACIÓN)**

**5.1. Resumen**

La genética de la hibridación es relevante en el contexto de los estudios de especiación porque permite examinar el grado de aislamiento reproductivo que han alcanzado especies estrechamente relacionadas que hibridan. Técnicas moleculares como los marcadores nucleares AFLP, que generan una gran cantidad de marcadores a la vez, son adecuadas para analizar este proceso en gran detalle ya que permiten medir el grado de mezcla de los individuos de una población híbrida.

*Rhinella atacamensis* y *R. arunco* son especies hermanas que en conjunto se distribuyen a lo largo de Chile entre los 25 y 38°S. Hasta hace poco se consideraba que estas especies tenían una distribución alopátrica y que el límite entre ellas se encontraba alrededor de los 32°S. Sin embargo, en 2007 se descubrió una presunta zona de contacto secundario en el estero Pupío, ubicado en esa latitud, donde se encontraron individuos que no pudieron ser identificados con certeza por su fenotipo y que poseían haplotipos mitocondriales de una u otra especie.

En este trabajo se investigó el estatus específico de ejemplares de dos sitios de este estero, Puente Pupío y Pupío Medio, utilizando marcadores AFLP, con los cuales se realizó un análisis bayesiano que permite identificar probabilísticamente distintos tipos de híbridos en una población. Adicionalmente, se obtuvo un conjunto de marcadores

diagnósticos para cada especie que pueden utilizarse para detectar ejemplares híbridos o introgresión en otras poblaciones. La mayoría de los ejemplares de los dos sitios examinados fueron identificados como retrocruces de híbridos con *R. arunco* o híbridos de primera generación, pero también se detectó un número significativo de ejemplares clasificados como *R. arunco* puros, lo cual sugiere una escasa proporción de individuos de *R. atacamensis* en esas localidades. Estos datos, complementados con secuencias mitocondriales y observaciones reproductivas (tanto de terreno como de laboratorio) de parejas capturadas en proceso de reproducción, muestran que la hibridación ha sido un fenómeno recurrente en los sitios de estudio y que las dos especies no han alcanzado un aislamiento reproductivo completo.

La identificación de cierto grado de introgresión nuclear de *R. arunco* en la población de *R. atacamensis* de Caimanes, ubicada en la zona alta del estero Pupío, indica que la zona de hibridación es relativamente ancha a lo largo del estero. Por otra parte, la composición genética de las localidades de Puente Pupío y Pupío Medio, en las cuales predominan los individuos con una alta proporción de marcadores nucleares y genotipo mitocondrial de *R. arunco*, sugiere que podría existir una población pura de esta especie río abajo del área de estudio. Con los antecedentes disponibles no es posible establecer, por ejemplo, si esta zona híbrida corresponde a una zona de tensión o si es el resultado de una expansión reciente de una de las dos especies dentro del rango de la otra, por lo que es necesario recopilar información distribucional, biogeográfica y ecológica para identificar las causas de la aparente segregación espacial de las dos especies a lo largo del estero Pupío.

**Palabras clave:** AFLPs, mtDNA, zona híbrida, introgresión

## 5.2. Introducción

La hibridación e introgresión en poblaciones naturales han sido consideradas como fuentes potenciales de novedades evolutivas y como procesos que pueden promover adaptación y especiación (Burke y Arnold 2001, Seehausen 2004). Esto último ha sido ampliamente reconocido en plantas donde la especiación por hibridación es muy común (Soltis y Soltis 2009), pero hay un creciente número de estudios que han documentado este tipo de especiación en animales (Mallet 2007, Schwenk et al. 2008). Hay otro aspecto de la hibridación que puede contribuir al estudio de la especiación: debido a que la identificación de los mecanismos de aislamiento reproductivo que previenen el flujo génico es esencial para entender el proceso de formación de las especies, las instancias de hibridación natural, particularmente aquellas que involucran especies estrechamente relacionadas, constituyen escenarios ideales para investigar este proceso (Coyne y Orr 2004). Un requisito previo para el estudio de las barreras reproductivas involucradas en el proceso de especiación, es determinar el grado de aislamiento reproductivo que han alcanzado las entidades que hibridan. En este sentido, la utilización de marcadores moleculares es fundamental para caracterizar la estructura genética de las zonas híbridas y establecer la extensión de la hibridación e introgresión (Avice 2004).

La investigación de las zonas híbridas se ha beneficiado enormemente de la aplicación de técnicas moleculares multilocus, como los AFLPs, los cuales permiten caracterizar con gran detalle la composición genética de las poblaciones (Bonin et al. 2007, Meudt y Clarke 2007). Aunque la naturaleza dominante de los AFLPs implica una menor información genética por locus, esta desventaja puede ser ampliamente

compensada por la capacidad de generar un alto número de marcadores distribuidos al azar en el genoma y por la posibilidad de aplicarlos a una amplia gama de organismos, sin la necesidad de un detallado conocimiento de su genoma (Bonin et al. 2007, Meudt y Clarke 2007). Se han utilizado dos aproximaciones para identificar híbridos con AFLPs. Uno involucra la búsqueda de marcadores diagnósticos, es decir, aquellos fijos o que muestren claras diferencias de frecuencia entre las especies involucradas, y el otro hace uso de la totalidad de los marcadores generados. Sin embargo, a menudo es difícil hallar marcadores diagnósticos en especies muy relacionadas, por lo que el segundo enfoque es utilizado con mayor frecuencia (Bonin et al. 2007). Hoy se dispone de herramientas analíticas de tipo bayesiano, basadas en modelos que toman en cuenta la naturaleza dominante de estos marcadores, que pueden utilizarse para identificar distintos tipos de híbridos sin la necesidad de recurrir a marcadores diagnósticos (e.g. con el programa NewHybrids, Anderson 2008). Independientemente de la metodología empleada, los análisis de AFLPs, complementados con información de otros tipos de marcadores (particularmente DNA mitocondrial en animales y DNA de cloroplasto en plantas) y otro tipo de datos (morfológicos, ecológicos, cromosómicos, etológicos), han permitido develar la complejidad de la arquitectura genética y la dinámica poblacional de las zonas híbridas (e.g. Young et al. 2001, Wu y Campbell 2005, Minder et al. 2007, Phillips et al. 2007, ten Cate et al. 2010).

Los anuros del género *Rhinella* están representados en Chile por cuatro o cinco especies (dependiendo de los autores), que en conjunto se distribuyen desde el zona altiplánica en el extremo norte (17°30'S) hasta los bosques templados australes (43°S aproximadamente) (Ceí 1962, Veloso y Navarro 1988, Veloso 2006). Aunque estos

anfibios han sido capaces de colonizar todo tipo de ambientes a lo largo del territorio chileno, sus distribuciones prácticamente no se sobreponen, lo cual es principalmente el resultado de la especialización ecológica de las distintas especies (Ceí 1972). Por ejemplo, *R. spinulosa* es una especie adaptada a la vida en altura, que en Chile habita los faldeos de Los Andes entre los 1000 y 4600m aproximadamente. Otras dos especies, *R. atacamensis* y *R. arunco*, habitan la costa y el interior del país entre los 25 y 38°S aproximadamente, en un gradiente climático que abarca desde el límite sur del desierto de Atacama hasta el límite norte del bosque templado. Hasta ahora no se han descrito zonas de superposición entre los rangos de distribución de estas tres especies, por lo que tampoco se han hallado zonas de hibridación entre ellas. Sin embargo, se conoce un caso de hibridación natural en el género *Rhinella* en Chile, un macho híbrido entre *R. spinulosa* y *R. arunco*, aparentemente estéril (Mezey 1979). Estas dos especies tienen una distribución parapátrica en Chile central, donde *R. spinulosa* reemplaza a *R. arunco* sobre los 1000-1200m aproximadamente, por lo que el hallazgo de este individuo se atribuyó a un contacto ocasional entre esas especies (Mezey 1979). Los otros antecedentes disponibles de hibridación en el género *Rhinella* en Chile corresponden a experimentos de cruzamientos entre las especies *R. arenarum*, *R. arunco*, *R. atacamensis* y *R. spinulosa* (Mezey 1979).

Desde un punto de vista filogenético, *R. atacamensis* y *R. arunco* son especies hermanas, pertenecientes al mismo grupo que *R. spinulosa*, pero no relacionadas directamente con esta especie (Ceí 1971, Mezey 1979, Méndez 2000, Pramuk 2006). Siempre se ha aceptado que *R. atacamensis* y *R. arunco* tienen distribuciones alopátricas y que sus rangos se suceden a lo largo del país entre los 25 y 38°S aproximadamente

(e.g. Cei 1962, Veloso 2006, Correa et al. 2008, Capítulo 2). Esta situación se ha mantenido a pesar de que la distribución de *R. atacamensis* ha sido extendida hacia el sur dos veces desde el año 2002 (revisado en Correa et al. 2008, Capítulo 2). Las nuevas localidades que definen el extremo sur del rango de *R. atacamensis* implican que el límite entre ambas especies estaría alrededor de los 32°S (Correa et al. 2008, Capítulo 2). Sin embargo, en enero de 2007, en el contexto de una exploración para definir con mayor precisión los límites de distribución entre ellas, se descubrió una población de *Rhinella* en el estero Pupío (localidad de Puente Pupío) que no pudo ser identificada a nivel específico por la alta variabilidad y la presencia de patrones de coloración inusuales entre individuos juveniles. Un estudio preliminar con secuencias de la región control mitocondrial de unos pocos de esos ejemplares reveló que en ese sitio coexistían individuos con DNA mitocondrial de *R. atacamensis* o de *R. arunco*.

Debido a la ausencia de antecedentes previos, los tres escenarios para explicar la mezcla de haplotipos mitocondriales en Puente Pupío se consideraron igualmente probables: las dos especies están hibridando, ellas coexisten sin mezclarse, o solo hay una especie y la presencia de haplotipos de la otra se debe a introgresión mitocondrial. La observación inicial de los patrones de coloración es consistente solo con la primera opción. El objetivo de este estudio fue caracterizar genéticamente las poblaciones del estero Pupío, utilizando marcadores nucleares AFLP además de las secuencias de la región control, para establecer cuál de los tres escenarios planteados puede explicar la mezcla de haplotipos mitocondriales. El uso combinado de marcadores mitocondriales y nucleares no solo permitió obtener una detallada caracterización genética de esas poblaciones sino que también detectar instancias de introgresión. En particular, los

marcadores AFLP fueron utilizados para detectar si estaba ocurriendo hibridación y con que frecuencia, considerando las proporciones de distintos tipos de híbridos y ejemplares puros identificados en esas poblaciones. Además, estos marcadores sirvieron para definir un conjunto de marcadores diagnósticos que pueden ser útiles para identificar el estatus específico de otras poblaciones de *Rhinella* de la zona. Por último, los marcadores moleculares fueron complementados con datos fenotípicos y observaciones reproductivas para obtener un panorama más completo de la biología poblacional que determina la estructura genética de las poblaciones del estero Pupío.

### 5.3. Materiales y métodos

#### *Sitios y material de estudio*

La zona de estudio corresponde a una pequeña cuenca hidrográfica conformada por el estero Pupío y sus afluentes, que se origina en la precordillera de Los Andes alrededor de los 32°S (Figura 5.1). Esta cuenca limita al norte con una más extensa correspondiente al río Choapa, donde habita *R. atacamensis*, y al sur con una de extensión similar correspondiente al río Quilimarí, en el extremo norte de la distribución de *R. arunco* (los límites entre las cuencas aparecen en la Figura 5.1).

Para el estudio genético se incluyeron cuatro localidades a lo largo del estero Pupío: Puente Pupío, Pupío Medio, Caimanes y Mauro. Puente Pupío fue identificada en 2007 como una posible zona de simpatria entre *Rhinella atacamensis* y *R. arunco*. En ese lugar, a mediados de enero, se recolectaron ejemplares juveniles de *Rhinella* que no pudieron ser identificados a nivel específico por sus patrones de coloración. Un estudio posterior con secuencias mitocondriales demostró que esa población estaba conformada

por individuos que poseían DNA mitocondrial de una u otra especie. En la localidad de Pupío Medio, explorada a partir de agosto de 2007, también se encontraron individuos con características similares a los de Puente Pupío y una mezcla de haplotipos mitocondriales. En Caimanes, a fines de agosto de 2008, se recolectaron ejemplares adultos con tamaño y patrones de coloración similares a *R. atacamensis*. La última localidad del estero, Mauro, fue descrita como la más sureña de esta especie (Sallaberry et al. 2007). De esta localidad, drásticamente modificada y actualmente inaccesible por actividades mineras, se incluyeron una larva, un postmetamórfico y un juvenil recolectados antes de 2007.

Para obtener marcadores AFLP se utilizaron casi exclusivamente adultos de tres de estas localidades: Puente Pupío, Pupío Medio y Caimanes. Entre ellos se encuentran nueve parejas encontradas en amplexo (abrazo reproductivo), que se recolectaron entre 2007 y 2009: tres de Puente Pupío y seis de Pupío Medio. De Caimanes se incluyeron dos larvas recolectadas en 2007 y seis de los adultos capturados en 2008. Para la obtención de secuencias mitocondriales se utilizaron ejemplares de las cuatro localidades, incluyendo las nueve parejas de Puente Pupío y Pupío Medio. De Puente Pupío se incluyeron 10 de los juveniles recolectados en 2007 y nueve adultos capturados en 2008 y 2009. De Pupío Medio se incluyeron 15 adultos capturados entre 2007 y 2009. De Caimanes se incluyeron tres larvas recolectadas en 2007 en distintos sitios y nueve de los adultos capturados en 2008. De Mauro se incluyeron las tres muestras disponibles recolectadas antes de 2007.

Para efectos comparativos y establecer el estatus específico de los ejemplares del estero Pupío, se obtuvieron marcadores AFLP de otras seis localidades de *R.*

*atacamensis*, ubicadas al norte de la cuenca del estero Pupío, y de cinco de *R. arunco*, incluyendo la más norteña conocida para esta especie, Quilimarí (Figura 5.1, Tabla 5.1). La cobertura geográfica y el número de muestras por localidad fueron mayores para *R. atacamensis* que para *R. arunco*, debido a que se utilizaron datos de un estudio filogeográfico que se está llevando a cabo en la primera especie (Capítulo 5.4). También se incluyeron secuencias mitocondriales de ejemplares de las 11 localidades de ambas especies ubicadas fuera de la cuenca del estero Pupío (Figura 5.1, Tabla 5.1). Aproximadamente, 25% de los individuos adultos capturados en las localidades del estero Pupío y de Quilimarí fueron devueltos a sus lugares de origen después de ser muestreados (membrana interdigital). El resto de los adultos, así como los juveniles y larvas fueron depositados en la colección herpetológica del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Chile (DBGUCH). Las coordenadas y el número de muestras para todas las localidades incluidas en este estudio se encuentra en la Tabla 5.1. Los permisos para la captura y recolección de los animales fueron proporcionados por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) (resoluciones 3085/2000, 2105/2004 y 13/2006).

#### *Obtención de DNA y secuencias mitocondriales*

El DNA para obtener las secuencias mitocondriales se extrajo principalmente de músculo: del muslo en el caso de adultos, de la lengua en el caso de juveniles y postmetamórficos, y de la cola en el caso de las larvas. Excepcionalmente se utilizó hígado, dedo o membrana interdigital. Este último tejido fue utilizado en el caso de los individuos que fueron regresados a sus lugares de origen. Para la extracción se utilizó un

método de sales modificado de Jowett (1986). El fragmento de DNA mitocondrial secuenciado comprende el extremo 3' del gen citocromo *b* y aproximadamente 850 bases del extremo contiguo de la región control (no codificante). Los partidores utilizados para amplificar este fragmento fueron CytbA-L (5'-GAATYGGRRGGWCAACCAGTAGAAGACCC-3') y ControlP-H (5'-GTCCATAGATTCASTTCCGTCAG-3') diseñados por Goebel et al. (1999).

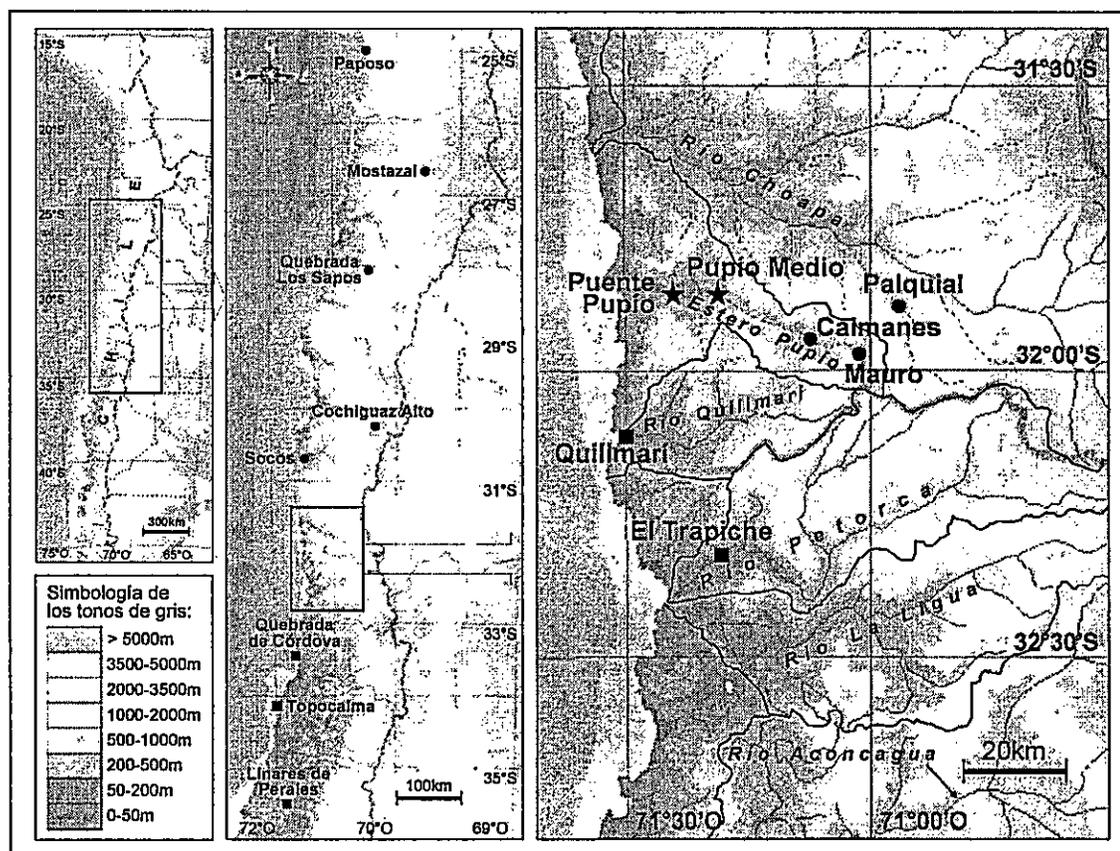


Figura 5.1.- Ubicación geográfica de las localidades de *Rhinella atacamensis* (círculos), de *R. arunco* (cuadrados) y de la zona de hibridación entre estas dos especies (mapa del extremo derecho) incluidas en este estudio. En ese mapa se muestran las dos localidades del estero Pupío (estrellas) donde se encontraron ejemplares híbridos y los principales sistemas hídricos de la zona (las líneas oscuras delgadas indican los límites entre las cuencas hidrográficas).

Localidad	Composición poblacional	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (msnm)	AFLPs	Secuencias
Paposo	<i>R. atacamensis</i>	25° 01' 33,2"	70° 27' 10,3"	332	19	20
Mostazal	<i>R. atacamensis</i>	26° 40' 53,9"	69° 34' 14,8"	2574	19	20
Quebrada Los Sapos	<i>R. atacamensis</i>	28° 04' 48,4"	70° 24' 35,2"	1002	16	20
Cochiguaz Alto	<i>R. atacamensis</i>	30° 15' 38,5"	70° 19' 33,8"	2277	11	12
Socos	<i>R. atacamensis</i>	30° 43' 52,4"	71° 29' 27,8"	96	12	20
Pupío Medio	híbridos y <i>R. arunco</i>	31° 51' 55,0"	71° 18' 45,5"	160	15	15
Puente Pupío	híbridos y <i>R. arunco</i>	31° 52' 14,1"	71° 23' 55,2"	70	9	19
Palquial	<i>R. atacamensis</i>	31° 53' 17,0"	70° 56' 42,5"	596	18	18
Caimanes	en su mayoría <i>R. atacamensis</i>	31° 55' 50,6"	71° 08' 39,8"	422	8	16
Mauro	<i>R. atacamensis</i>	31° 56' 59,5"	71° 03' 50,7"	764	-	3
Quilimarí	<i>R. arunco</i>	32° 07' 12,6"	71° 28' 10,6"	13	16	14
El Trapiche	<i>R. arunco</i>	32° 18' 57,4"	71° 16' 48,0"	50	6	6
Quebrada de Córdova	<i>R. arunco</i>	33° 26' 27,6"	71° 39' 38,0"	40	2	2
Topocalma	<i>R. arunco</i>	34° 06' 54,1"	71° 55' 40,0"	15	3	3
Linares de Perales	<i>R. arunco</i>	35° 28' 09,2"	71° 51' 54,0"	57	4	3

Tabla 5.1.- Coordenadas y alturas de las localidades de *Rhinella atacamensis*, *R. arunco* y de la zona de hibridación (estero Pupío) incluidas en este estudio, ordenadas de norte a sur (ver mapa de la Figura 5.1). El estatus específico de los individuos de *Rhinella* de Pupío Medio y Puente Pupío, donde se encontraron ejemplares clasificados como híbridos junto con otros de *R. arunco*, fue establecido en este estudio. Asimismo, en Caimanes se detectó un ejemplar identificado como retrocruce entre un híbrido de primera generación (F1) y *R. atacamensis*. Se indica además el número de ejemplares por localidad utilizados para obtener marcadores AFLP y secuencias mitocondriales.

Las concentraciones o cantidades de reactivos para la PCR fueron las siguientes (30µL de volumen total): 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16mM de cada dNTP, 0,26µM de cada partidor, 1,5U de polimerasa Taq (Invitrogen) y 10-200ng de DNA total. El perfil térmico para la reacción fue el siguiente: 94°C por 2min, seguido por 36 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 45s y 72°C por 90s, y una extensión final a 72°C por 10min. Los

productos de la PCR fueron secuenciados en ambos sentidos mediante secuenciación automática utilizando un equipo ABI3730XL.

#### *Obtención de marcadores AFLP*

Se utilizaron las mismas muestras de DNA con las que se obtuvieron las secuencias, pero previamente fueron purificadas. La purificación se realizó agregando al DNA 0,1 volumen de NaAc 3M, pH 5,2 y luego 2,5 volúmenes de etanol absoluto con respecto al volumen anterior. Esta mezcla se dejó por toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ , luego se centrifugó y finalmente se suspendió en un volumen variable de agua dependiendo del tamaño del "pellet" observado.

Para la etapa de digestión y ligación se prepararon diluciones de  $50\text{ng}/\mu\text{L}$ . El DNA fue digerido con dos enzimas de restricción en una mezcla de  $25\mu\text{L}$  que contenía  $0,2\text{mg}/\mu\text{L}$  de BSA, 5U de endonucleasa MseI (New England Biolabs), 5U de endonucleasa EcoRI (New England Biolabs) y  $250\text{ng}$  de DNA, durante 3h a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguidos por 15 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  para desactivar las enzimas. Inmediatamente, se continuó con la etapa de ligación para lo cual se agregó a la reacción de digestión una mezcla de  $10\mu\text{L}$  compuesta por adaptador MseI  $0,5\mu\text{M}$  (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'/3'-TACTCAGGACTCAT-5'), adaptador EcoRI  $0,05\mu\text{M}$  (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5') y 132U de ligasa de DNA T4 (New England Biolabs). Esta reacción se mantuvo a  $16^{\circ}\text{C}$  por toda la noche.

Las concentraciones o cantidades de reactivos para la PCR preselectiva fueron las siguientes ( $25\mu\text{L}$  de volumen total):  $2\text{mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $0,36\text{mM}$  de cada dNTP,  $0,24\mu\text{M}$  de cada partidor preselectivo (EcoRI-A: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' y

MseI-C: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'), 1U de polimerasa Taq (Invitrogen) y 5µL de DNA digerido-ligado, diluido 10 veces. El perfil térmico para esta reacción fue el siguiente: 94°C por 2min, seguido por 28 ciclos de 94°C por 45s, 56°C por 45s y 72°C por 2min, y una extensión final de 72°C por 5min.

Los partidores para las PCR selectivas fueron seleccionados por medio de un "screening" realizado con unas pocas muestras de varias localidades de *Rhinella atacamensis* y *R. arunco* en que se probaron 16 combinaciones de estos partidores (todas las combinaciones entre los cuatro partidores EcoRI-ACX y los cuatro MseI-CAX, donde X representa una A, C, G o T). La PCR selectiva se realizó con la siguiente combinación de reactivos, donde el partidore EcoRI-ACX fue marcado en su extremo 5' con uno de cuatro fluoróforos (6FAM, VIC, NED o PET): 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,45mM de cada dNTP, 0,25µM de partidore MseI-CAX, 0,15µM de partidore EcoRI-ACX marcado, 0,9U de polimerasa Taq (Invitrogen) y 5µL de producto de la PCR preselectiva, diluido 25 veces. El perfil térmico de esta reacción fue: 94°C por 2min, seguido por 12 ciclos de 94°C por 45s, 65 hasta 57°C por 45s (disminuyendo en un grado cada ciclo) y 72°C por 2min, seguidos por 23 ciclos de 94°C por 45s, 56°C por 45s y 72°C por 2min, y finalmente una etapa de extensión a 72°C por 5min.

Para optimizar los costos de genotipificación se escogieron ocho combinaciones de partidores, dos por cada uno de los fluoróforos: MseI-CAC/6FAM-EcoRI-ACT, MseI-CAT/6FAM-EcoRI-ACT, MseI-CAA/VIC-EcoRI-ACC, MseI-CAG/VIC-EcoRI-ACC, MseI-CAG/NED-EcoRI-ACG, MseI-CAT/NED-EcoRI-ACG, MseI-CAC/PET-EcoRI-ACA y MseI-CAT/PET-EcoRI-ACA. La genotipificación se realizó mezclando cuatro de los productos fluorescentes de las PCRs selectivas (en una proporción 1:1:1:2,

6FAM:VIC:NED:PET), mezcla que fue separada por electroforesis capilar en un equipo ABI3730XL con un filtro G5.

#### *Análisis filogeográfico de las secuencias*

Las secuencias mitocondriales fueron editadas con BioEdit v7.0.7 (Hall 1999). Inicialmente, se realizó un alineamiento con ClustalX v2.0.12 (Larkin et al. 2007) con las primeras secuencias de *Rhinella atacamensis* y *R. arunco* obtenidas, al cual se agregó el resto de las secuencias manualmente. Los haplotipos fueron generados con el programa DnaSP v5.10.01 (Librado y Rozas 2009), incluyendo aquellos producidos por los “indels”. Un análisis filogenético preliminar con el método de máxima parsimonia, incluyendo algunas de las secuencias más divergentes de ambas especies no mostró resolución a nivel intraespecífico, por lo que se decidió descartar este tipo de aproximación para este estudio (datos no mostrados). Por lo tanto, para visualizar las relaciones filogenéticas intra e interespecíficas entre los haplotipos se construyó una red de haplotipos con el método “median-joining” utilizando el programa Network v4.5.1.6 (Bandelt et al. 1999).

#### *Análisis de los AFLPs*

Los electroferogramas de los AFLPs fueron visualizados y procesados con el programa GeneMarker v1.85 (SoftGenetics) manteniendo la mayor parte de las opciones por defecto y aplicando un proceso de normalización. Las bandas fueron codificadas con ayuda de un panel construido con algunas muestras representativas de *Rhinella atacamensis* y *R. arunco*, el cual permite definir las ubicaciones en pares de bases donde

se encuentran las bandas ("bins") y, al ser aplicado, reconocerlas automáticamente. Debido a que la aplicación del panel y las opciones por defecto del programa no permitieron reconocer algunas bandas intensas y claramente definidas como tales, se revisaron todos los perfiles de fluorescencia y se codificaron manualmente las bandas omitidas. En este último proceso solo se reconocieron como bandas las señales con una intensidad sobre 200 unidades de fluorescencia, siempre y cuando este valor fuera superior a la oscilación de fondo (ruido). Para minimizar la subjetividad de este procedimiento la codificación se restringió a aquellas bandas que presentaran una señal intensa y que fueran claramente distinguibles de señales próximas y del ruido. Además, este análisis se restringió a las bandas de bajo tamaño, en general entre 70 y 300 pares de bases dependiendo de la combinación de partidores. Con esto se obtuvo una matriz de presencia (1) y ausencia (0) de bandas para cada uno de los "bins" definidos con cada fluoróforo. Cada "bin" es un marcador AFLP que se considera, para los análisis genéticos, como un locus que segrega independientemente.

La presencia de híbridos en el estero Pupío fue investigada con el programa NewHybrids (Anderson y Thompson 2002, Anderson 2008). Este programa utiliza un método bayesiano para calcular la probabilidad de que cada individuo de una muestra pertenezca a una o más categorías predefinidas de híbridos o a las especies parentales. En este caso se especificaron seis categorías: *R. atacamensis* puro, *R. arunco* puro, híbrido de primera generación (F1), híbrido de segunda generación (F2), retrocruce entre F1 y *R. atacamensis*, y retrocruce entre F1 y *R. arunco*. En el análisis se utilizaron 158 ejemplares en total, 103 de *R. atacamensis* (siete localidades, incluyendo Caimanes), 31 de *R. arunco* (cinco localidades) y 24 de las dos localidades del estero Pupío donde se

sospechaba la presencia de híbridos entre esas dos especies. Se realizaron dos análisis distintos con varias réplicas para cada uno para ver la consistencia de los resultados. En uno de estos análisis se incorporó el estatus específico como información adicional para los ejemplares de las localidades claramente establecidas de cada especie, excepto para los de Caimanes, localidad que se ubica en la parte alta del estero Pupío. La longitud de las cadenas para todos los análisis fue de 100000 iteraciones, siendo las 10000 primeras descartadas como “burnin”. Adicionalmente, se buscaron marcadores diagnósticos para cada especie, es decir aquellos marcadores en que la banda está presente en el 100% de los ejemplares incluidos de cada una. Para la búsqueda de estos marcadores se excluyó la localidad de Caimanes.

#### *Observaciones reproductivas y fenotípicas*

Debido a la observación inicial de la alta variación de los patrones de color en juveniles de Puente Pupío y la dificultad de identificarlos a nivel específico, en este estudio se exploró la relación entre el fenotipo y el genotipo de los ejemplares capturados en el estero Pupío. Para ello se clasificó cada ejemplar en una de tres categorías, *R. atacamensis*, *R. arunco* e intermedio, considerando el color de fondo y el patrón de manchas del dorso, la presencia de manchas rojizas (características de *R. atacamensis*), y la textura de la piel. La elección de las características consideradas se basó en las descripciones de Cei (1962) y observaciones de los autores para ambas especies. Cei (1962) describió el marcado dimorfismo sexual en la coloración de *R. atacamensis* de las poblaciones de Copiapó y Vallenar (27°20'-28°35'S): las hembras tienen el color dorsal blanquecino o grisáceo con manchas negruzcas grandes bien

definidas en el dorso, casi siempre unidas, mientras que los machos son amarillentos con manchas rojizas muy pequeñas distribuidas en el dorso y en los párpados, rara vez con manchas oscuras pequeñas y poco definidas en el dorso. Aunque no fueron descritas por Cei (1962), también hay diferencias en la textura de la piel entre los sexos: los machos tienen la piel muy lisa mientras que las hembras tienen cornificaciones muy pequeñas en la cabeza, el dorso y las extremidades.

En las poblaciones descubiertas posteriormente, situadas entre los 30 y 32°S, el dimorfismo sexual de color se mantiene, pero hay diferencias notables en el tamaño corporal (mucho mayor) y en los patrones de manchas con respecto a las poblaciones norteñas. En los machos aparecen manchas dorsales bien definidas de color negruzco, verdoso o café oscuro y en ambos sexos éstas son muy extensas y continuas, a veces cubriendo casi todo el dorso. El contraste de color entre las manchas y el fondo es muy marcado en ambos sexos. El color de fondo de los machos varía de amarillo a café oscuro y algunas hembras presentan pequeñas manchas rojizas como los machos. En *R. arunco* no existe el dimorfismo sexual en los patrones de coloración. El color de fondo del dorso puede variar desde el grisáceo claro al café oscuro en ambos sexos. Las manchas dorsales oscuras son más pequeñas, numerosas e irregulares que en *R. atacamensis*, y casi siempre forman reticulaciones. La piel tiene una textura más glandular y cornificaciones muy pequeñas en ambos sexos, aunque éstas son menos numerosas en los machos.

Ya que uno de los objetivos de este estudio fue establecer si en el estero Pupío se está produciendo hibridación y con que frecuencia, una de las prioridades del muestreo fue obtener datos genéticos de parejas que se estuvieran reproduciendo. Entre 2007 y

2009 se capturaron nueve parejas en amplexo en dos sitios del estero, Puente Pupío y Pupío Medio. Cuatro de las nueve parejas estaban poniendo huevos al momento de la captura y otras tres los pusieron posteriormente en los contenedores donde se mantuvieron después de que se capturaron (Tabla 5.3). Para examinar si estos huevos se desarrollaban normalmente, se tomaron alrededor de 200 huevos de cuatro de estas puestas que fueron mantenidos a 25°C hasta que los últimos sobrevivientes alcanzaron la metamorfosis.

#### 5.4. Resultados

##### *Análisis filogeográfico de las secuencias mitocondriales*

Se obtuvo un alineamiento de 905 sitios nucleotídicos, 10 de ellos con “gaps”. La red de haplotipos muestra dos grupos altamente divergentes que pueden ser asociados a *Rhinella atacamensis* y *R. arunco* (Figura 5.2). El grupo asociado a *R. atacamensis* está compuesto por 42 haplotipos (136 secuencias) mientras que el de *R. arunco* está formado por 20 haplotipos (55 secuencias). La divergencia entre estos grupos, 72 pasos mutacionales, es mucho mayor a la máxima divergencia observada entre los haplotipos de cada grupo, 19 pasos en el grupo correspondiente a *R. atacamensis* y 18 en el de *R. arunco*. Los haplotipos de los ejemplares de la zona de hibridación del estero Pupío, Puente Pupío y Pupío Medio, se distribuyen en ambos grupos, pero la mayoría forma parte del grupo de *R. arunco* (Figura 5.2, Tabla 5.2). Se puede apreciar que la distribución de estos haplotipos es distinta dentro de cada grupo: en el de *R. atacamensis* se distribuyen por toda la red, mientras que en el de *R. arunco* se concentran junto con otros provenientes de localidades de la zona norte de la distribución de esta especie. Sin

embargo, hay que considerar que el número de muestras y la cobertura geográfica son menores para esta última especie.

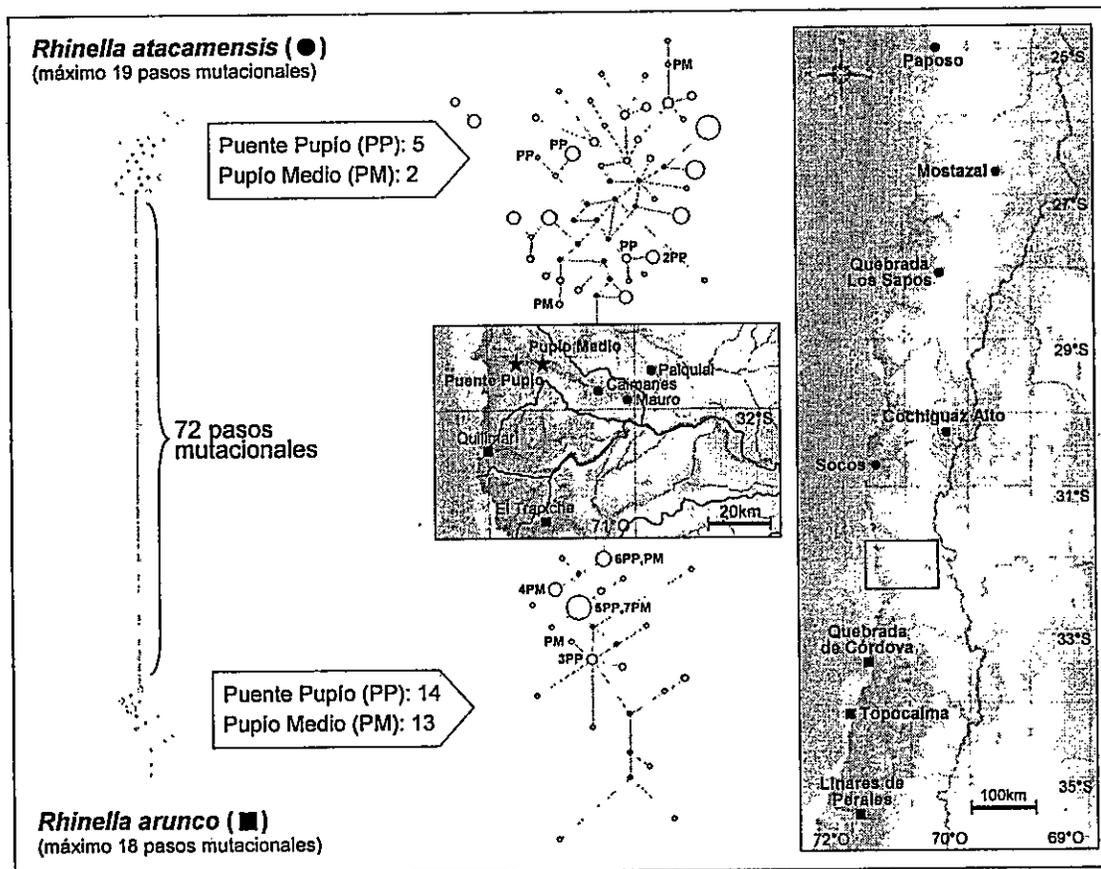


Figura 5.2.- Divergencia genética mitocondrial entre los ejemplares de *Rhinella atacamensis*, *R. arunco* e híbridos de las 15 localidades incluidas en este estudio (Tabla 5.1). Las localidades son simbolizadas con círculos (*R. atacamensis*), cuadrados (*R. arunco*) y estrellas (sitios de estudio en la zona híbrida). La red de haplotipos de la izquierda muestra la alta divergencia mitocondrial, medida como pasos mutacionales, que hay entre ambas especies, la cual excede considerablemente la divergencia intraespecífica. Las ampliaciones de la red muestran las relaciones filogenéticas entre los haplotipos encontrados en las localidades de Puente Pupío y Pupío Medio, que pertenecen a ejemplares identificados como *R. arunco* o varios tipos de híbridos (ver Tabla 5.3). Junto a las redes se indica el número de ejemplares con haplotipos de cada especie encontrados en esas dos localidades.

### Análisis de los AFLPs

Se codificaron 197 bandas en total, obtenidas con cinco combinaciones de partidores (Figura 5.3). Las otras tres combinaciones consideradas inicialmente fueron excluidas por producir pocas bandas informativas y/o perfiles de baja calidad, que no pudieron ser codificados para algunas muestras. De las 197 bandas, 148 fueron variables. Los análisis con NewHybrids, realizados con las 148 bandas variables, permitieron detectar distintos tipos de híbridos entre *Rhinella atacamensis* y *R. arunco*, que conviven con individuos de *R. arunco* en las localidades de Puente Pupío y Pupío Medio (Tabla 5.2, Figura 5.4).

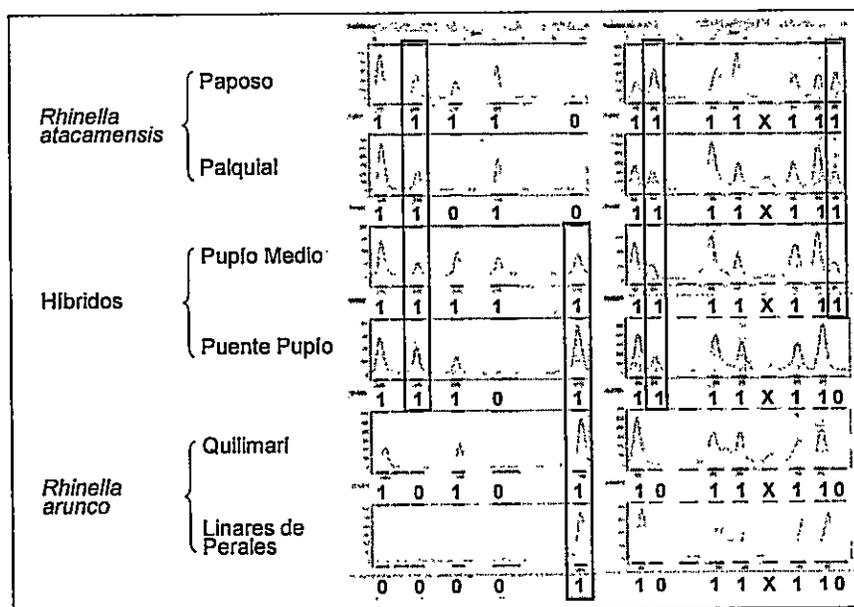


Figura 5.3.- Ejemplo de codificación de marcadores AFLP en ejemplares representativos de *Rhinella atacamensis*, *R. arunco* y de la zona de hibridación, de varias localidades. Se muestra parte de los electroferogramas obtenidos con dos pares diferentes de partidores, uno de cada par marcado con el fluoróforo 6FAM, y la codificación respectiva de presencia (1) y ausencia (0) bajo cada banda. En los recuadros verticales se destacan cuatro bandas diagnósticas (i.e. presentes en 100% de los ejemplares de una especie y totalmente ausente en la otra), tres de *R. atacamensis* y una de *R. arunco*. También se muestra un ejemplo de una banda excluida del estudio por su mala calidad (marcada con una X).

Ejemplar	Localidad	aru	ata	F1	F2	Rx aru	Rx ata
Macho p7	Puente Pupío	<b>0,99999</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00001	0,00000
Hembra p7	Puente Pupío	0,00000	0,00000	<b>0,72247</b>	0,01417	0,26336	0,00000
Macho p8	Puente Pupío	0,00000	0,00000	0,00000	0,00001	<b>0,99999</b>	0,00000
Hembra p8	Puente Pupío	<b>0,98444</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,01556	0,00000
Macho p9	Puente Pupío	<b>0,88407</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,11593	0,00000
Hembra p9	Puente Pupío	0,00000	0,00000	0,00000	0,00106	<b>0,99894</b>	0,00000
Macho 13	Puente Pupío	<b>0,99038</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00962	0,00000
Macho 14	Puente Pupío	<b>0,92394</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,07606	0,00000
Macho 15	Puente Pupío	<b>1,00000</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Macho p1	Pupío Medio	0,15282	0,00000	0,00000	0,00000	<b>0,84718</b>	0,00000
Hembra p1	Pupío Medio	0,00000	0,00000	<b>0,99956</b>	0,00044	0,00000	0,00000
Macho p2	Pupío Medio	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	<b>1,00000</b>	0,00000
Hembra p2	Pupío Medio	<b>0,93959</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,06041	0,00000
Macho p3	Pupío Medio	0,00000	0,00000	0,00005	<b>0,56223</b>	0,43772	0,00000
Hembra p3	Pupío Medio	0,00000	0,00000	0,04285	0,04464	<b>0,91251</b>	0,00000
Macho p4	Pupío Medio	<b>1,00000</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Hembra p4	Pupío Medio	0,00017	0,00000	0,00000	0,00000	<b>0,99983</b>	0,00000
Macho 10	Pupío Medio	<b>1,00000</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Macho 11	Pupío Medio	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	<b>1,00000</b>	0,00000
Macho p5	Pupío Medio	0,00000	0,00000	<b>0,99030</b>	0,00928	0,00000	0,00042
Hembra p5	Pupío Medio	0,00320	0,00000	0,00000	0,00000	<b>0,99680</b>	0,00000
Macho p6	Pupío Medio	<b>0,99722</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00278	0,00000
Hembra p6	Pupío Medio	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	<b>1,00000</b>	0,00000
Macho 12	Pupío Medio	<b>0,99996</b>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00004	0,00000
Hembra 10	Caimanes	0,00000	0,01460	0,00000	0,00008	0,00000	<b>0,98531</b>

Tabla 5.2.- Probabilidades de asignación a distintas categorías de híbridos obtenidas con el programa NewHybrids para 25 ejemplares de tres localidades del estero Pupío. Se incluyen las nueve parejas capturadas en amplexo (indicadas con una p antes del número) y el único ejemplar de Caimanes que no es *R. atacamensis* puro según este análisis. Las seis categorías son (entre paréntesis se indica la abreviación): *R. arunco* puro (aru), *R. atacamensis* puro (ata), híbrido de primera generación (F1), híbrido de segunda generación (F2), retrocruce de F1 con un individuo de *R. arunco* (Rx aru) y retrocruce de F1 con un individuo de *R. atacamensis* (Rx ata). Los valores de probabilidad de todas las categorías suman 1 para cada ejemplar (el mayor es resaltado en negrilla). Estos resultados son mostrados gráficamente en la Figura 5.4.

La mayor parte de los ejemplares de ambas localidades fueron identificados como *R. arunco* puros o retrocruces entre híbridos F1 y esta especie (Figura 5.2). Tres ejemplares, dos de Pupío Medio y uno de Puente Pupío, fueron catalogados como

híbridos F1, y solo uno fue identificado como F2, pero con baja probabilidad. No se detectaron ejemplares puros de *R. atacamensis* o retrocruces de híbridos F1 con esta especie en esas dos localidades. Todos los ejemplares de las otras localidades de cada especie fueron catalogados correctamente como representantes puros de sus respectivas especies (Figura 5.4). Notablemente, la presencia de un ejemplar identificado como retrocruce de un F1 con *R. atacamensis* en la localidad de Caimanes (Tabla 5.2), indica que ha habido cierto nivel de introgresión de *R. arunco* en las poblaciones de *R. atacamensis* de la parte alta del estero Pupío.

No hubo diferencias entre las asignaciones obtenidas con los análisis que incorporaron o no la información del estatus específico de las localidades representativas de cada especie. Se encontraron 18 marcadores diagnósticos, ocho fijos en *R. atacamensis* (en 95 ejemplares de seis localidades) y 10 en *R. arunco* (en 31 ejemplares de cinco localidades). Los marcadores por combinación de partidores son (entre paréntesis se indica el tamaño en pares de bases y en que especie están fijos): siete con MseI-CAC/6FAM-EcoRI-ACT (96, 140, 222, 308 y 309, *R. arunco*; 129 y 299, *R. atacamensis*), cuatro con MseI-CAT/6FAM-EcoRI-ACT (254, *R. arunco*; 84, 96 y 197, *R. atacamensis*), tres con MseI-CAA/VIC-EcoRI-ACC (77, *R. arunco*; 143 y 325, *R. atacamensis*), uno con MseI-CAG/NED-EcoRI-ACG (170, *R. atacamensis*) y tres con MseI-CAT/NED-EcoRI-ACG (81, 133 y 154, *R. arunco*).

La presencia simultánea de marcadores diagnósticos de ambas especies en la mayoría de los ejemplares de Puente Pupío y Pupío Medio demuestra que hay distintos tipos de híbridos en esas localidades, ratificando los resultados de los análisis con NewHybrids. La proporción de estos marcadores está altamente correlacionada con las

categorías asignadas para cada ejemplar por NewHybrids (Tabla 5.3). Este resultado es consistente con las frecuencias relativas de haplotipos mitocondriales observadas en esas dos localidades (Figura 5.2).

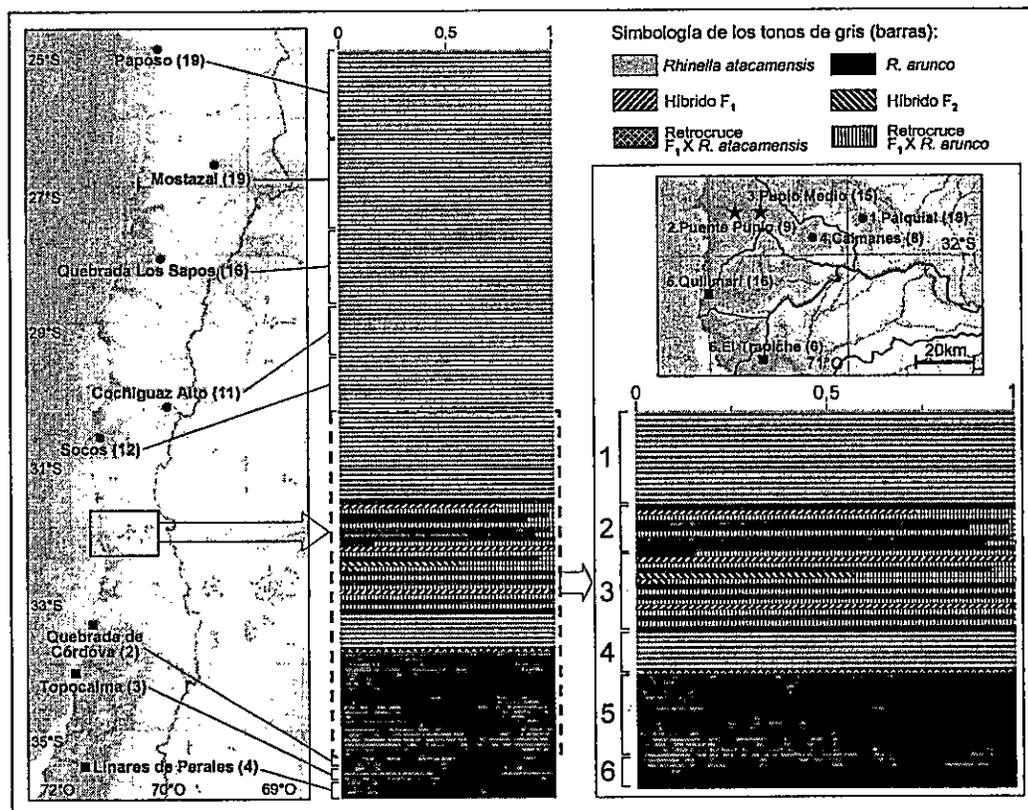


Figura 5.4.- Probabilidades de asignación de todos los ejemplares de *Rhinella* de los cuales se obtuvieron AFLPs ( $n = 158$ , 14 localidades) según las seis categorías especificadas en el análisis con el programa NewHybrids: *R. atacamensis* puro, *R. arunco* puro, híbrido de primera generación ( $F_1$ ) entre estas dos especies, híbridos de segunda generación,  $F_2$  (descendientes de un cruce entre dos individuos  $F_1$ ), y retrocruces de  $F_1$  con individuos puros de alguna de las dos especies. Cada ejemplar es representado por una barra horizontal, las cuales son ordenadas por localidad de norte a sur. Los tonos de gris o diseños achurados que llenan las barras son proporcionales a la probabilidad de que cada ejemplar pertenezca a una de las seis categorías definidas en el análisis (ver escala sobre las barras). Las barras encerradas en el rectángulo de líneas segmentadas corresponden a los ejemplares de las localidades de la zona híbrida y sus alrededores (recuadro dentro del mapa de la izquierda), las cuales son especificadas por un número en el mapa de la derecha. En ambos mapas los números entre paréntesis después del nombre de la localidad indican el número de ejemplares utilizados en este estudio para cada una de ellas.

*Observaciones reproductivas y fenotípicas*

La mayoría de los ejemplares adultos capturados en época de reproducción en Puente Pupío y Pupío Medio tienen un patrón de coloración asignable a *R. arunco* (Tabla 5.3). Tres ejemplares, dos machos y una hembra, fueron clasificados como intermedios. Los machos se asignaron a esta categoría principalmente por el color de fondo del dorso y la hembra por presentar pequeñas manchas rojizas en las cejas y el dorso. Otros tres ejemplares, dos hembras y un macho, presentan patrones de coloración típicos de *R. atacamensis*. Una de estas hembras, p9, tiene el patrón de coloración dorsal de los individuos de poblaciones más norteñas como Cochiguaz Alto y Quebrada Los Sapos. Por último, un ejemplar de Puente Pupío, Macho 15, fue clasificado como aberrante porque se desvía notablemente de los patrones de coloración de ambas especies. En vida tenía un color negruzco uniforme con extensas manchas cremosas ligeramente rosáceas que cubrían casi totalmente la cabeza y los bordes internos de las extremidades. Además, tenía el cuerpo relativamente más largo que los otros machos capturados en el mismo sitio y la glándula parótida derecha atrofiada. Otras características, como por ejemplo el comportamiento en general, el canto de liberación y las callosidades nupciales en el interior de los dedos de la mano, parecían normales.

En la Tabla 5.3 se especifican las cuatro parejas progenitoras de los huevos criados en cautiverio. En general, hubo una sobrevivencia muy baja de estos individuos, los cuales en su mayoría no superaron las etapas tempranas de desarrollo larvario. Solo entre dos y cuatro individuos por pareja lograron completar la metamorfosis, alcanzando un tamaño pequeño, no superior a los 11 mm, que es normal en estas condiciones de crianza (C. Correa, observación personal). Estos individuos, además, presentaron

patrones de coloración muy similares a los de postmetamórficos observados en terreno. Ninguna de las larvas ni los ejemplares metamorfoseados presentaron anomalías en la morfología externa.

#### *Correspondencia entre los fenotipos y genotipos*

En general se observó una fuerte asociación entre los fenotipos y genotipos de los ejemplares de Puente Pupío y Pupio Medio (Tabla 5.3). Por ejemplo, la mayoría de los *R. arunco* puros identificados con NewHybrids presentan fenotipo y haplotipo de esta especie. Además, estos ejemplares son los que poseen las mayores proporciones de los marcadores diagnósticos respectivos. Inversamente, la mayor parte de los ejemplares clasificados fenotípicamente como *R. atacamensis* o intermedio tienen la menor proporción de marcadores diagnósticos de *R. arunco*, incluyendo los dos de Pupío Medio clasificados con alta probabilidad como híbridos F1 (Hembra p1 y Macho p5). Sin embargo, los haplotipos de *R. atacamensis* pueden encontrarse en ejemplares con distintas proporciones de marcadores de *R. arunco*, incluyendo el Macho 15, de fenotipo aberrante, que posee un 100% de marcadores de esta última especie. Finalmente, es necesario destacar que todas las parejas en que se registró la puesta de huevos, ya sea en terreno o en cautiverio, estaban formadas por individuos que fueron clasificados en distintas categorías por NewHybrids (muchas veces con proporciones dispares de marcadores), dos de las cuales poseían haplotipos de ambas especies (Tabla 5.3).

Ejemplar	Localidad	Fenotipo	Haplotipo mitocondrial	Categoría NewHybrids	Marcadores <i>arunco</i> (%)	Reproducción
Macho p7	Puente Pupío	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	aru	94,4	huevos en terreno
Hembra p7	Puente Pupío	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	F1	72,2	huevos en terreno
Macho p8	Puente Pupío	intermedio	<i>arunco</i>	Rx aru	61,1	huevos en terreno
Hembra p8	Puente Pupío	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	aru	88,9	huevos en terreno
Macho p9	Puente Pupío	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	aru	94,4	huevos en terreno
Hembra p9	Puente Pupío	<i>atacamensis</i>	<i>atacamensis</i>	Rx aru	61,1	huevos en terreno
Macho 13	Puente Pupío	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	aru	88,9	solitario
Macho 14	Puente Pupío	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	aru	88,9	solitario
Macho 15	Puente Pupío	aberrante	<i>atacamensis</i>	aru	100,0	solitario
Macho p1	Pupío Medio	intermedio	<i>arunco</i>	Rx aru	83,3	huevos en cautiverio*
Hembra p1	Pupío Medio	<i>atacamensis</i>	<i>atacamensis</i>	F1	50,0	huevos en cautiverio*
Macho p2	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	Rx aru	83,3	sin huevos
Hembra p2	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>atacamensis</i>	aru	94,4	sin huevos
Macho p3	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	F2	72,2	huevos en cautiverio*
Hembra p3	Pupío Medio	intermedio	<i>arunco</i>	Rx aru	66,7	huevos en cautiverio*
Macho p4	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	aru	100,0	huevos en cautiverio*
Hembra p4	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	Rx aru	88,9	huevos en cautiverio*
Macho 10	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	aru	100,0	solitario
Macho 11	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	Rx aru	83,3	solitario
Macho p5	Pupío Medio	<i>atacamensis</i>	<i>arunco</i>	F1	55,6	huevos en terreno*
Hembra p5	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	Rx aru	77,8	huevos en terreno*
Macho p6	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	aru	100,0	sin huevos
Hembra p6	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	Rx aru	77,8	sin huevos
Macho 12	Pupío Medio	<i>arunco</i>	<i>arunco</i>	aru	100,0	solitario
Hembra 10	Caimanes	<i>atacamensis</i>	<i>atacamensis</i>	Rx ata	11,1	solitario

Tabla 5.3.- Información fenotípica, genotípica y reproductiva de 25 ejemplares de *Rhinella* capturados en época de reproducción en tres localidades del estero Pupío. Se incluyen las nueve parejas capturadas en amplexo (indicadas con una p antes del número). El resto de los ejemplares fueron capturados mientras estaban solos, en los mismos lugares donde se encontraron las parejas. También se incluyó el único ejemplar de Caimanes que no es *R. atacamensis* puro según los marcadores AFLP. El fenotipo se refiere al patrón de coloración característico de cada especie (ver detalles en el texto). Las abreviaciones de las categorías especificadas en NewHybrids son las mismas que aparecen en la Tabla 5.2. Las categorías asignadas con una probabilidad mayor a 0,95 se indican en negrilla. La columna Marcadores *arunco* muestra el porcentaje de marcadores diagnósticos de esta especie presentes en cada ejemplar. La columna reproducción especifica si las parejas en amplexo estaban poniendo huevos o no en el momento de la captura. Tres de estas parejas pusieron huevos posteriormente en los contenedores donde fueron mantenidos durante el transporte al laboratorio. El asterisco indica que algunos de los huevos fueron criados hasta completar la metamorfosis.

### 5.5. Discusión

La integración de la información fenotípica, genotípica y reproductiva generada en este estudio, permitió distinguir entre los tres escenarios planteados inicialmente para explicar la presencia de haplotipos de las especies hermanas *Rhinella atacamensis* y *R. arunco* en dos localidades del estero Pupío, ubicado en el límite de sus rangos de distribución. Este enfoque integral proveyó evidencia de que la hibridación entre estas dos especies ha sido frecuente en esa zona del estero, lo cual permite descartar la introgresión y la coexistencia de las dos especies sin mezclarse, como explicaciones para la mezcla de haplotipos observada. Sin embargo, la composición genética de estas poblaciones híbridas es el resultado de una contribución desigual en que predominan los individuos con fenotipo y una alta proporción de marcadores moleculares de *R. arunco*. La detección de un bajo nivel de introgresión de marcadores nucleares de *R. arunco* en Caimanes, una población en que hasta ahora se han observado solo individuos con fenotipo y genotipo mitocondrial de *R. atacamensis*, indica que la zona de hibridación es relativamente extensa y que habría una segregación espacial de las dos especies a lo largo del estero.

Este es la primera zona híbrida descrita entre las especies de anfibios que habitan en Chile. Hay un solo registro previo de un ejemplar híbrido para el género *Rhinella* en Chile (Mezey 1979). Se trata de un macho adulto híbrido entre *R. arunco* y *R. spinulosa* (descrito como *Bufo chilensis* x *B. spinulosus*) encontrado en una localidad precordillerana del Cajón del Maipo (33°47'S), cuyo estatus fue determinado a partir de una combinación de datos morfológicos, cromosómicos e histológicos. Este espécimen presentaba algunas características morfológicas intermedias y un cariotipo en que se

combinaban las constricciones secundarias de ambas especies, ubicadas en pares cromosómicos distintos. Un análisis histológico de sus gónadas reveló alteraciones en la espermiogénesis por lo que se trataría probablemente de un individuo infértil (Mezey 1979). El hecho de que hasta ahora no se hayan registrado otros casos de híbridos naturales entre las especies de *Rhinella* que habitan en Chile, sugiere que la hibridación es un fenómeno raro, pero que es posible cuando hay contacto entre ellas, como es el caso de *R. arunco* y *R. spinulosa* en la precordillera de Chile central, cuyas distribuciones son parapatricas (Veloso 2006), y de *R. atacamensis* y *R. arunco* alrededor de los 32°S, como se reveló en este estudio. Hay que destacar que este descubrimiento se debió a una exhaustiva exploración de la zona limítrofe entre *R. atacamensis* y *R. arunco* por lo que es posible que existan zonas híbridas entre otras especies de *Rhinella* cuyos límites no están muy claros, por ejemplo, entre *R. arunco* y *R. rubropunctata*, y entre estas dos especies y *R. spinulosa* en el centro-sur de Chile (Ceï 1962).

Mezey (1979) combinó evidencia morfológica y cromosómica con experimentos de cruzamientos para establecer las relaciones evolutivas entre cuatro especies de *Rhinella* (como *Bufo*) de Chile y Argentina: *R. arenarum* del grupo *marinus*, y *R. arunco* (= *Bufo chilensis*), *R. atacamensis* y *R. spinulosus* del grupo *spinulosus* (Mezey 1979). La evidencia combinada fue consistente con la pertenencia de esas especies a los dos grupos y ratificó una estrecha relación entre *R. atacamensis* y *R. arunco*, la cual había sido establecida previamente con técnicas inmunológicas (Ceï 1971). Las relaciones filogenéticas entre las tres especies del grupo *spinulosus* han sido ratificadas posteriormente por estudios filogenéticos moleculares (Méndez 2000, Pramuk 2006).

Los experimentos de cruzamientos de Mezey (1979) son los únicos antecedentes de hibridación artificial entre esas especies, los cuales, en términos generales, corroboran las relaciones inferidas entre ellas. Hay que señalar que en todos los cruzamientos interespecíficos un porcentaje significativo de huevos se desarrolló hasta la metamorfosis normalmente, excepto en los cruzamientos entre *R. arenarum* y *R. atacamensis*, los cuales produjeron híbridos malformados. Como señala Mezey (1979), estos resultados indican que la compatibilidad genética entre estas especies es alta, pero hay que considerar que los patrones de distribución y mecanismos de aislamiento reproductivo precigótico pueden impedir que estas especies hibriden en forma natural. Estos resultados no son inesperados ya que estudios comparativos de aislamiento reproductivo en bufónidos y otros anfibios, muestran que aunque los niveles de aislamiento postcigótico intrínsecos aumentan con la divergencia genética, se necesitan niveles relativamente altos de divergencia para que el aislamiento reproductivo sea completo (Sasa et al. 1998, Malone y Fontenot 2008). La potencial ausencia de mecanismos de aislamiento precigóticos en especies no directamente relacionadas es un argumento adicional que sugiere que podría haber otras zonas híbridas entre las poblaciones de *Rhinella* de Chile.

El descubrimiento de que *R. atacamensis* y *R. arunco* hibridizan y que aparentemente hay una segregación espacial entre ellas en la cuenca del estero Pupío genera muchas interrogantes acerca de sus relaciones evolutivas y biogeográficas. Por ejemplo, ¿esta zona de hibridación corresponde a un “enjambre” híbrido o a una zona de tensión (Barton y Hewitt 1985)? La diferencia entre estos dos escenarios radica esencialmente en la adecuación biológica de los híbridos. En el primer caso, si los

híbridos logran sobrevivir y reproducirse, la población estará formada casi totalmente por individuos con distintas proporciones de los genomas parentales. El segundo escenario implica que los híbridos son seleccionados en contra y que se generan en bajo número por la reproducción de nuevos individuos de las especies parentales que llegan a la zona de hibridación por dispersión. La composición genética y la limitada evidencia reproductiva disponible favorecerían el primer escenario para el estero Pupío, pero la presencia de un número significativo de individuos de *R. arunco* en las dos localidades estudiadas indica que podría tratarse de una situación intermedia. Por esta razón, hacen falta estudios de biología reproductiva, de dispersión y de adecuación biológica de las especies involucradas y de los híbridos para evaluar explícitamente cuál de estas posibilidades representa mejor la naturaleza de esta zona híbrida.

¿A qué se debe la aparente segregación de las especies parentales a lo largo del estero? Aunque aún no está claro si en el estero existen poblaciones completamente puras de *R. arunco* o *R. atacamensis*, los datos sugieren que estas especies han quedado relegadas a sus extremos opuestos. Este patrón es difícil de explicar considerando que se ha descrito a ambas especies presentes a lo largo de toda la extensión de los sistemas hídricos que componen sus respectivos rangos de distribución. Si hay alguna barrera geográfica y/o ecológica actual que separe a estas especies a lo largo del estero, éstas no son evidentes. La otra posibilidad es que una de estas especies haya colonizado y desplazado a la otra en algún sector de la cuenca del estero Pupío.

En un contexto biogeográfico más amplio, ¿la zona de hibridación entre estas dos especies está limitada solo a la zona media del estero Pupío? Previamente se consideró que las dos especies tenían una distribución alopatrica y que el límite entre ellas se

encontraba alrededor de los 32°S (Correa et al. 2008, Capítulo 2). Sin embargo, el límite entre ambas especies parece ser más complejo y extenso de lo que se asumía. Datos de secuencias mitocondriales indican que poblaciones de ambas especies podrían estar presentes, con el mismo patrón de segregación altitudinal a lo largo de los sistemas hídricos, en cuencas hidrográficas ubicadas al norte (río Choapa) y sur (hasta el río Aconcagua, Figura 5.1) de la zona de hibridación descrita aquí (Correa et al., datos no publicados). Esto sugiere que la zona caracterizada en este estudio representa una fracción mínima de una extensa zona de hibridación que cruza distintos sistemas hídricos en sentido norte-sur. Si este escenario es correcto, los marcadores diagnósticos generados en este estudio pueden utilizarse como una primera aproximación para detectar la ubicación de otras zonas de hibridación. Como se desprende de la discusión precedente, el descubrimiento de esta zona de contacto entre *R. atacamensis* y *R. arunco* genera una serie de interrogantes acerca de su origen y persistencia que deben plantearse a distintas escalas espaciales y temporales. Para responderlas es necesario generar información distribucional, biogeográfica, genética y ecológica adicional que permita esclarecer los procesos evolutivos y ecológicos que han generado y mantenido esta zona de hibridación.

## 5.6. Referencias

- Anderson, E. C. 2008. Bayesian inference of species hybrids using multilocus dominant genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 2841-2850.
- Anderson, E. C. y E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217-1229.

- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA. 684 pp.
- Bandelt, H.-J., P. Forster y A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Barton, N. H., y G. M. Hewitt. 1985. Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 113-148.
- Bonin, A., D. Ehrich y S. Manel. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* 16(18): 3737-3758.
- Burke, J. M. y M. L. Arnold. 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics* 35: 31-52.
- Cei, J. M. 1962. *Batracios de Chile*. Ediciones Universidad de Chile, Santiago, Chile. 128 + cviii pp.
- Cei, J. M. 1971. Análisis sero-inmunológico de diferentes niveles de especiación en *Bufo* del grupo *spinulosus*. *Acta Zoológica Lilloana* 28: 91-105.
- Cei, J. M. 1972. *Bufo* of South America. En: *Evolution in the genus Bufo*, pp. 82-92. Blair, W. F., Ed., Austin, University of Texas Press.
- Correa, C., M. Sallaberry, P. Jara-Arancio, G. Lobos, E. R. Soto y M. A. Méndez. 2008. Amphibia, Anura, Bufonidae, *Rhinella atacamensis*: Altitudinal distribution extention, new records and geographic distribution map. *Check List* 4(4): 478-484.
- Coyne, J. y H. A. Orr. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Xiii + 545 pp.
- Goebel, A. M., J. M. Donnelly y M. E. Atz. 1999. PCR Primers and Amplification Methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome *b* in Bufonids and Others Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 163-199.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Versión 5.0.9, 2001. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Jowett, T. 1986. Preparation of nucleic acids. En: *Drosophila: a Practical Approach*, pp. 275-286. Roberts, D. B., Ed., Oxford, IRL Press.

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson y D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Mallet, J. 2007. Hybrid speciation. *Nature* 446: 279-283.

Malone, J. H. y B. E. Fontenot. 2008. Patterns of Reproductive Isolation in Toads. *PLoS ONE* 3(12): e3900. doi:10.1371/journal.pone.0003900.

Méndez, M. A. 2000. Evolución del canto de liberación en las especies chilenas del grupo *spinulosus* (Amphibia: Bufonidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 125 pp.

Meudt, H. M. y A. C. Clarke. 2007. Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12(3): 106-117.

Mezey, A. 1979. Variabilidad de caracteres y compatibilidad genética en especies del grupo *spinulosus* (Amphibia - Anura). Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias con mención en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 98pp.

Minder, A. M., C. Rothenbuehler y A. Widmer. 2007. Genetic structure of hybrid zones between *Silene latifolia* and *Silene dioica* (Caryophyllaceae): evidence for introgressive hybridization. *Molecular Ecology* 16: 2504-2516.

Phillips, C. D., C. A. Henard y R. S. Pfau. 2007. Amplified fragment length polymorphism and mitochondrial DNA analyses reveal patterns of divergence and hybridization in the hispid cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *Journal of Mammalogy* 88(2): 351-359.

Pramuk, J. B. 2006. Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society* 146: 407-452.

Sallaberry, M., E. Soto, C. Correa y M. Méndez-Torres. 2007. Geographic distribution: *Bufo atacamensis*. *Herpetological Review* 38: 214.

Sasa, M. M., P. T. Chippindale y N. A. Johnson. 1998. Patterns of postzygotic isolation in frogs. *Evolution* 52: 1811-1820.

Schwenk, K., N. Brede y B. Streit. 2008. Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363(1505): 2805-2811.

Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution* 19(4): 198-207.

Soltis, P. S. y D. E. Soltis. 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology* 60: 561-588.

ten Cate, C., P. den Hartog y A. den Boer. Unidirectional hybridization and introgression in an avian contact zone: evidence from genetic markers, morphology and comparisons with laboratory-raised F1 hybrids. *The Auk*, accepted for publication. Posted online on March 5, 2010 (doi:10.1525/auk.2010.10002).

Veloso, A. 2006. Batracios de las cuencas hidrográficas de Chile: origen, diversidad y estado de conservación. En: *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*, pp. 103-140. Vila, I., A. Veloso, R. Schlatter y C. Ramírez, Eds., Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

Veloso, A. y J. Navarro. 1988. Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. *Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino* 6: 481-539.

Wu, C. A. y D. R. Campbell. 2005. Cytoplasmic and nuclear markers reveal contrasting patterns of spatial genetic structure in a natural *Ipomopsis* hybrid zone. *Molecular Ecology* 14: 781-792.

Young, W. P., C. O. Ostberg, P. K. y G. H. Thorgaard. 2001. Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*) and coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*). *Molecular Ecology* 10(4): 921-930.

## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

### 6.1. Preguntas abordadas en esta Tesis

La siguiente tabla resume las principales preguntas que se intentó responder en esta tesis. La primera forma parte de una revisión de la distribución de *Rhinella atacamensis* (Correa et al. 2008. Amphibia, Anura, Bufonidae, *Rhinella atacamensis*: Altitudinal distribution extension, new records and geographic distribution map. Check List 4(4): 478-484) donde se muestran los cambios en el rango de distribución y se describen nuevas localidades de esta especie. Las otras tres (Capítulos 3-5) corresponden a las hipótesis planteadas al inicio de este estudio (ver Capítulo 1).

Pregunta	Capítulo	Resultados
¿Cuáles son los límites de distribución de <i>Rhinella atacamensis</i> ?	2 (Correa et al. 2008)	El límite sur del rango de distribución de esta especie fue ampliado desde los 30° a los 32°S a partir del año 2002. Una intensa actividad de exploración realizada en el marco del presente estudio, permitió describir nuevas localidades para esta especie entre los 25° y 32°S, pero al parecer el límite sur se encuentra más allá de los 32°S (discutido en el Capítulo 5). El rango de distribución latitudinal fue extendido hasta los 2574m en la Región de Atacama.
¿La historia filogenética es el principal factor que explica la variación morfológica de <i>R. atacamensis</i> ? (Hipótesis 1)	3	Los resultados de las comparaciones de diferenciación genética y morfológica ( $P_{ST}-F_{ST}$ ) en seis poblaciones de esta especie sugieren que la selección natural y no la historia filogenética ha sido el principal factor que puede explicar su diferenciación fenotípica (rasgos morfométricos). Sin embargo, la selección habría actuado con distinta intensidad a lo largo de su distribución.

Pregunta	Capítulo	Resultados
¿La divergencia genética entre poblaciones es mayor en la zona norte del rango de distribución de <i>R. atacamensis</i> (Regiones de Antofagasta y Atacama) que en la zona sur (Región de Coquimbo)? (Hipótesis 2)	4	Los patrones de diferenciación encontrados con marcadores nucleares y mitocondriales muestran que la divergencia genética es mayor entre poblaciones y que la variación intrapoblacional es menor en el norte de la distribución (Regiones de Antofagasta y Atacama). Estos niveles de variación probablemente son producto del aislamiento de las poblaciones y la persistencia de las condiciones de aridez en esta región.
¿El extremo sur de la distribución de <i>R. atacamensis</i> corresponde a una zona de contacto con <i>R. arunco</i> donde existen formas morfológica y genéticamente intermedias entre estas dos especies debido a hibridación? (Hipótesis 3)	5	Fue posible identificar ejemplares híbridos en dos localidades del estero Pupío (32°S), algunos de los cuales fueron genéticamente y fenotípicamente (patrones de coloración) intermedios entre ambas especies.

## 6.2. Conclusiones

A continuación se indican los principales hallazgos de este estudio por capítulo.

**Capítulo 2:** Amphibia, Anura, Bufonidae, *Rhinella atacamensis*: Altitudinal distribution extension, new records and geographic distribution map. Correa et al. 2008. Check List 4(4): 478-484.

- El rango de distribución de *R. atacamensis* puede ser definido entre los 25 y 32°S, donde pueden encontrarse poblaciones en prácticamente todas las cuencas hidrográficas, desde el nivel del mar hasta los 2600m.
- Aunque el límite sur de distribución de esta especie se ha ampliado varias veces y constantemente se reportan nuevas localidades, los hábitats son menos extensos y escasean a medida que la aridez aumenta hacia el norte, por lo que la presión antrópica sobre los recursos hídricos o su destrucción directa constituyen una amenaza para la conservación de las poblaciones de esta zona.

**Capítulo 3:** Divergencia morfológica y genética entre poblaciones de *Rhinella atacamensis* (Anura, Bufonidae): estableciendo la contribución relativa de factores próximos e históricos (manuscrito en preparación).

- Hay un alto grado de variación geográfica en el tamaño corporal y caracteres morfométricos de la morfología externa de adultos de *Rhinella atacamensis*, de manera que estos rasgos no se sobreponen entre poblaciones de extremos opuestos de su distribución.
- Existe un aumento gradual de norte a sur en el tamaño corporal promedio de los adultos de las poblaciones de esta especie que es consistente con la regla ecogeográfica de Bergmann.

- Los valores de diferenciación fenotípica entre poblaciones,  $P_{ST}$ , no muestran un patrón de variación regular a lo largo de la distribución de *R. atacamensis*, a diferencia de la divergencia genética entre poblaciones, medida como  $F_{ST}$ , que aumenta gradualmente de sur a norte.

- Los valores dispares de  $P_{ST}$  y  $F_{ST}$  a través de la distribución de esta especie sugieren que los procesos que producen divergencia entre poblaciones, deriva génica y selección natural, han interactuado en forma distinta en diferentes partes de su distribución, y que la selección natural ha sido el proceso preponderante al producir la diferenciación morfométrica en adultos.

**Capítulo 4:** Efectos de la aridez en la estructura filogeográfica de *Rhinella atacamensis* (Anura, Bufonidae), un anfibio endémico de Chile (manuscrito en preparación).

- Las secuencias mitocondriales de la región control y los marcadores nucleares AFLP muestran patrones concordantes de variación genética intra e interpoblacional y revelan una escasa estructura filogeográfica para *R. atacamensis* en todo su rango de distribución.

- Los mayores niveles de variación intrapoblacional se encuentran en la zona sur de la distribución de esta especie (30-32°S), mientras que hacia el norte la variación interpoblacional va aumentando, patrón que es más claro con los marcadores AFLP.

- Hay señales de cuellos de botella en las poblaciones del extremo norte (25-28°S) que pueden atribuirse a las prolongadas condiciones de aridez.

- La mayoría de las poblaciones, particularmente las de la zona sur de la distribución (30-32°S), presentan niveles de divergencia en las secuencias mitocondriales equivalentes a los observados a nivel de toda la especie, lo cual se debe probablemente a retención de polimorfismos ancestrales.

**Capítulo 5:** Evidencia genética de hibridación natural entre las especies hermanas *Rhinella atacamensis* y *R. arunco* (Anura, Bufonidae) (manuscrito en preparación).

- La evidencia genética obtenida con secuencias de la región control mitocondrial y marcadores nucleares AFLP demuestra que en dos localidades ubicadas en la zona baja del estero Pupío (32°S) ocurre hibridación entre *R. atacamensis* y *R. arunco*.

- La composición genética de las dos localidades del estero Pupío donde se detectó hibridación, en que predominan los marcadores genéticos y los haplotipos mitocondriales de *R. arunco*, y la presencia de una población casi pura de *R. atacamensis* en la parte alta del estero, indican que la zona de hibridación es relativamente ancha y que habría una segregación espacial de las dos especies a lo largo del estero.

- La presencia de individuos identificados como *R. arunco* puros mezclados con distintos tipos de híbridos y retrocruces, junto con la evidencia reproductiva obtenida en terreno y laboratorio, sugiere que la hibridación es frecuente en ambas localidades y que la zona de hibridación correspondería a un enjambre híbrido.

### 6.3. Proyecciones

Los estudios de variación fenotípica y genética en poblaciones de *R. atacamensis* y de hibridación entre esta especie y *R. arunco* que conforman esta tesis, ilustran la importancia del conocimiento taxonómico, biogeográfico y de historia natural para poder profundizar las preguntas que se pueden plantear en el marco de la biología evolutiva. Las ampliaciones de rango de *R. atacamensis* (Capítulo 2), resultado de una intensa campaña de exploración en las Regiones de Atacama y Coquimbo, implicaron no solo un aumento del área geográfica en que esta especie puede encontrarse sino también del rango de variación fenotípica entre sus poblaciones como se muestra en el Capítulo 3. Demostrar que ha ocurrido selección natural en poblaciones naturales es una tarea extremadamente compleja y laboriosa, particularmente para rasgos y modelos donde los experimentos de jardín común y de transplantes recíprocos son casi imposibles de realizar. Por lo tanto, las aproximaciones indirectas como la utilizada en esta tesis ( $P_{ST}$ - $F_{ST}$ , Capítulo 3) son útiles porque proveen el marco de referencia para plantear hipótesis más específicas acerca de los procesos y mecanismos que producen los patrones de diferenciación. En el caso de *R. atacamensis*, por ejemplo, el aumento de tamaño corporal con la latitud (Capítulo 3), patrón consistente con la regla de Bergmann, sugiere que puede haber respuestas adaptativas de tipo ecofisiológico (por ejemplo,

termoregulatorias o relacionadas con la retención de líquido) al gradiente de aridez donde esta especie se distribuye.

Por otra parte, los estudios filogeográficos tienen el potencial de clarificar la historia evolutiva e identificar los procesos que determinan la variación genética de las poblaciones a distintas escalas espaciales. La alta divergencia observada entre las poblaciones del extremo norte, donde también se detectaron los efectos de cuellos de botella (Capítulo 4), puede ser el resultado de las prolongadas condiciones de aislamiento en el margen del desierto de Atacama. Análisis genealógicos intrapoblacionales, complementados con datos de dispersión y tamaño poblacional obtenidos en terreno, podrían ser útiles para establecer el grado de conexión actual entre estas poblaciones. Un aspecto que hay que destacar es la importancia de los estudios filogeográficos en el contexto de la conservación. La asimetría en los niveles de variación genética inter e intrapoblacional observados a lo largo de la distribución de *R. atacamensis* (Capítulo 4), sugiere que no todas las poblaciones tienen la misma prioridad desde el punto de vista de la conservación. Aunque el nivel de divergencia entre las poblaciones del norte, con la excepción de Paposo, no es muy alto en comparación a la divergencia observada dentro de la especie, se ha constatado que algunas localidades de esta zona han sido alteradas o destruidas por actividades humanas (Capítulo 2) por lo que adquieren un valor más alto como posibles blancos de conservación. Si además se consideran como criterios la divergencia genética y morfológica, la población de Paposo tiene la prioridad más alta.

Finalmente, una de las perspectivas de investigación más interesantes surgidas de este estudio, es la posible existencia de una extensa y compleja zona de contacto (e

hibridación) entre *R. atacamensis* y *R. arunco* (Capítulo 5). Como se demostró en ese capítulo estas especies hermanas hibridan frecuentemente en dos localidades ubicadas en un punto del límite de distribución de ambas (estero Pupío, 32°S), lo cual es evidencia de que no han alcanzado un aislamiento reproductivo completo a pesar de que presentan un alto grado de divergencia genética y fenotípica (patrones de coloración). Por otro lado, la segregación espacial observada entre las dos especies a lo largo de ese estero sugiere que factores ecológicos relacionados con la elección de hábitat podrían estar impidiendo que las poblaciones de ambas especies se fusionen a lo largo de este sistema hídrico. Como se desprende de las consideraciones anteriores, el estudio de esta zona de hibridación requiere la integración de aproximaciones biogeográficas, genéticas y ecológicas a distintas escalas espaciales. Es así como por ejemplo, datos reproductivos, etológicos, de preferencia de hábitat y de dispersión, junto a detallados análisis genético-poblacionales pueden ser necesarios para aclarar la naturaleza de la zona híbrida (zona de tensión vs. enjambre híbrido) y por qué estas dos especies aparentemente se segregan a lo largo de los sistemas hídricos. En una escala espacial más amplia, metodologías de modelamiento de distribución (que requieren detallados registros de ocurrencia de las especies) en conjunto con análisis filogeográficos y de demografía histórica pueden ser útiles para esclarecer si la zona de contacto es de origen secundario, lo cual apoyaría una hipótesis de especiación alopátrica.