

UCH-FC  
Biotecnología  
C824  
C. L

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



**“Determinación de la variación genética en poblaciones chilenas de *Bufo spinulosus* usando marcadores RAPDs y secuencias de la Región Control del DNA mitocondrial”**

Tesis entregada a la Universidad de Chile como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Claudio Luis Correa Quezada**



**Directora de Tesis**  
Prof. Patricia Iturra C.

**Codirector**  
Marco Méndez T.

Octubre 2002



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION  
TESIS DE PREGRADO**

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

***CLAUDIO CORREA QUEZADA***

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de agosto 2002.

Director de Tesis  
Dra. Patricia Iturra Constant

Codirector de Tesis  
Dr. Marco Méndez Torres

**LA COMISION**

Dr. Alberto Veloso Martínez  
Presidente

Dra. Margarita Carú Marambio

Dr. Raúl Godoy Herrera

## AGRADECIMIENTOS

*Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres, Erika Quezada y Osvaldo Correa, y a mi hermano, Marcelo, por permitirme llevar a buen término esta empresa. En especial, destacar su paciencia y su apoyo incondicional ante las vicisitudes existenciales que moldearon este largo camino.*

*También quisiera mencionar, con especial afecto, a mis guías, Patricia Iturra y Marco Méndez, por su enorme paciencia y disposición para resolver todos mis problemas y dudas. Sin ellos esta tarea habría sido demasiado ardua e imposible de concretar.*

*Agradezco a Talía del Pozo por guiarme en mis primeras incursiones en un laboratorio y a mis compañeros de Laboratorio, Natalia Lam, Nora Vergara y Cristian Araneda, por su constante ayuda y por hacer más grato mi trabajo.*

*Finalmente, quiero agradecer a mi polola, Beatriz Vanin, por su cariño y por ser mi compañera.*

Esta Tesis fue realizada principalmente en el Laboratorio de Citogenética y Genética Poblacional de Vertebrados, Programa de Genética Humana, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiada parcialmente por el Proyecto FONDECYT 3000048-2000.

## ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.2 MARCADORES MOLECULARES.....	3
1.3 OBJETIVO E HIPÓTESIS.....	6
1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
2.1 MARCADORES RAPDs.....	7
2.1.1 Ejemplares y poblaciones analizadas.....	7
2.1.2 Obtención de muestras de tejido y extracción de DNA total.....	9
2.1.3 Mezcla y condiciones de PCR para obtener marcadores RAPDs.....	10
2.1.4 Análisis de los patrones de bandas y cálculos de frecuencias.....	11
2.1.5 Cálculos de distancias (índices de disimilitud) y dendrogramas.....	12
2.1.6 Análisis genéticos y distancias de Nei entre poblaciones.....	13
2.1.7 Prueba de Mantel.....	16
2.2 SECUENCIAS DE LA REGIÓN CONTROL.....	18
2.2.1 Ejemplares y poblaciones analizadas.....	18
2.2.2 Amplificación de la Región Control y secuenciación.....	18
2.2.3 Análisis de las secuencias.....	19
2.2.4 Pruebas de Mantel.....	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1 MARCADORES RAPDs.....	21
3.1.1 Patrones de bandas.....	21
3.1.2 Frecuencias de bandas.....	21
3.1.3 Dendrogramas y diferenciación poblacional.....	25
3.1.4 Coeficientes de diferenciación genética y flujo génico.....	27
3.1.5 Prueba de Mantel.....	28
3.2 SECUENCIAS DE LA REGIÓN CONTROL.....	29
3.2.1 Patrones de diferenciación.....	29
3.2.2 Pruebas de Mantel.....	29

	Página
4. DISCUSIÓN.....	32
5. CONCLUSIONES.....	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41
7. ANEXOS.....	45

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1:	
Datos de las localidades consideradas en este estudio.....	página 9
TABLA 2:	
Secuencias de los seis partidores (OPERON Technologies) seleccionados para obtener bandas RAPDs en <i>Bufo spinulosus</i> .....	página 12
TABLA 3:	
Números de bandas RAPDs por partidior.....	página 17
TABLA 4:	
Coefficientes de diferenciación genética ( $G_{ST}$ ) y número de migrantes ( $N_m$ ) para agrupaciones de poblaciones y para la totalidad de ejemplares de <i>Bufo spinulosus</i> .....	página 28
TABLA 5:	
Distancias de Nei calculadas con los marcadores RAPDs y distancias geográficas entre localidades.....	página 28
TABLA 6:	
Distancias Kimura dos parámetros calculadas con las secuencias de la Región Control y distancias geográficas entre localidades.....	página 31

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:  
Ejemplares adultos hembras de *Bufo spinulosus* provenientes de distintas localidades del Norte y Centro del país.....página 7
- FIGURA 2:  
Ubicación geográfica de las localidades incluidas en este estudio de *Bufo spinulosus* y *Bufo papillosus*.....página 8
- FIGURA 3:  
Patrones de bandas RAPDs encontrados con los partidores OPB-08, OPB-10 y OPB-11 en algunos ejemplares de *Bufo spinulosus*.....página 22
- FIGURA 4:  
Patrones de bandas RAPDs encontrados con los partidores OPG-05, OPG-06 y OPG-14 en algunos ejemplares de *Bufo spinulosus*.....página 23
- FIGURA 5:  
Distribución de frecuencias de bandas RAPDs.....página 24
- FIGURA 6:  
Dendrograma construido con UPGMA usando la distancia de Rogers calculada a partir de 85 bandas RAPDs.....página 26
- FIGURA 7:  
Árbol construido con Neighbor joining usando la distancia de Nei calculada a partir de 71 bandas RAPDs.....página 27
- FIGURA 8:  
Árbol construido con Neighbor joining usando la distancia Kimura dos parámetros entre ejemplares (Región Control).....página 30
- FIGURA 9:  
Árbol construido con Neighbor joining usando la distancia Kimura dos parámetros promedio entre poblaciones (Región Control).....página 31

## RESUMEN

*Bufo spinulosus* (ANURA: BUFONIDAE) es un anfibio sudamericano que habita la cordillera de los Andes y que en Chile tiene una distribución alopátrica (discontinua). Esta especie ha sido descrita sólo en las Regiones Primera y Segunda y en la Zona Central. Diversos estudios han mostrado que existe una alta variabilidad morfológica interpoblacional, especialmente entre las poblaciones que habitan el Norte y el Centro. Estudios preliminares usando marcadores genéticos RAPDs indican cierto grado de diferenciación entre algunas poblaciones de la Segunda Región y la Zona Central.

Para examinar si existe un grado similar de variabilidad a nivel genético, se aplicaron dos tipos de marcadores genéticos (RAPDs y secuencias de la Región Control mitocondrial o "D-loop") en un total de 105 ejemplares pertenecientes a 13 localidades que abarcan gran parte del rango de distribución de esta especie en Chile. Los marcadores nucleares RAPDs fueron utilizados para determinar la variabilidad interpoblacional a través de análisis de cluster y estimar los niveles de subestructuración genética a través de los coeficientes de diferenciación genética ( $G_{ST}$ ). Por otra parte, las secuencias de la Región Control fueron utilizadas para determinar las relaciones filogenéticas entre poblaciones en un contexto de diferenciación histórica.

Patrones similares de diferenciación interpoblacional fueron encontrados con ambos marcadores y, además, una alta correlación entre las distancias genéticas calculadas a partir de cada marcador y las distancias geográficas que separan las localidades. Estos resultados podrían interpretarse dentro del marco de un modelo de aislamiento por distancia y sugieren una marcada estructuración filogeográfica para *Bufo spinulosus* en Chile.

## ABSTRACT

*Bufo spinulosus* (ANURA: BUFONIDAE) is a south American amphibian that inhabits the Andes mountains and in Chile present a allopatric distribution. This species has been described at First and Second Regions and at Central Zone of Chile. Several studies have shown that exist a high interpopulation morphologic variability, especially between populations that inhabits on North and Central Zones. Preliminary studies employing RAPD markers indicate some grade of genetic differentiation between Second Region and Central Zone populations.

To examine if exists a similar grade of variability at genetic level, two kinds of genetics markers (RAPDs and D-loop sequences) were applied to 105 specimens belonging to 13 localities that include a great part of the distribution range of this species in Chile. Nuclear RAPD markers were utilized to determinate interpopulation variability by means of cluster analysis and estimate levels of genetic substructure by coefficients of gene differentiation ( $G_{ST}$ ). On the other hand, D-loop sequences were utilized to determinate phylogenetic relationships between populations in relation to differentiation in a historical explanation.

Similar patterns of interpopulation genetic differentiation were found with both markers. In addition, a high correlation between genetic distances calculated by each marker and geographic distances among localities was found. These results can be interpreted into theoretical framework of a isolation by distance model and suggest a marked phylogeographic structure of *Bufo spinulosus* in Chile.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ANTECEDENTES.

Los representantes del género *Bufo* (ANURA: BUFONIDAE), conocidos comúnmente con el nombre de sapos, presentan una distribución cosmopolita (exceptuando las Regiones Polares, Oceanía y Madagascar) donde ocupan una amplia variedad de hábitats preferentemente en las regiones cálidas y templadas del globo (Duellman y Trueb, 1994). Seis especies de este género se reconocen en nuestro país, dos de las cuales son típicas de los hábitats de altura de la cordillera de los Andes (Cei, 1972; Veloso y Navarro, 1988). Una de estas especies, *Bufo spinulosus* Wiegmann 1835, habita las zonas cordilleranas desde el altiplano de Perú y Bolivia hasta los Andes centrales en Chile y Argentina (Vellard, 1959). En Chile presenta una distribución discontinua, habiendo sido descrito en las regiones Primera, Segunda (hasta el sur del Salar de Atacama) y en la Zona Central (Regiones Quinta, Metropolitana y Sexta) (Cei, 1961; Veloso y Navarro, 1988). En la mayor parte de este territorio se puede encontrar desde los 1200m, con la excepción de la zona de Arica, donde habita desde el nivel del mar hasta los 4600m (Veloso y col., 1982). Cei (1962), dentro del contexto de diferenciación de diversas especies de *Bufo*, ha postulado que esta distribución fragmentada se debería a la barrera geográfica que representa la zona desértica entre estas regiones, lo que provocaría un total aislamiento geográfico entre estas poblaciones de *Bufo spinulosus*. La otra especie, *Bufo papillosus* Philippi 1902, habita desde la provincia de Talca (Séptima Región) hasta la provincia de Alto Palena (Décima Región) sobre los 1000m (Ortiz y col., 1994).

Diversos estudios han mostrado la existencia de una alta variabilidad morfológica de *Bufo spinulosus* en Chile. Cei (1960, 1961) estableció una clara distinción entre las poblaciones cordilleranas del Norte (Primera y Segunda Región) y las de la Zona Central,

aunque destaca cierto grado de sobreposición en los rangos de medidas de los caracteres morfológicos entre poblaciones. Veloso y col. (1982), documentan un alto nivel de variación fenotípica interpoblacional a lo largo de un gradiente altitudinal en la zona de Arica donde este anfibio habita desde el nivel del mar (Azapa) hasta los 4600m (Parinacota). Otro estudio morfométrico que consideró ejemplares del Norte (Primera y Segunda Región) y la Zona Central, demostró que hay diferencias significativas entre las poblaciones del Norte y el Centro, y entre las que habitan por sobre y bajo los 3000m (Méndez y col., *in litteris*). En particular, el tamaño corporal decrece con la altitud y aumenta con la latitud, pero todas las variables estudiadas (17 caracteres morfométricos en total) varían entre poblaciones. En este trabajo se destaca, además, la alta divergencia morfológica que presentan los individuos del Tatio (Segunda Región), los cuales se diferencian notablemente por una reducción en el tamaño de la glándula parótida, un tamaño corporal menor y una coloración más oscura que el resto de las poblaciones. Aunque en este estudio se enfatiza la necesidad de complementar esta información con estudios genéticos poblacionales, hasta la fecha sólo se han realizado estudios preliminares usando marcadores nucleares RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), los cuales han revelado la existencia de diferenciación genética entre algunas poblaciones del Norte (Segunda región) y de la Zona Central. Estos resultados, que forman parte del trabajo de investigación del Laboratorio de Zoología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, sugieren que un estudio más detallado usando este tipo de herramientas moleculares permitiría establecer el grado de diferenciación genética dentro de esta especie y si existen niveles de variación semejantes a los observados en los caracteres morfológicos entre poblaciones.

## 1.2 MARCADORES MOLECULARES.

El uso de marcadores. para detectar variación a nivel genético, junto con el desarrollo de nuevos métodos estadísticos y programas computacionales que permiten analizar esta información, han ampliado enormemente la capacidad para investigar los procesos que determinan la estructura y la dinámica de las poblaciones (Sunnucks, 2000). Una de estas herramientas, la técnica RAPD-PCR, permite generar una gran cantidad de fragmentos anónimos a partir de la amplificación de DNA genómico usando partidores de secuencia aleatoria (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990). El número de fragmentos amplificados depende de la cantidad y la posición relativa de los sitios de alineamiento presentes en el genoma de cada organismo. La distribución azarosa de estos sitios constituye una ventaja frente a otros marcadores nucleares (por ejemplo, aloenzimas) debido a que los fragmentos representan tanto zonas codificantes como no codificantes del genoma. Otras ventajas de esta técnica son su bajo costo y la relativa facilidad de su aplicación, ya que los fragmentos pueden ser separados por electroforesis en geles de agarosa (Parker y col., 1998).

Aunque esta técnica entrega bastante información al comparar los patrones de bandas entre individuos, algunas dificultades se presentan al tratar de derivar algunos parámetros genéticos a partir de los patrones observados. Estos análisis se basan en el supuesto de que cada banda representa un *locus* dialélico cuyos alelos segregan de forma mendeliana, suponiendo, además, que no hay comigración de fragmentos. El alelo dominante, "presencia de banda", sería el segmento de DNA en que los sitios de alineamiento no están alterados, mientras que el alelo recesivo correspondería al segmento del cromosoma homólogo que presenta un cambio en alguno o ambos sitios por lo que no se produce la amplificación del fragmento (alelo "ausencia de banda"). La dificultad que se presenta en los organismos diploides es que no se puede distinguir con certeza entre los individuos homocigotos dominantes (en que hay amplificación de ambos

segmentos) y los individuos heterocigotos (en que sólo uno de los segmentos amplifica porque el otro está alterado). Esto determina la naturaleza dominante de estos marcadores (Williams y col., 1993). Esta desventaja ha incentivado el desarrollo de varios métodos de análisis para estimar las frecuencias genotípicas y otros parámetros genéticos a partir de los patrones de bandas, pero en general se ha establecido que se debe usar una mayor cantidad de individuos o *loci* en comparación con otras técnicas (Clarck y Lanigan, 1993; Lynch y Milligan, 1994). Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, estos marcadores han sido muy útiles para dilucidar las diferencias genéticas intra e interpoblacionales en una gran variedad de organismos (por ejemplo: Gibbs y col., 1994; Kirsten y col., 1998; Lou y col., 1998; Ritland y col., 2000).

Aunque es posible obtener una gran cantidad de información acerca de la estructura genética de las poblaciones a partir de marcadores RAPDs, este enfoque no permite establecer las relaciones de parentesco (filogenéticas) entre las poblaciones estudiadas ya que se desconoce la naturaleza genética de los fragmentos que se comparan. Para establecer relaciones a este nivel, puede recurrirse a la comparación de secuencias homólogas de DNA. El DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) presenta varias ventajas con respecto a otras regiones dentro del genoma. En general, el DNAm<sub>t</sub> tiene una tasa de sustitución nucleotídica más alta que los genes nucleares de copia única y exhibe un alto nivel de polimorfismo dentro de la mayoría de las especies. Debido a que en vertebrados estas moléculas se heredan por vía materna, teóricamente no habría recombinación entre moléculas de diferentes linajes, por lo que las variantes detectadas en diferentes individuos estarían conectadas históricamente a través de una genealogía maternal (Avice, 1992).

El genoma mitocondrial de vertebrados y otros animales contiene los genes de algunas proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones (por ejemplo, citocromo b y citocromo oxidasas) y algunas proteínas, todos los RNA de transferencia y

los RNA ribosomales necesarios para la síntesis de proteínas mitocondriales (Griffiths y col., 1993). La principal región no codificante, de alrededor de 1000pb, es llamada región control (o "D-loop") y se sitúa cerca del sitio de iniciación de la replicación. Tanto esta región como los otros genes mitocondriales presentan diferentes tasas de evolución (tasas de sustitución nucleotídica), razón por la cual los análisis basados en comparaciones de estas secuencias han sido extensamente usados para estudios filogenéticos a distintos niveles de organización sistemática (Avise, 1994). En particular, la Región Control ha sido usada para identificar relaciones entre linajes estrechamente relacionados (específicamente a nivel poblacional) debido a que muchos sitios no están restringidos por función y evolucionan rápidamente (Goebel y col., 1999). Debido a esta característica, un importante número de estudios ha utilizado secuencias de esta región para establecer los patrones filogeográficos (*sensu* Avise y col., 1987) y niveles de estructuración poblacional, así como inferir los procesos que los han determinado (por ejemplo: Walker y col., 1995; Encalada y col., 1996; Kvist y col., 1999).

En resumen, la aplicación de estos dos tipos de marcadores, RAPDs y secuencias de la Región Control, a un estudio poblacional de *Bufo spinulosus*, permitiría estimar el grado de diferenciación genética e inferir las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de esta especie en Chile. Además, debido a que el modo de herencia difiere en ambos marcadores, podría establecerse si existen diferencias en las capacidades de dispersión que presentan ambos sexos.

### **1.3 OBJETIVO E HIPÓTESIS.**

Considerando los patrones de diferenciación morfológica descritos en esta especie y el aislamiento geográfico postulado entre las poblaciones que habitan el Norte y la Zona Central, el objetivo principal de esta tesis es determinar la variación genética interpoblacional en esta especie usando estos marcadores y establecer si el patrón de diferenciación hallado se corresponde con las distancias geográficas entre las poblaciones estudiadas. Las hipótesis de este trabajo son las siguientes: a) existe diferenciación genética (medida como distancias genéticas) entre estos dos grupos de poblaciones y b) las distancias genéticas son mayores entre las poblaciones del Norte y del Centro que entre las poblaciones de las Regiones Primera y Segunda.

### **1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS.**

La variabilidad detectada con los marcadores RAPDs y las secuencias de la Región Control, tanto a nivel individual como poblacional, permitió establecer los patrones de diferenciación genética en poblaciones del Norte y el Centro del país. Estos resultados son presentados gráficamente en forma de árboles. Por otra parte, las secuencias de la Región Control fueron utilizadas para examinar la distribución de linajes filogenéticamente relacionados usando como grupo externo individuos de *Bufo papillosus*. Los marcadores RAPDs fueron utilizados, además, para estimar algunos parámetros genéticos (coeficientes de diferenciación genética y número de migrantes) los cuales son una estimación del grado de subestructuración genética entre poblaciones. Finalmente, para verificar las hipótesis planteadas, se utilizó la información (distancias genéticas entre poblaciones) derivada de ambos marcadores para establecer si estas distancias se correlacionaban entre sí y con las distancias geográficas utilizando pruebas de Mantel.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MARCADORES RAPDs.

**2.1.1 Ejemplares y poblaciones analizadas.** En este estudio se incluyeron un total de 105 ejemplares de *Bufo spinulosus* (FIGURA 1) provenientes de 13 localidades que abarcan gran parte del rango de distribución conocido para esta especie en Chile (FIGURA 2). En la TABLA 1 se entregan datos de cada localidad (ubicación regional, coordenadas y altura sobre el nivel del mar) y el número de ejemplares incluidos para cada una de estas localidades. Todos los individuos fueron depositados en la Colección Herpetológica del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Chile (DBGUCH).

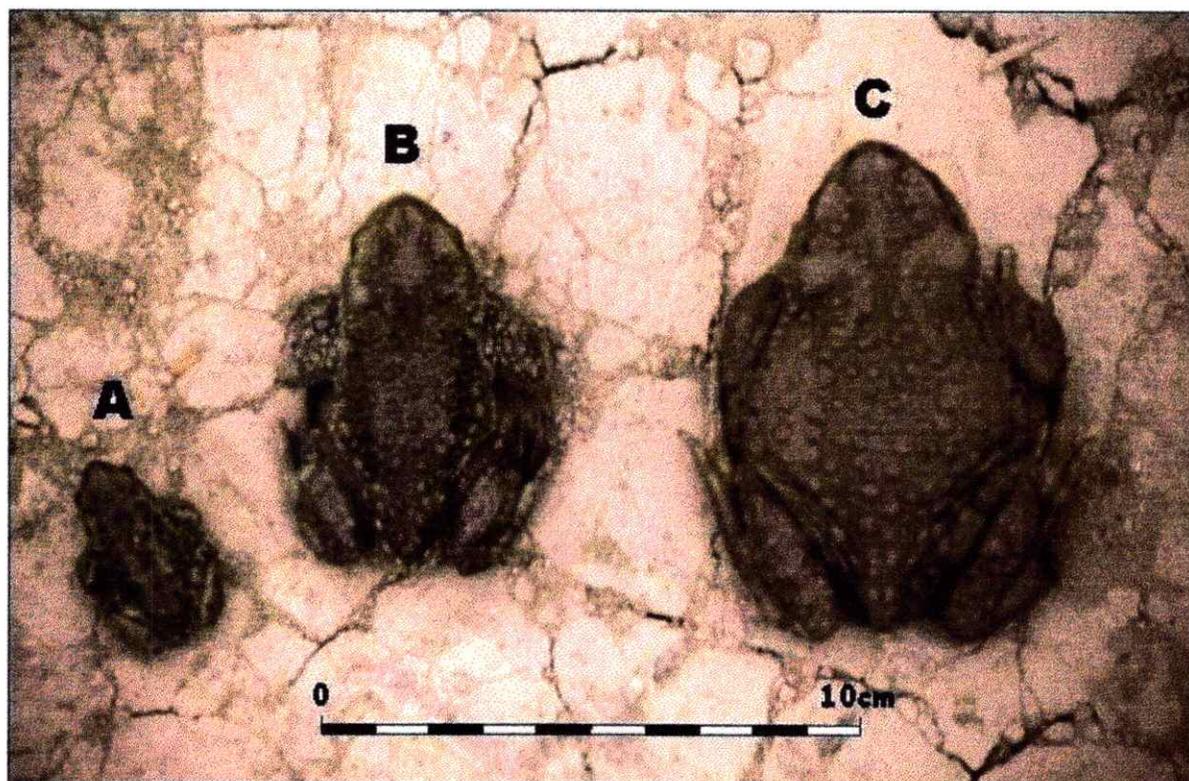


FIGURA 1: Ejemplares adultos hembras de *Bufo spinulosus* provenientes de distintas localidades del Norte y Centro del país. A: Tatio (Segunda Región); B: Quebrada Jerez (Segunda Región); C: Portillo (Zona Central).

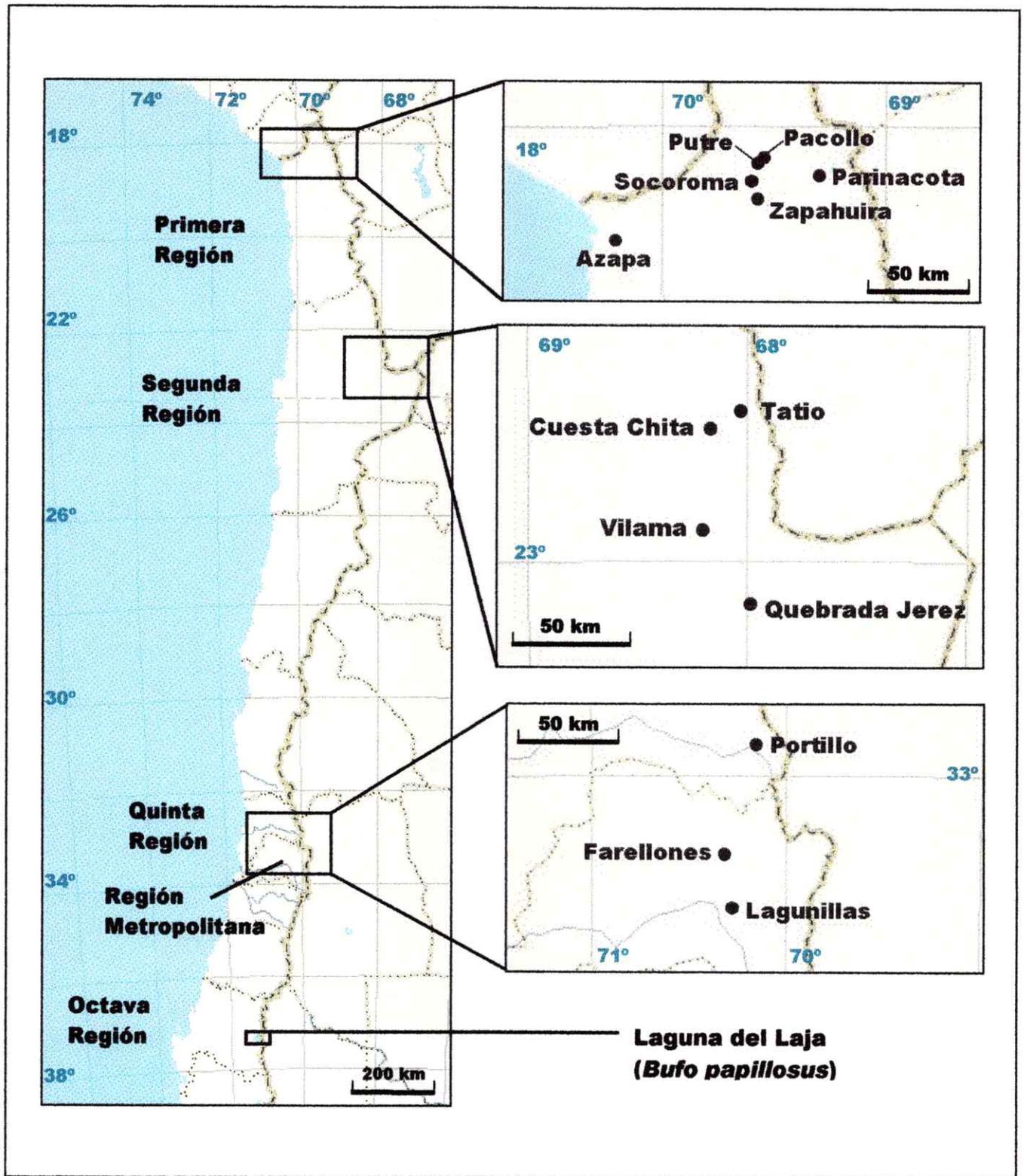


FIGURA 2: Ubicación geográfica de las localidades incluidas en este estudio de *Bufo spinulosus* y *Bufo papillosus*. En los recuadros se indican las localidades de la Primera, Segunda Región y la Zona Central.

LOCALIDAD	REGIÓN	COORDENADAS	ALTURA (msnm)	EJEMPLARES
Azapa	Primera	18° 30' S; 70° 13' O	164	3
Socoroma	Primera	18° 15' S; 69° 36' O	3058	5
Zapahuira	Primera	18° 20' S; 69° 35' O	3320	7
Putre	Primera	18° 11' S; 69° 33' O	3507	10
Pacollo	Primera	18° 10' S; 69° 31' O	4090	6
Parinacota	Primera	18° 12' S; 69° 16' O	4445	10
Tatio	Segunda	22° 20' S; 68° 01' O	4264	10
Cuesta Chita	Segunda	22° 25' S; 68° 10' O	3741	10
Vilama	Segunda	22° 52' S; 68° 10' O	2579	10
Quebrada Jerez	Segunda	23° 11' S; 67° 59' O	2513	10
Portillo	Quinta	32° 51' S; 70° 10' O	2119	10
Farellones	Metropolitana	33° 21' S; 70° 18' O	2331	10
Lagunillas	Metropolitana	33° 36' S; 70° 17' O	2242	4

TABLA 1: Datos de las localidades consideradas en este estudio. Se indica la ubicación geográfica, la altura y número de ejemplares de *Bufo spinulosus* incluidos por localidad.

**2.1.2 Obtención de muestras de tejido y extracción de DNA total.** Los animales fueron anestesiados y luego sacrificados por medio de una punción cervical y bajo estrictas condiciones asépticas. Inmediatamente se extrajo un trozo de hígado y/o dedo el cual fue inmerso en etanol absoluto y guardado a  $-4^{\circ}\text{C}$ . De estas muestras se tomó un trozo de hígado o dedo de aproximadamente 3 mm de diámetro el cual se molió en una mezcla mantenida en hielo de 600  $\mu\text{L}$  de buffer STE (0,1 M NaCl, 10mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0), 30  $\mu\text{L}$  de SDS al 20% y 5,5  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20mg/mL) dentro de un

ependorf de 1,5mL. Esta mezcla se mantuvo agitada a 50-55°C por toda la noche hasta la disolución completa del tejido. Posteriormente se realizó una extracción fenólica de acuerdo al siguiente protocolo: se agregaron sobre la mezcla anterior, 600  $\mu$ L de fenol saturado con Tris 0,1M pH 8, se agitó el tubo hasta obtener una solución de aspecto lechoso y se centrifugó por 10 min a 2500 rpm, luego se traspasó la fase superior a otro tubo con una pipeta plástica y se agregaron subsecuentemente 500  $\mu$ L de fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) siguiendo el mismo procedimiento antes descrito.

Para precipitar el DNA se agregaron 900  $\mu$ L de etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  sobre la fase superior resultante de la mezcla anterior. Se tomó el DNA con una pipeta de vidrio sellada y se sumergió varias veces en etanol al 70% para eliminar las sales, se dejó secar y se resuspendió finalmente en buffer TE 0,1X (Tris 1mM pH 8, EDTA 0,1mM pH 8). La muestra fue mantenida a  $37^{\circ}\text{C}$  por toda la noche y agitada durante dos días para disolver completamente el DNA. La concentración de DNA fue medida a 280 nm en un espectrofotómetro (Hewlett-Packard 8452A) y luego se hicieron diluciones de 10ng/ $\mu$ L en buffer TE 0,1X para el PCR. La calidad y cantidad relativa tanto del DNA total como de las diluciones fueron determinadas en geles de agarosa al 0,7%. Los geles fueron preparados con buffer TBE 0,5X (Tris 0,45M, ácido bórico 0,45M, EDTA 10mM pH 8) con bromuro de etidio (0,5 $\mu$ g/mL) (8 $\mu$ L de bromuro en 86,5mL de TBE) y corridos en el mismo buffer a 8,75 V/cm.

**2.1.3 Mezcla y condiciones de PCR para obtener marcadores RAPDs.** Los PCRs fueron realizados en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) con un volumen total de mezcla de 15 $\mu$ L que se cubrió con una gota de aceite mineral. Los componentes de la mezcla por cada muestra fueron los siguientes (reactivos GIBCO BRL): H<sub>2</sub>O: 1,64 $\mu$ L;

buffer (10X): 1,5 $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> (50mM): 0,75 $\mu$ L; dNTPs (10mM de cada uno): 0,18 $\mu$ L; partidor (1,2 $\mu$ M): 6,25 $\mu$ L; Taq (5U/ $\mu$ L): 0,18 $\mu$ L; DNA total (10ng/ $\mu$ L): 4,2 $\mu$ L. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 2 min de denaturación inicial a 95°C; 6 ciclos de 1 min de denaturación a 94°C, 1 min de alineación a 35°C y 2 min de extensión a 72°C, seguidos por 30 ciclos de 10s de denaturación a 94°C, 30s de alineación a 35°C y 1 min de extensión a 72°C; finalmente 5 min a 72°C de extensión final.

Para visualizar los productos amplificados, la mezcla total del PCR (15 $\mu$ L) fue mezclada con 2,5 $\mu$ L de buffer de carga (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilencianol y 30% de ficol en agua estéril). Estas mezclas fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y corridos a 7,5 V/cm en buffer TBE 0,5X con bromuro de etidio (0,5 $\mu$ g/mL) (20 $\mu$ L en 750mL de TBE). Para determinar el tamaño de las bandas se cargó en cada gel 0,8 $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100pb (GIBCO BRL) (15 $\mu$ L marcador, 35 $\mu$ L buffer almacenamiento (10mM Tris pH 7,5, 50mM NaCl, 0,1mM EDTA), 20 $\mu$ L buffer de carga). Las bandas fueron visualizadas con luz UV (transiluminador Vilber Lourmat) y los geles se fotografiaron con una cámara Polaroid.

En total se probaron 10 partidores de 10 nucleótidos de longitud (OPERON Technologies): OPB-08, OPB-10, OPB-11, OPB-14, OPG-05, OPG-06, OPG-14, OPM-03, OPM-10 y OPM-12, de los cuales se seleccionaron 6 por la reproducibilidad y la calidad del patrón de bandas electroforético que producían. En la TABLA 2 se especifican los partidores escogidos y su secuencia.

**2.1.4 Análisis de los patrones de bandas y cálculos de frecuencias.** Los patrones de bandas electroforéticos fueron comparados para determinar las bandas más características y notorias producidas por cada partidor. Un total de 85 bandas fueron seleccionadas para los análisis y fueron tabuladas como una matriz de caracteres (1 para

presencia y 0 para ausencia) en una planilla de Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation). Las frecuencias para todas las bandas fueron calculadas con el mismo programa. Las frecuencias del alelo "presencia de banda" fueron calculadas con el programa POPGENE (Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997) agrupando todos los individuos. También se calcularon las frecuencias de este alelo por grupos de poblaciones (Primera región, Segunda región y Zona Central) y en cada una de las poblaciones usando el mismo programa.

PARTIDOR	SECUENCIA
OPB-08	5'-GTCCA CACGG-3'
OPB-10	5'-CTGCT GGGAC-3'
OPB-11	5'-GTAGA CCCGT-3'
OPG-05	5'-CTGAG ACGGA-3'
OPG-06	5'-GTGCC TAACC-3'
OPG-14	5'-GGATG AGACC-3'

TABLA 2: Secuencias de los seis partidores (OPERON Technologies) seleccionados para obtener bandas RAPDs en *Bufo spinulosus*.

**2.1.5 Cálculos de distancias (índices de disimilitud) y dendrogramas.** Las matrices de caracteres fueron usadas para calcular dos tipos de distancias o índices de disimilitud entre cada par de ejemplares con el programa FREETREE (Pavlièek y col., 1999): distancia de Rogers:  $1 - [(n11 + n00) / (n11 + 2 \times (n10 + n01) + n00)]$ , (Rogers y Tanimoto, 1960) y distancia de Nei y Li:  $1 - [2 \times n11 / (2 \times n11 + n01 + n10)]$ , (Nei y Li, 1979), donde  $n11$  es el número de bandas compartidas por ambos ejemplares,  $n00$  el número de bandas ausentes en ambos, y  $n01$  y  $n10$  el número de bandas presentes en sólo uno de

los ejemplares. Los valores de ambas distancias pueden tomar valores entre cero y uno, donde el valor cero indica que los individuos tienen patrones de bandas idénticos. Estas distancias fueron escogidas principalmente porque incluyen tanto las diferencias como las similitudes entre los individuos que se comparan. Para realizar los análisis de cluster, es decir agrupar los individuos por su grado de similitud, se aplicaron dos métodos de construcción de árboles: UPGMA ("Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages") (Sneath y Sokal, 1973) y Neighbor joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987). Se utilizaron estos dos algoritmos con ambas distancias con el objeto de comparar los resultados. Estos métodos fueron aplicados con el programa FREETREE y los resultados visualizados con el programa TREEVIEW (Page, 2001) en forma de dendrogramas (árboles con todas las ramas terminales a una misma distancia del origen). En todos los casos se aplicó el método de aleatorización "bootstrap" (Felsenstein, 1985) con el programa FREETREE (1000 seudoréplicas) para estimar el porcentaje de confianza en los nodos.

**2.1.6 Análisis genéticos y distancias de Nei entre poblaciones.** La estimación de parámetros genéticos a partir de marcadores RAPDs se basa en el cumplimiento de varios supuestos: cada banda representa un *locus* dialélico (descartando la comigración de fragmentos de igual tamaño), estos alelos segregan de forma mendeliana y los genotipos muestran las proporciones de equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones (Lynch y Milligan, 1994). Debido a la naturaleza dominante de estos marcadores, en la práctica sólo la frecuencia del homocigoto recesivo (proporción de individuos en que la banda está ausente) puede conocerse sin ambigüedad, por lo que este valor puede usarse para calcular las frecuencias alélicas en cada *locus*. Con estas frecuencias se pueden determinar las frecuencias relativas de los homocigotos y heterocigotos para cada banda siempre que se estudie "un número sustancial de

individuos" (Nei y Kumar, 2000). Lynch y Milligan (1994) recomiendan eliminar de los análisis las bandas cuya frecuencia sea mayor a  $1 - (3/N)$  (donde N es el número de ejemplares por población) para evitar una subestimación en la frecuencia del alelo "ausencia de banda" debido a la baja frecuencia observada de los individuos que no presentan la banda. Además, ellos indican que idealmente se deberían incluir por lo menos 100 individuos por población para obtener frecuencias no sesgadas de la frecuencia del alelo "ausencia de banda". Debido a la imposibilidad de incluir y analizar esa cantidad de individuos por población, no se aplicó directamente este criterio, pero se decidió eliminar de los análisis genéticos aquellas bandas con una frecuencia mayor a  $1 - (3/N)$ , considerando N como el número total de individuos en este caso (105). Se utilizó esta modificación debido a que al aplicar directamente la corrección propuesta por Lynch y Milligan, las bandas que en una población se presentan en una relativa baja frecuencia, en otras poblaciones pueden presentarse en alta frecuencia por lo que serían eliminadas del análisis al aplicar estrictamente este criterio. Por lo tanto, la eliminación de estas bandas siguiendo un criterio menos riguroso, se concibió como una manera de aminorar el efecto de desviación en la estimación de las frecuencias genotípicas que mencionan Lynch y Milligan. De acuerdo a esto se excluyeron las bandas con frecuencias mayores a 0,9714 (en la práctica, aquellas bandas ausentes en tres o menos individuos del total de 105). Las bandas monomórficas, aquellas presentes en todos los individuos, también fueron eliminadas porque no aportan información acerca de la variabilidad poblacional. En la TABLA 3 se indica el número de bandas usadas para los análisis de cluster (las 85 inicialmente consideradas) y el número de bandas por partidador que se incluyeron en los análisis genéticos (71 en total).

Uno de los enfoques más importantes para describir el grado de subestructuración genética dentro de las poblaciones, es el uso de los coeficientes  $F$  o coeficientes de Wright, que particionan la variación en poblaciones subdivididas y proveen una obvia

descripción de los niveles de diferenciación genética (Hedrick, 2000). Uno de estos parámetros,  $F_{ST}$ , es una medida que resume la diferenciación genética entre subpoblaciones y es siempre positivo. Como una estimación de  $F_{ST}$ , y asumiendo proporciones de Hardy-Weinberg, Nei (1973) definió el coeficiente de diferenciación genética,  $G_{ST}$ . Este coeficiente se define como  $(H_T - H_S) / H_T$ , donde  $H_S$  es la heterocigosidad Hardy-Weinberg promedio dentro de una subpoblación para todos los *loci* y  $H_T = 1 - \sum p_i^2$ , donde  $p_i$  es la frecuencia promedio del alelo  $i$ , para cualquier número de alelos (Hedrick, 2000). En este estudio en particular, las subpoblaciones corresponden a las localidades estudiadas, mientras que las poblaciones corresponden a los grupos de la Primera Región, Segunda Región, Zona Central o al conjunto de todas estas regiones.

$G_{ST}$  puede interpretarse como una medida de la subestructuración genética dentro de una población con apareamiento aleatorio debido a la diferencia en las frecuencias genotípicas observadas en las subpoblaciones que la forman. Wright sugirió algunos valores límites de  $F_{ST}$  (que pueden ser aplicados a  $G_{ST}$ ) para medir cualitativamente el grado de diferenciación genética: 0 - 0,05, puede considerarse como indicación de baja diferenciación genética; 0,05 - 0,15, moderada diferenciación genética; 0,15 - 0,25, alta diferenciación genética, y sobre 0,25, diferenciación genética muy alta (Hartl y Clark, 1997).

Se calculó, además, el flujo génico (medido aquí como número de migrantes,  $Nm$ ) a partir de los índices de fijación usando la fórmula  $Nm = 0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST}$ , donde  $N$  es el tamaño efectivo de la población y  $m$  la tasa de migración (proporción de alelos dentro de una población de origen migrante). Estos cálculos se realizaron con el programa POPGENE para estimar los niveles de flujo génico entre las poblaciones analizadas dentro de cada región y entre regiones, al considerar el conjunto total de poblaciones.

La relación entre estos parámetros,  $Nm$  y  $G_{ST}$ , expresada en la fórmula anterior, radica en varios supuestos. Las estimaciones indirectas de flujo génico, es decir aquellas

derivadas de la distribución de ciertos marcadores moleculares entre las poblaciones, se basan en la neutralidad (desde el punto de vista de la selección natural) de los marcadores en un modelo de islas, donde se supone que una especie está subdividida en poblaciones (islas) de igual tamaño ( $N$ ), todas las cuales intercambian alelos con igual probabilidad (Avice, 1994). El modelo de islas no considera la distribución espacial de las poblaciones, por lo que cualquiera de ellas puede ser fuente o receptora de los genes que se intercambian. También se supone que cada población tiene un tamaño infinito por lo que las frecuencias génicas no son afectadas por deriva genética dentro de cada población (Hartl y Clark, 1997). Un criterio cualitativo para estimar el grado de flujo génico a partir de los valores de  $Nm$  fue propuesto por Slatkin (1985): un valor de  $Nm$  mucho mayor que 1 indica alto flujo génico mientras que un valor mucho menor que 1 indica bajo flujo génico.

Las matrices originales fueron usadas, además, para calcular la distancia genética corregida de Nei (Nei, 1978) entre todas las poblaciones con el programa POPGENE (TABLA 5). Esta distancia está definida como:  $D = -\ln (J_{xy} / (J_x J_y)^{0.5})$ , donde  $J_x$ ,  $J_y$  y  $J_{xy}$  son los promedios aritméticos para todos los loci de  $\sum x_i^2$ ,  $\sum y_i^2$  y  $\sum x_i y_i$ , respectivamente ( $x_i$  e  $y_i$  son las frecuencias del alelo  $i$  en las poblaciones X e Y). Debido a que esta distancia se calcula a partir de las frecuencias alélicas, se utilizaron las mismas bandas que se consideraron para calcular  $G_{ST}$  y  $Nm$ . Estas distancias fueron usadas para visualizar las relaciones entre todas las poblaciones estudiadas usando el método de NJ con el programa MEGA (Kumar y col., 2001).

**2.1.7 Prueba de Mantel.** Para determinar la existencia de correlación entre las distancias genéticas de Nei entre todas las poblaciones y las distancias geográficas que las separan, se realizó una prueba de Mantel. Las distancias geográficas lineales fueron calculadas a partir de las coordenadas de cada localidad usando el programa accesible en línea

"Surface Distance Between Two Points of Latitude and Longitude" (dirección <http://www.wcrl.ars.usda.gov/cec/java/lat-long.htm>) y tabuladas como una matriz análoga a la de distancias genéticas entre poblaciones. Se calcularon las distancias euclidianas para todos los valores de ambas matrices con el programa STATISTICA (SatSoft Inc., 1997) y las matrices resultantes fueron usadas para realizar la prueba de Mantel con el programa MANTEL (Liedloff, 1999). Esta prueba entrega un valor  $g$ , el que debe ser mayor a cierto valor crítico para rechazar la hipótesis nula (de no correlación significativa entre las matrices) con una cierta probabilidad ( $P$ ), y un coeficiente de correlación,  $r$ , para medir el grado de correlación. 1000 iteraciones fueron realizadas para aumentar la confianza en el resultado de esta comparación. Los resultados de estas pruebas se indican especificando los valores de  $r$  y  $P$ .

PARTIDOR	Nº DE BANDAS INICIALES	Nº DE BANDAS PARA ANÁLISIS
OPB-08	17	16
OPB-10	15	15
OPB-11	11	6
OPG-05	16	15
OPG-06	14	11
OPG-14	12	8
TOTAL	85	71

TABLA 3: Número de bandas RAPDs por partidador. En la primera columna se indica el número de bandas consideradas inicialmente en este estudio que fueron usadas para los análisis de cluster. En la segunda columna se indica el número de bandas usadas para los análisis genéticos después de excluir las bandas con una frecuencia mayor a 0,9714 y tres bandas monomórficas.

## 2.2 SECUENCIAS DE LA REGIÓN CONTROL.

**2.2.1 Ejemplares y poblaciones analizadas.** Para los análisis de secuencias se incluyeron ejemplares de las mismas poblaciones usadas para los marcadores RAPDs, con la excepción de 3 localidades de la Primera Región: Socoroma, Pacollo y Zapahuira. Además se incluyeron 5 especímenes de *Bufo papillosus* de la Laguna del Laja (1400msnm; 37° 26' S, 71° 15' O), Octava Región, para ser usados como grupo externo (FIGURA 2). La elección de esta última especie se basa en los análisis de caracteres morfológicos, conductuales y moleculares, los cuales indican que *Bufo papillosus* corresponde al grupo hermano de *Bufo spinulosus* (Méndez, 2000). Las localidades incluidas de *Bufo spinulosus* fueron: Azapa (3 ejemplares), Putre (5 ejemplares), Parinacota (5 ejemplares), Tatio (5 ejemplares), Cuesta Chita (5 ejemplares), Vilama (5 ejemplares), Quebrada Jerez (4 ejemplares), Portillo (5 ejemplares), Farellones (5 ejemplares) y Lagunillas (3 ejemplares). Los datos de ubicación geográfica y altura para estas localidades se encuentran en la TABLA 1.

**2.2.2 Amplificación de la Región Control y secuenciación.** Las mismas muestras de DNA total usadas para obtener los marcadores RAPDs fueron utilizadas para amplificar la Región Control. Los partidores fueron los mismos que Goebel (1999) utilizó para amplificar esta región en diversas especies de *Bufo*: CytbA-L (5'-GAATY GGRGG WCAAC CAGTA GAAGA CCC-3') y ControlIP-H (5'-GTCCA TAGAT TCAST TCCGT CAG-3'). La mezcla de PCR fue la siguiente (reactivos GIBCO BRL): H<sub>2</sub>O: 11,2µL; buffer (10X) 3,5µL; MgCl<sub>2</sub> (50mM): 1,5µL; dNTPs (2,5mM de cada uno) 5µL; partidor L (20µM): 1µL; partidor H (20µM): 1µL; Taq (5U/µL): 1µL; DNA total: 0,8µL. Se usaron directamente las muestras de DNA extraídas sin diluir ya que se observó que se obtenía un buen producto de amplificación a pesar de las diferencias de concentración. Las condiciones de PCR

fueron las siguientes: 1 min de denaturación inicial a 94°C; 28 ciclos de 1 min de denaturación a 94°C, 1 min de alineación a 56°C y 2 min de extensión a 72°C y 5 min a 72°C de extensión final. En cada PCR se usó un control negativo en que el DNA fue remplazado con agua para descartar la posibilidad de contaminación. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. En todos los geles se cargó un marcador de peso molecular de 100pb (GIBCO BRL) para verificar el tamaño de la región amplificada, aproximadamente de 1100pb. En todos los casos se observó sólo una banda intensa del tamaño esperado. Este producto fue purificado del resto de los reactivos del PCR usando el kit Qiaquick (Qiagen). Para la secuenciación se usó el secuenciador automático ABI Prism 377 (ABI Biosystems). Todos los productos de amplificación fueron secuenciados en ambos sentidos para obtener las lecturas de ambos extremos de la región.

**2.2.3 Análisis de las secuencias.** Las dos secuencias de cada ejemplar fueron alineadas con el programa BIOEDIT (Hall, 1999) para corregir las lecturas ambiguas en los extremos de cada secuencia. Estas correcciones se hicieron comparando cada alineamiento con los perfiles de fluorescencia de cada espectrograma. Los espectrogramas fueron visualizados con el programa CHROMAS (McCarthy, 1998). Las 50 secuencias corregidas fueron alineadas con el programa Clustal W (Thompson y col., 1994) y posteriormente alineadas a mano con el programa BIOEDIT. De los 1124 nucleótidos que se obtuvieron como promedio en cada ejemplar, 946 fueron seleccionados después de excluir los extremos donde no pudieron realizarse los alineamientos con certeza. Estos sitios fueron utilizados para calcular las distancias entre cada par de ejemplares y entre poblaciones (promedio) usando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura de dos parámetros (K2P) con el programa MEGA. Este mismo

programa se utilizó para construir árboles con el método de Neighbor joining utilizando las distancias K2P entre individuos y poblaciones. Se realizó un bootstrap de 1000 seudoréplicas para calcular el soporte en los nodos del árbol en que se examinó la diferenciación individual.

**2.2.4 Pruebas de Mantel.** Para determinar la correlación entre la diferenciación encontrada con la Región Control (medida como la distancia K2P entre poblaciones) y las distancias geográficas, se realizó una prueba de Mantel. Otra prueba se realizó para ver si existía concordancia entre las distancias genéticas interpoblacionales calculadas con ambos marcadores (distancias genéticas de Nei *versus* distancias K2P).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 MARCADORES RAPDs.

**3.1.1 Patrones de bandas.** Las matrices completas para todos los ejemplares incluidos en este estudio se encuentran en el ANEXO 1, donde se especifican los nombres usados para individualizar cada banda y su tamaño. Se observó una completa reproducibilidad de los patrones de bandas en todos los casos que se repitió la amplificación de los individuos usados como controles. Esto permitió descartar la posibilidad de que algunas bandas observadas fueran artefactos producidos por el PCR. Los patrones de bandas en algunas poblaciones para cada partidador pueden verse en las FIGURAS 3 y 4. En cuanto a los patrones individuales, todos los ejemplares presentaron una combinación única de bandas lo que permitió ubicar gráficamente cada individuo en un nodo terminal de los dendrogramas construidos a partir de las distancias calculadas (FIGURA 6).

**3.1.2 Frecuencias de bandas.** De las 85 bandas utilizadas para los análisis de cluster, se eliminaron 11 que presentaban una frecuencia superior a 0,9714 (B-08.6, B-11.1, B-11.2, B-11.3, B-11.5, B-11.7, G-05.2, G-06.13, G-14.2, G-14.5 y G-14.10) y tres bandas monomórficas (G-06.2, G-06.3 y G-14.11). Las frecuencias de las 71 bandas restantes, considerando la totalidad de los individuos, abarcan valores entre 0,0762 y 0,9619 y se concentran principalmente entre 0,2 y 0,4 y sobre 0,9 (FIGURA 5). La distribución de estos valores no indica ninguna tendencia en particular por lo que se consideró que las bandas seleccionadas representan una muestra aleatoria de los marcadores obtenidos.

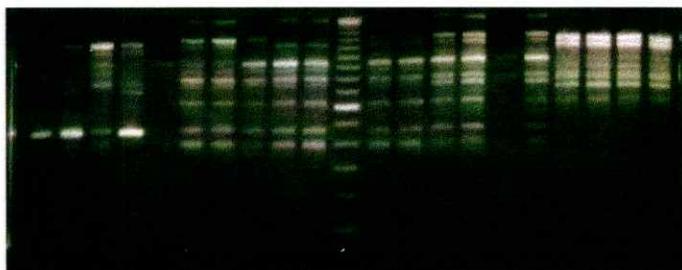
Los valores de frecuencias del alelo "presencia de banda" de las 71 bandas por agrupaciones y poblaciones se muestran en la ANEXO 2. Al analizar estas frecuencias en cada población puede apreciarse que estos valores son heterogéneos para todos los *loci*,



## OPG-05

Farellones    Tatio    C. Chita    Q. Jerez    Portillo

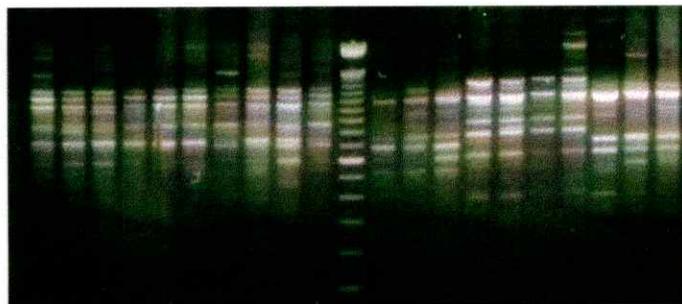
M



## OPG-06

Vilama    Tatio    C. Chita    Farellones    Q. Jerez    Portillo

M



## OPG-14

Farellones    Portillo    Tatio    Q. Jerez    C. Chita

M

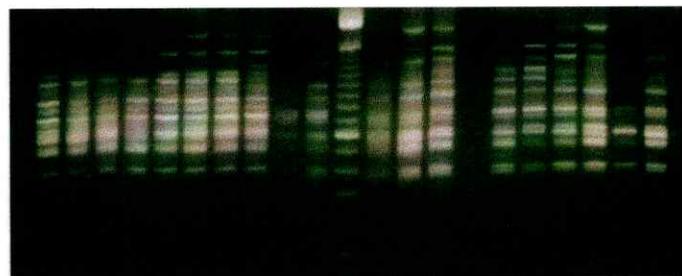


FIGURA 4: Patrones electroforéticos de bandas RAPDs encontrados con los partidores OPG-05, OPG-06 y OPG-14 en algunos ejemplares de *Bufo spinulosus*. El carril central (M) corresponde al marcador de peso molecular de 100pb.

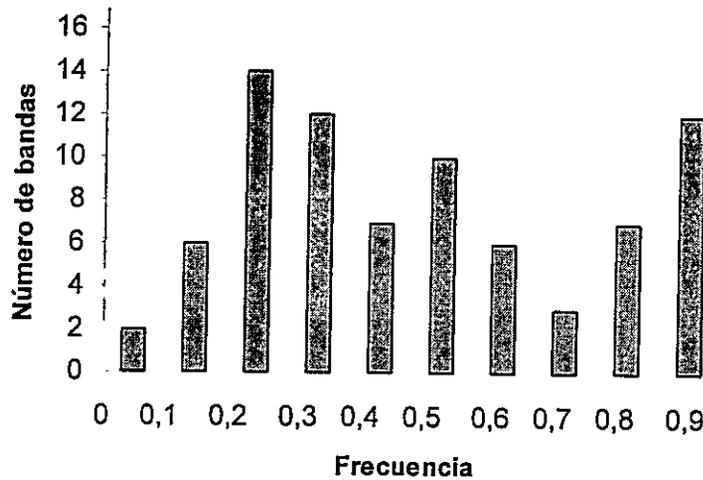


FIGURA 5: Distribución de frecuencias de bandas RAPDs. En el gráfico sólo se incluyen las 71 bandas consideradas en los análisis genéticos y en los cálculos de las distancias de Nei.

presentando valores extremos (1 ó 0) sólo en algunas poblaciones. Además se puede observar que ninguna de estas bandas pertenece exclusivamente a una determinada población, con la excepción de la B-08.15, que se presenta casi exclusivamente en Quebrada de Jerez (ver ANEXO 2). El mismo análisis para las poblaciones agrupadas por regiones (considerando las poblaciones de la Zona Central como una región), muestra que sólo tres bandas (B-10.15, G-05.5 y G-05.12) están presentes exclusivamente en una región, mientras que el resto se distribuye con frecuencias variables entre dos o las tres regiones. Entre estas últimas algunas se presentan en alta frecuencia (mayores a 0.8) en todas las regiones (por ejemplo: B-10.4, B-11.2, B-11.5, G-05.2, G-06.3, G-14.10) mientras sólo una aparece con frecuencias por debajo de 0,2 (B-08.15). Otras bandas tienen una alta frecuencia en una región particular, pero están escasamente representadas en las otras (frecuencias menores a 0,2) por lo que se podrían considerar como características de cada región. Entre estas se pueden mencionar las bandas G-05.4 y G-05.12 para la Primera Región, G-06.1 y G-14.12 para la Segunda Región y B-08.13 y B-11.11 para la Zona Central. Gran parte de las bandas restantes son compartidas en

distinto grado por algún par de regiones. Por ejemplo, las bandas B-10.11 y G-06.7 se encuentran en frecuencias relativamente altas en la Primera y Segunda Región estando ausentes en la Zona Central. Lo mismo puede decirse para la banda B-10.1, compartida por la Segunda Región y la Zona Central, y las G-05.3, G-06.12 y G-14.6, presentes en la Primera Región y la Zona Central.

**3.1.3 Dendrogramas y diferenciación poblacional.** Todos los dendrogramas contruidos con los dos métodos utilizados (UPGMA y Neighbor joining) presentaron una topología similar para ambas distancias por lo que se muestra sólo uno de estos resultados. En las FIGURA 6 se observa el dendrograma construido con UPGMA utilizando la distancia de Rogers en el que se indican todos los valores significativos de bootstrap (mayores que 50) para los nodos externos y algunas agrupaciones poblacionales. En esta representación se observan tres grupos que corresponden a los ejemplares de las Regiones Primera, Segunda y Zona Central. Estas agrupaciones están respaldadas por valores de bootstrap mayores que 90. También puede observarse que los grupos de individuos de la Primera y Segunda Región se agrupan separándose de los ejemplares de la Zona Central. A nivel poblacional sólo las poblaciones de Quebrada Jerez, Lagunillas y Azapa tienen valores de bootstrap mayores que 50 y se separan del resto, aunque en los dos últimos casos esto podría deberse al bajo número de individuos incluidos de estas poblaciones. Las poblaciones de la Zona Central (Farellones y Portillo) también se separan pero con valores bajos de bootstrap (excepto Lagunillas). En el resto de los casos se observa que los individuos de varias poblaciones se entremezclan, particularmente los ejemplares de la Segunda Región (Vilama, Cuesta Chita y Tatio) y los de la Primera Región (con excepción de los de Azapa). El árbol construido con la distancia de Nei entre poblaciones (TABLA 5) muestra la misma topología general (FIGURA 7).

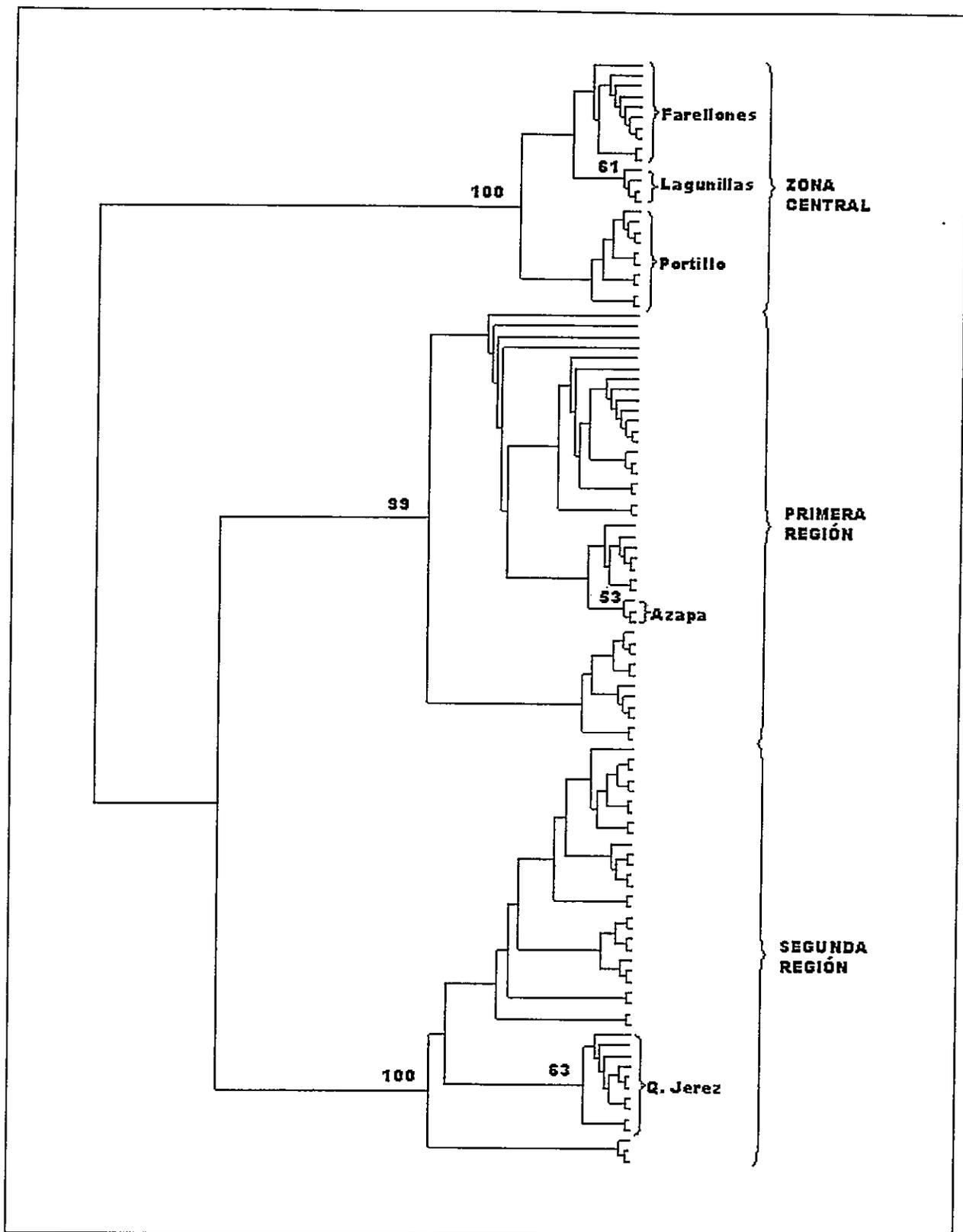


FIGURA 6: Dendrograma construido con UPGMA usando la distancia de Rogers calculada a partir de 85 bandas RAPDs. Se muestran los nodos que presentan valores significativos de bootstrap (sobre 50). Se señalan, además, las agrupaciones de ejemplares por Región y algunas agrupaciones poblacionales.

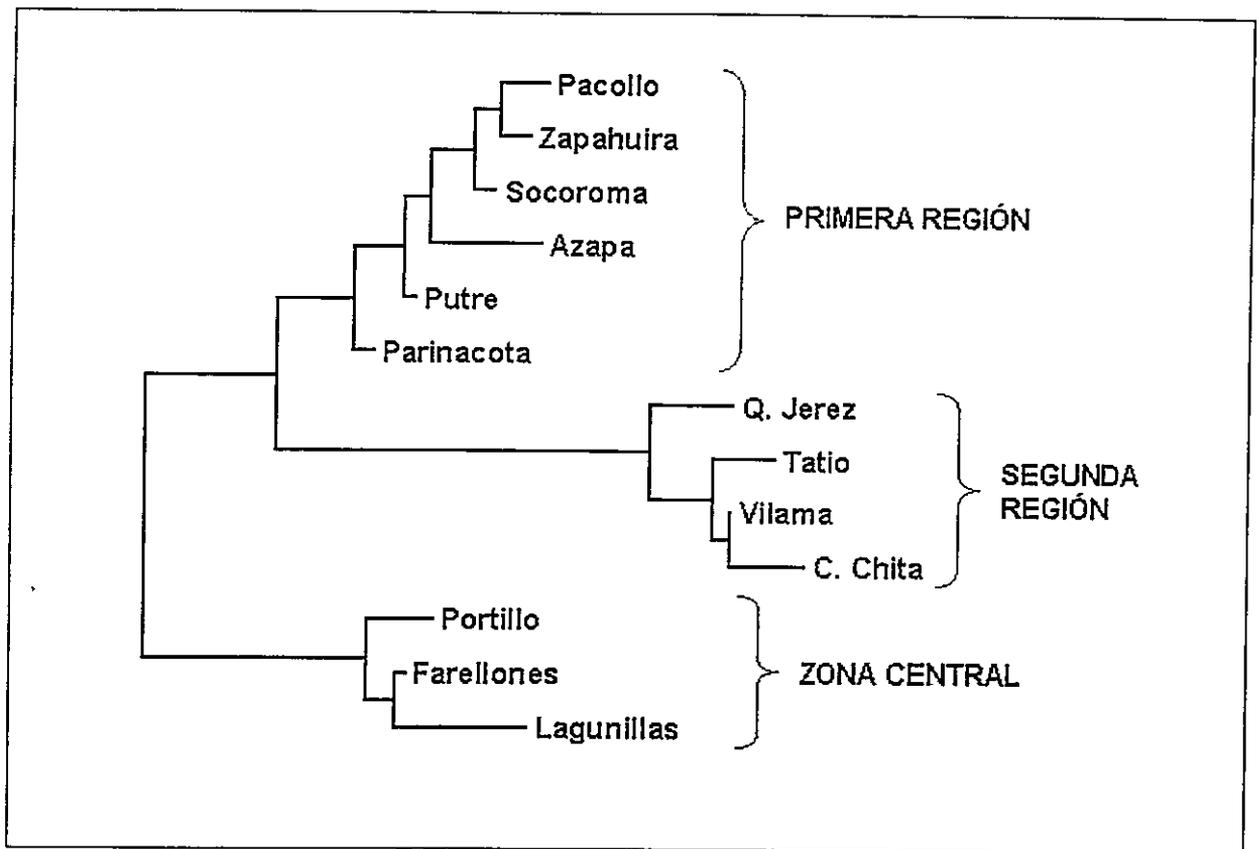


FIGURA 7: Árbol construido con Neighbor joining usando la distancia genética de Nei. Para calcular estas distancias promedio entre poblaciones se utilizaron sólo 71 bandas RAPDs.

**3.1.4 Coeficientes de diferenciación genética y flujo génico.** El resumen de los valores de diferenciación genética tanto para agrupaciones de poblaciones como para el total de individuos de *Bufo spinulosus* se muestra en la TABLA 4. De acuerdo a los criterios cualitativos sugeridos por Wright para los valores de  $G_{ST}$ , todas las agrupaciones consideradas muestran una alta diferenciación genética (mayor a 0,25). Las estimaciones de flujo génico ( $Nm$ ) son muy similares entre sí al considerar las regiones (promedio 0,845), pero son mayores que el valor estimado para el conjunto total (0,570).

**3.1.5 Prueba de Mantel.** Esta prueba mostró una significativa correlación entre las distancias geográficas y distancias de Nei entre poblaciones al realizar 1000 iteraciones ( $r = 0,7044$ ;  $P < 0,005$ ). Las distancias geográficas entre localidades se muestran en las TABLAS 5 y 6.

GRUPOS DE POBLACIONES	Nº DE EJEMPLARES	G <sub>ST</sub>	Nm
PRIMERA REGIÓN	41	0,3735	0,8387
SEGUNDA REGIÓN	40	0,3291	1,0193
ZONA CENTRAL	24	0,4251	0,6761
TOTAL	105	0,4675	0,5695

TABLA 4: Coeficientes de diferenciación genética (G<sub>ST</sub>) y número de migrantes (Nm) para agrupaciones de poblaciones y para la totalidad de ejemplares de *Bufo spinulosus*.

	FAR	POR	LAG	JER	TAT	VIL	CHI	PAR	PUT	SOC	PAC	ZAP	AZA
FAR	0	55,80	28,90	1.151,64	1.244,01	1.183,40	1.232,76	1.686,63	1.685,67	1.677,94	1.687,61	1.670,11	1.647,90
POR	0,102	0	83,67	1.095,87	1.188,28	1.127,68	1.177,07	1.631,72	1.630,85	1.623,24	1.632,86	1.615,41	1.593,65
LAG	0,099	0,130	0	1.179,30	1.271,81	1.211,24	1.260,64	1.715,20	1.714,21	1.706,58	1.716,23	1.698,75	1.676,66
JER	0,609	0,595	0,666	0	94,43	40,70	87,70	569,93	578,20	572,32	578,83	564,52	566,04
TAT	0,645	0,627	0,676	0,138	0	60,97	18,24	478,00	487,62	482,09	488,03	474,38	480,10
VIL	0,618	0,634	0,666	0,132	0,069	0	49,92	530,68	438,43	542,46	539,13	524,64	525,48
CHI	0,588	0,621	0,753	0,157	0,093	0,050	0	482,26	490,80	485,02	491,37	477,24	480,50
PAR	0,331	0,319	0,468	0,393	0,411	0,410	0,437	0	30,81	36,00	26,67	37,45	102,06
PUT	0,373	0,380	0,509	0,427	0,436	0,420	0,477	0,046	0	8,72	4,63	15,73	74,23
SOC	0,418	0,494	0,530	0,455	0,504	0,424	0,489	0,112	0,086	0	12,79	7,92	66,79
PAC	0,415	0,472	0,452	0,492	0,549	0,476	0,576	0,129	0,098	0,070	0	18,88	78,84
ZAP	0,376	0,437	0,451	0,490	0,525	0,442	0,537	0,156	0,106	0,050	0,052	0	64,68
AZA	0,492	0,505	0,595	0,500	0,514	0,512	0,584	0,152	0,088	0,111	0,161	0,148	0

TABLA 5: Distancias de Nei y distancias geográficas entre poblaciones. Los valores bajo la diagonal corresponden a las distancias de Nei promedio calculadas a partir de los marcadores RAPDs. Los valores sobre la diagonal corresponden a las distancias geográficas (km) entre localidades. Las poblaciones son indicadas por una abreviación de sus tres letras iniciales.

### 3.2 SECUENCIAS DE LA REGIÓN CONTROL.

**3.2.1 Patrones de diferenciación.** En la FIGURA 8 se muestra el árbol construido por NJ con las secuencias de los 50 ejemplares incluidos en este estudio. Los valores sobre los nodos en esta figura son los valores significativos (mayores que 50) de bootstrap. En este árbol puede apreciarse la separación de los individuos de *Bufo spinulosus* en tres grupos que corresponden a las tres Regiones consideradas (Primera Región, Segunda Región y Zona Central) con valores de bootstrap de 99 ó 100 y que se diferencian completamente de los ejemplares de *Bufo papillosus* (100% de bootstrap). Se observa, a diferencia del dendrograma construido con los marcadores RAPDs (FIGURA 6), un valor no significativo de bootstrap (36) para la agrupación de las Regiones del Norte. A nivel poblacional, sólo los individuos de Quebrada Jerez (Segunda Región) y los pertenecientes a las tres localidades de la Zona Central forman agrupaciones respaldadas por valores significativos de bootstrap, mientras que el resto, todos los ejemplares de la Primera Región y del resto de la Segunda Región (Tatio, Cuesta Chita y Vilama), se entremezclan. El árbol construido a partir de las distancias K2P promedio entre poblaciones (FIGURA 9) también muestra la separación de las poblaciones en las tres regiones anteriormente señaladas, pero a diferencia del árbol anterior, la Segunda Región y la Zona Central aparecen agrupadas. La topología en ambos árboles es la misma a nivel de poblaciones, con la separación de Quebrada Jerez del resto de las poblaciones de la Segunda Región y la misma agrupación de las poblaciones de la Zona Central.

**3.2.2 Pruebas de Mantel.** Estas pruebas muestran que existen correlaciones significativas tanto entre las distancias genéticas (K2P) promedio entre poblaciones (TABLA 6) y las distancias geográficas ( $r = 0,538$ ;  $P < 0,005$ ), así como entre las distancias genéticas calculadas para los marcadores RAPDs y las secuencias de la Región Control ( $r = 0,868$ ;  $P < 0,005$ ).

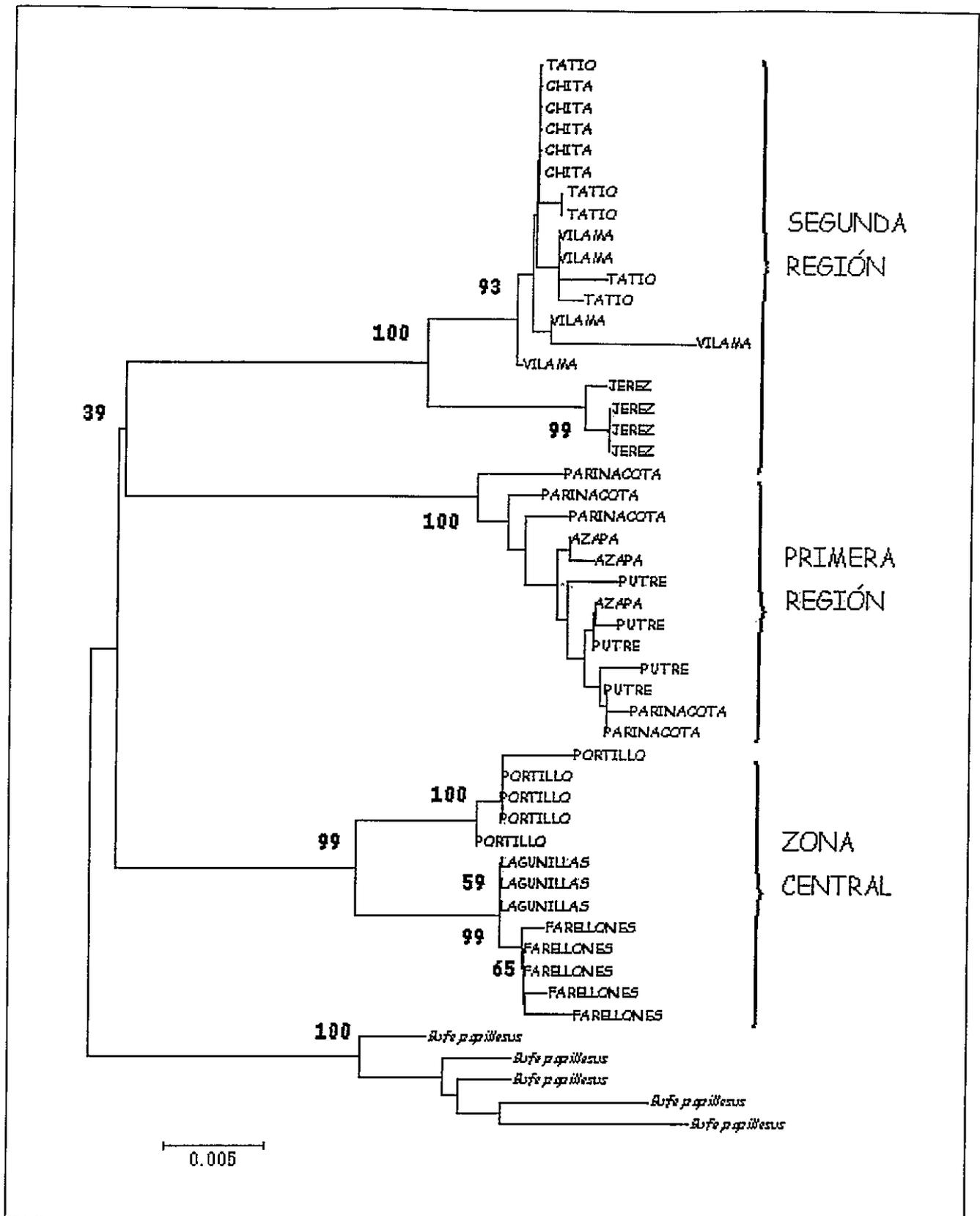


FIGURA 8: Árbol construido con Neighbor joining usando la distancia Kimura dos parámetros (K2P) entre ejemplares. Para calcular esta distancia se utilizaron 946 sitios nucleotídicos de la Región Control de 50 ejemplares de *Bufo spinulosus*. La barra representa la distancia K2P a lo largo de las ramas.

	FAR	POR	LAG	JER	TAT	VIL	CHI	PAR	PUT	AZA
FAR	0	55,80	28,90	1.151,64	1.244,01	1.183,40	1.232,76	1.686,63	1.685,67	1.647,90
POR	0,016	0	83,67	1.095,87	1.188,28	1.127,68	1.177,07	1.631,72	1.630,85	1.593,65
LAG	0,002	0,017	0	1.179,30	1.271,81	1.211,24	1.260,64	1.715,20	1.714,21	1.676,66
JER	0,044	0,042	0,042	0	94,43	40,70	87,70	569,93	578,20	566,04
TAT	0,044	0,040	0,042	0,013	0	60,97	18,24	478,00	487,62	480,10
VIL	0,044	0,040	0,042	0,014	0,004	0	49,92	530,68	438,43	525,48
CHI	0,042	0,040	0,040	0,012	0,002	0,003	0	482,26	490,80	480,50
PAR	0,046	0,044	0,044	0,046	0,045	0,046	0,045	0	30,81	102,06
PUT	0,047	0,045	0,045	0,048	0,047	0,048	0,047	0,006	0	74,23
AZA	0,045	0,044	0,044	0,047	0,046	0,046	0,046	0,006	0,003	0

TABLA 6: Distancias Kimura dos parámetros (K2P) promedio entre poblaciones y distancias geográficas entre localidades. Los valores bajo la diagonal corresponden a las distancias K2P calculadas a partir de las secuencias de la Región Control. Los valores sobre la diagonal corresponden a las distancias geográficas (km). Las poblaciones son indicadas por una abreviación de sus tres letras iniciales.

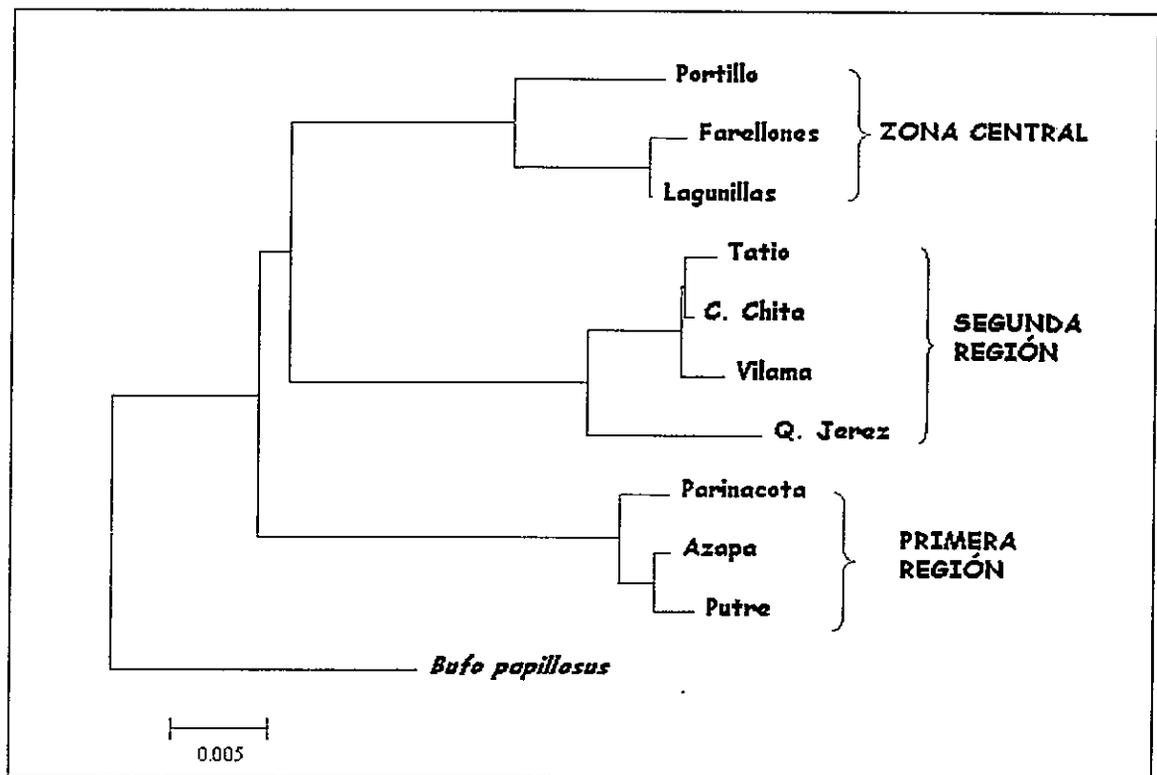


FIGURA 9: Árbol construido con Neighbor joining usando la distancia Kimura dos parámetros (K2P) promedio entre poblaciones. La barra representa la distancia K2P a lo largo de las ramas.

#### 4. DISCUSIÓN

Una de las ventajas principales de la técnica RAPD-PCR es que se puede obtener un gran número de marcadores anónimos a un costo relativamente bajo en comparación con otras técnicas (Parker y col., 1998). En este estudio se han obtenido un total de 85 bandas, número que es mayor al promedio (74) de marcadores usados en otros estudios poblacionales en que se usó esta técnica (Gibbs y col., 1994; Le Corre y col., 1997; Kirsten y col., 1998; Lou y col., 1998; Ritland y col., 2000 Tansley y Brown, 2000). Esta observación es importante ya que las estimaciones de coeficientes de diferenciación genética y el cálculo de distancias de Nei entre poblaciones dependen de las frecuencias genotípicas, valores que dependen a su vez de los niveles de polimorfismo detectables. Lynch & Milligan (1994) proponen varias fórmulas corregidas para calcular una serie de parámetros genéticos y disminuir de esta manera las desviaciones producidas en los cálculos debidas al carácter dominante de estos marcadores. Como una de sus conclusiones, ellos recomiendan eliminar de los análisis aquellas bandas con una frecuencia relativamente alta (mayor a  $1 - 3/N$ , donde N es el número de individuos por población), por lo que se hace necesario aumentar el número de *loci* para compensar esta pérdida de marcadores. Aunque este criterio no fue aplicado directamente en este estudio, se decidió excluir de los análisis genéticos 14 bandas presentes en muy alta frecuencia (considerando el total de individuos), como una forma de disminuir la desviación en los cálculos de frecuencias genotípicas mencionada por Lynch y Milligan.

Las 85 bandas utilizadas en los análisis de cluster permitieron distinguir entre sí a los 105 ejemplares utilizados en este estudio. Sin embargo, una comparación detallada de la distribución de bandas entre poblaciones y regiones, indica que no es posible diferenciar estas agrupaciones por la posesión o ausencia completa de determinadas bandas sino que la distinción radica en patrones de frecuencias característicos para cada

una de ellas. Esto podría deberse a que la resolución (número de bandas) alcanzada en este estudio no permitió hallar marcadores específicos para diferenciar cada una de las poblaciones o regiones, o efectivamente algunos grupos de poblaciones comparten determinados patrones de polimorfismo debido a un alto grado de similitud a nivel genético.

Los coeficientes de diferenciación genética ( $G_{ST}$ ) han sido usados ampliamente para describir la estructura genética de las poblaciones (Avise, 1994). Interpretados como una medida de diferenciación genética dentro de un modelo de aislamiento por distancia, en que las características genéticas adquiridas por las subpoblaciones (en este caso las localidades) están correlacionadas con las distancias que las separan, o como la reducción de heterocigocidad debido a la endogamia dentro de cada subpoblación, estos índices proveen una medida de la subestructuración genética dentro de una población (en este caso cada Región o el total de poblaciones) (Hartl y Clark, 1997). Los valores de estas medidas encontrados en este estudio (TABLA 4) indican que en todos los casos hay una alta diferenciación genética dentro de cada región, lo que podría explicarse por una efectiva separación espacial entre las poblaciones. Las estimaciones de flujo génico ( $Nm$ ) calculadas para cada una de las regiones indican un moderado flujo génico entre las poblaciones que las conforman de acuerdo a los criterios cualitativos sugeridos por Slatkin para interpretar estos valores (Slatkin, 1985). Teóricamente esto no concuerda con los altos valores de  $G_{ST}$  calculados para cada región, ya que para valores altos de subestructuración genética dentro de una población se esperarían valores bajos de flujo génico entre las subpoblaciones que la conforman (Avise, 1994). Esta relación parece cumplirse al considerar el conjunto total, donde se observa un valor mayor de  $G_{ST}$  y un valor menor de  $Nm$  con respecto a los calculados dentro de cada región, lo que podría explicarse por las grandes distancias geográficas que separan las regiones. Sin embargo, las interpretaciones derivadas de las estimaciones de  $Nm$  a partir de  $G_{ST}$  deben tomarse

con mucha precaución ya que la relación entre ambos parámetros radica en muchos supuestos que no corresponden a la situación real de las poblaciones (Whitlock y McCauley, 1999).

Aunque los valores de  $G_{ST}$  calculados son una indicación de un alto grado de subestructuración poblacional dentro de las regiones, estos datos no permiten determinar si es que alguna o algunas poblaciones se han diferenciado más del resto o si hay un patrón de diferenciación uniforme dentro de cada región. Las agrupaciones de individuos y poblaciones se pueden observar gráficamente en los árboles de las FIGURAS 6 y 7, en los que se aprecia la misma topología general, independientemente de la distancia usada o del método para construir el árbol. Aunque en todos los casos se observa una clara separación entre las poblaciones que conforman cada región, dentro de las regiones sólo algunas poblaciones se separan del resto, indicando que algunos grupos de poblaciones, especialmente en la Primera y en la Segunda Región, aparentemente no han alcanzado un nivel detectable de diferenciación genética o presentarían un nivel importante de flujo génico. Esta última interpretación presenta algunas dificultades debido a las condiciones extremas en la que estos animales habitan, especialmente la aridez en las Regiones del Norte (Veloso y col., 1982). En cuanto al patrón de diferenciación general, la clara separación entre las regiones del Norte y del Centro concuerda con el aislamiento geográfico postulado por Ceí (1962) para ambos grupos dentro de la especie *Bufo spinulosus*.

Una manera de determinar si la diferenciación genética observada se debe en parte a un efecto de aislamiento por distancia, es verificar si existe una correlación significativa entre las distancias genéticas calculadas y las distancias geográficas que separan cada localidad. La alta correlación observada en el prueba de Mantel usando los marcadores RAPDs ( $r = 0,7044$ ;  $P < 0,005$ ), indica que el patrón general de diferenciación se podría explicar en gran medida por las grandes distancias que separan las regiones.

En un estudio similar, Ritland y col. (2000), usaron estos marcadores para determinar el grado de estructura genética y su relación con la distancias geográficas entre varios grupos de poblaciones en *Ascaphus truei*, una especie de rana norteamericana. Estos autores encontraron una gran variación en los índices de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) y una heterogénea correlación entre las distancias genéticas y geográficas a diferentes escalas, lo cual es interpretado como resultado de un complejo patrón de expansiones y contracciones de rango geográfico que han afectado diferencialmente a las poblaciones consideradas. Contrastando con estos resultados, en este estudio se han encontrado valores similares de  $G_{ST}$  dentro de todas las Regiones y una significativa correlación entre las distancias genéticas y geográficas (a una escala regional), lo que concuerda, en la interpretación más simple, con una diferenciación genética provocada por un distanciamiento uniforme entre los individuos que conforman estas poblaciones (aislamiento por distancia). Es posible que el gran número de marcadores (169 *loci*) e individuos (469) usados por Ritland y colaboradores les hayan permitido postular tan complejo escenario de diferenciación.

Una de las herramientas más usadas para determinar el patrón de diferenciación filogeográfico entre poblaciones es la comparación de secuencias de genes mitocondriales (Avice, 1992). Aunque en este estudio no fue posible incluir ejemplares de todas las poblaciones usadas en los análisis con RAPDs, la variedad de individuos incluidos en estos análisis fue suficiente para analizar las diferencias dentro de las regiones anteriormente consideradas. En la FIGURA 8 se puede apreciar que el patrón general encontrado con la Región Control se asemeja mucho al obtenido a partir de los marcadores RAPDs (compárese con las FIGURA 6), con la diferencia de que en el árbol construido con todas las secuencias, la agrupación de los ejemplares de las Regiones Primeras y Segunda no está soportada por un valor significativo de bootstrap. A nivel poblacional (FIGURA 9), las poblaciones de la Segunda Región aparecen agrupadas con

las de la Zona Central, resultado que no concuerda con el patrón hallado con los marcadores RAPDs (FIGURA 7). Estos resultados no son incongruentes. Los marcadores RAPDs indican sólo los niveles de semejanza a nivel genético (por lo que no es de extrañar que las poblaciones del Norte se asemejen entre sí), mientras que las agrupaciones encontradas entre las secuencias pueden interpretarse como relaciones entre los linajes que habitan cada una de las zonas geográficas. La posición basal de las poblaciones de la Primera Región en la FIGURA 9, indica una relación ancestral con respecto a las poblaciones de la Segunda Región y la Zona Central, lo cual sugiere un origen septentrional para esta especie en Chile. La verificación de esta hipótesis requiere la inclusión de poblaciones de los países limítrofes, tanto de Perú, Bolivia y Argentina, y un muestreo más detallado a lo largo del rango de distribución en nuestro país.

Independientemente de la interpretación que podría derivarse de la diferenciación encontrada con la Región Control, es importante destacar que los marcadores mitocondriales permiten detectar linajes filogenéticamente separados por descendencia uniparental (indicando el grado de dispersión alcanzado por las hembras de la especie), por lo que estos resultados sugieren que las poblaciones que conforman estas regiones han alcanzado un nivel importante de divergencia y pertenecen a tres linajes diferentes. En cuanto al patrón de diferenciación interpoblacional, es interesante destacar que con este marcador tampoco se obtiene una completa separación entre las poblaciones de la Primera Región y algunas de la Segunda Región, lo que sugiere que algunos de estos linajes están estrechamente emparentados y se distribuyen ampliamente entre estas poblaciones. La significativa correlación entre la diferenciación encontrada con estos marcadores y la distancia geográfica entre las poblaciones consideradas en este estudio, sugiere que existe una marcada estructura filogeográfica (*sensu* Avise y col., 1987) a lo largo de un gradiente latitudinal.

La alta correlación entre los patrones de diferenciación genética encontrados con ambos marcadores puede interpretarse como el resultado de la filopatría (tendencia de los organismos a permanecer y reproducirse en los mismos lugares de nacimiento) que muestra este tipo de animales, especialmente en hábitat extremos (Duellman & Trueb, 1994). La evidente estructuración filogeográfica encontrada con la Región Control, sugiere que distintos linajes maternos han permanecido relativamente aislados alcanzando los niveles de divergencia detectados en este estudio. Por otra parte, los marcadores nucleares, que podrían dar una indicación de la capacidad de dispersión de ambos sexos entre las poblaciones, muestran una marcada subestructuración, sugiriendo que los niveles de flujo génico actuales o pasados no han tenido un importante efecto homogeneizador a nivel genético. Esto puede explicar en gran parte el patrón general de diferenciación genética, que concuerda con la diferenciación morfológica a lo largo de un gradiente latitudinal anteriormente documentada, pero es evidente que a una escala menor otros procesos han determinado la falta de diferenciación, tanto morfológica como genética, entre algunas poblaciones, particularmente en las poblaciones de la Primera Región y algunas de la Segunda Región.

En un contexto más general, el uso de marcadores moleculares constituye el primer paso para inferir los procesos históricos o demográficos que determinan la distribución de la variabilidad genética a nivel intraespecífico. Esta información, en un marco teórico adecuado, permitiría establecer la importancia relativa de las distintas fuerzas que moldean la evolución en poblaciones naturales y contribuir al entendimiento de los procesos que llevan a la aparición y mantenimiento de la biodiversidad. Además, el conocimiento de la estructura genética dentro de una especie puede servir de base para investigar e identificar los procesos adaptativos que producen la alta variabilidad de formas intraespecíficas que se pueden observar en la mayoría de las especies.

Finalmente, los estudios de variación genética a nivel intraespecífico, pueden servir de base para la identificación de organismos prioritarios desde un punto de vista conservacionista. Esto permitiría concentrar los esfuerzos en aquellas especies que presenten una menor diversidad o aquellas poblaciones con características particulares, cuya desaparición significaría una pérdida de la variabilidad genética a nivel intraespecífico. Los resultados del presente estudio indican que *Bufo spinulosus* presenta un alto nivel de variación genético a nivel interpoblacional, por lo que la posibilidad de que algunas poblaciones desaparezcan provocaría una disminución de la diversidad genética de la especie. Aunque al parecer esta anfibio es relativamente abundante y puede sobrevivir en ambientes acuáticos alterados (observaciones personales), la desaparición sistemática de estos sistemas puede potencialmente provocar la pérdida de algunas poblaciones. Lamentablemente, nada se puede decir acerca de la variabilidad genética en otras especies de anfibios chilenos, algunas de las cuales son endémicas y con un restringido rango de distribución, ya que hasta la fecha no se ha estudiado su variabilidad desde este punto de vista.

## 5. CONCLUSIONES

- El número de bandas RAPDs usadas en este estudio y el nivel de polimorfismo detectado con estos marcadores, permiten diferenciar claramente tres grupos de poblaciones en *Bufo spinulosus* que corresponden a las Regiones Primera, Segunda y Zona Central.
- Dentro de estas regiones sólo algunas poblaciones pueden diferenciarse del resto, lo que podría indicar que las poblaciones que aparecen mezcladas no han alcanzado un nivel detectable de diferenciación genética debido probablemente al efecto de algún proceso de homogeneización genética (por ejemplo, flujo génico).
- Los coeficientes de diferenciación genética estimados a partir de los marcadores RAPDs para las distintas regiones consideradas en este estudio (Primera, Segunda y Zona Central) y para el conjunto total de individuos, indican un alto grado de subestructuración genética dentro de estas agrupaciones, lo que concuerda con el patrón general de diferenciación hallado a partir de las distancias genéticas calculadas.
- El patrón de diferenciación encontrado con los marcadores RAPDs está altamente correlacionado con las distancias geográficas que separan las localidades consideradas, lo cual puede interpretarse como resultado de la diferenciación genética producida por el distanciamiento entre los individuos (tanto machos como hembras) que conforman cada una de las poblaciones dentro del marco de un modelo de aislamiento por distancia.

- Las secuencias de la Región Control sugieren que hay un alto nivel de divergencia entre los linajes maternos detectados dentro las tres regiones consideradas y entre algunas poblaciones dentro de estas regiones (particularmente, Quebrada Jerez (Segunda Región) y las poblaciones de la Zona Central).
- A nivel poblacional y regional, un patrón de diferenciación similar puede ser observado con este marcador al compararlo con el patrón hallado con los marcadores RAPDs, lo cual sugiere una marcada estructuración filogeográfica para esta especie en Chile.
- La significativa correlación entre los niveles de diferenciación genética hallados con ambos marcadores, así como entre cada marcador y las distancias geográficas que separan las distintas localidades, permiten sugerir que la diferenciación genética encontrada entre estas poblaciones está determinada en gran medida por la separación geográfica que las separan según un modelo de aislamiento por distancia, verificando de esta manera las hipótesis planteadas inicialmente.
- Los resultados del presente estudio permitirían explicar en gran parte los patrones latitudinales de diferenciación morfológica descritos anteriormente y podrían servir como base para establecer los procesos genéticos que han determinado la alta diversidad morfológica que presenta esta especie a nivel poblacional.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Avise, J. 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*. **63**: 62-76.
- Avise, J. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Reeb, C. A. y Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.
- Cei, J. M. 1960. Geographic Variation of *Bufo spinulosus* in Chile. *Herpetologica*. **16**(4): 143-250.
- Cei, J. M. 1961. *Bufo arunco* (Molina) y las formas chilenas de *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Inv. Zool. Chilenas*. Volumen VII.
- Cei, J. M. 1962. *Batracios de Chile*. Ed. Universidad de Chile.
- Cei, J. M. 1972. *Bufo* of South America. En Blair, W. F. (ed.), *Evolution in the genus Bufo*, pp. 82-92. University of Texas Press, Austin.
- Clark, A. G. y Lanigan, C. M. S. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 1096-1111.
- Duellman W. y Trueb L. 1994. *Biology of amphibians*. The Johns Hopkins Press Ltd., London.
- Encalada, S.; Lahanas, P.; Bjorndal, K.; Bolten, A.; Miyamoto, M. y Bowen, B. 1996. Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Mol. Ecol.* **5**: 473-483.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**: 783-791.
- Gibbs, H.; Prior, K. y Weatherhead, P. 1994. Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. *Mol. Ecol.* **3**: 329-337.
- Goebel, A. M.; Donnelly, J. M. y Atz, M. E. 1999. PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome *b* in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Mol. Phylogenet. Evol.* **11**: 163-199.
- Griffiths, A.; Miller, J.; Susuki, D.; Lewontin, R. y Gelbart, W. 1993. *Introducción al análisis genético*. Quinta edición, Ed. Interamericana/McGraw-Hill, España.

- 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. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hartl, D. y Clark, A. 1997. *Principles of Population Genetics*. Tercera edición, Sinauer Associates, Inc.
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of populations*. Segunda Edición, Jones and Bartlett.
- Kirsten, J.; Dawes, C. y Cochrane, B. 1998. Randomly amplified polymorphism detection (RAPD) reveals high genetic diversity in *Thalassia testudinum* banks ex König (Turtlegrass). *Aquat. Bot.* **61**: 269-287.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I. y Nei, M. 2001. MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Análisis, Versión 2.1.
- Kvist, L.; Ruokonen, M.; Lumme, J. y Orell, M. 1999. Different population structures in northern and southern populations of the European blue tit (*Parus caeruleus*). *J. Evol. Biol.* **12**: 798-805.
- Le Corre, V.; Dumolin-Lapègue, S. y Kremer, A. 1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. *Mol. Ecol.* **6**: 519-529.
- Liedloff, A. 1999. MANTEL, Mantel nonparametric test calculator, Versión 2.0.
- Lou, K.; Weiss, M. J.; Bruckner, W. L.; Morrill, L. E.; Talbert, L. E. y Martin, J. M. 1998. RAPD variation within and among geographic populations of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton). *J. Hered.* **89**: 329-335.
- Lynch, M. y Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* **3**: 91-99.
- McCarthy, C. 1998. CHROMAS 1.45. School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australia.
- Méndez, M. Septiembre de 2000. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias: "El canto de liberación en el grupo *spinulosus*: consideraciones morfológicas e históricas". Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Méndez, M.; Vergara, E. y Veloso, A. *In litteris*. Morphologic variation in populations of *Bufo spinulosus* and *Bufo atacamensis* (ANURA:BUFONIDAE) along their geographic range in Chile.
- Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta and Center for International Forestry Research. 1997. POPGENE, Population Genetic Analysis. Versión 1.32.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **60**: 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* **89**: 583-590.

- Nei, M y Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Nei, M. y Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 5269-5273.
- Ortiz, J. C.; Quintana, V. y Ibarra-Vidal, H. 1994. *Vertebrados terrestres con problemas de conservación en la cuenca del Biobío y mar adyacente*. Ediciones Universidad de Concepción.
- Page, R. 2001. TREEVIEW, Versión 1.6.5.
- Parker, P.; Snow, A.; Schug, M.; Booton, G. y Fuerst, P. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. **79**: 361-382.
- Pavlièek, A., Pavlièek, T. y Flegr, J. 1999. FREETREE, prerelease version, Versión 0.9.1.50. *Folia Biologica (Praha)*. **45**: 97-99.
- Ritland, K.; Dupuis, L.; Bunnell, F.; Hung, W. y Carlson, J. 2000. Phylogeography of the tailed frog (*Ascaphus truei*) in British Columbia. *Can. J. Zool.* **78**: 1749-1758.
- Rogers, D. J. y Tanimoto, T. T. 1960. A computer program for classifying plants. *Science*. **132**: 1115-1118.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- SatSoft, Inc. 1997. STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK.
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*. **39**: 53-65.
- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* **15**: 199-203.
- Tansley, S. A. y Brown, C. R. 2000. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation. *Biol. Conserv.* **95**: 39-48.
- Thompson, J.; Higgins, D. y Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progresive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Vellard, J. 1959. Estudios sobre batracios andinos, V. El género *Bufo*. *Memor. Museo Hist. Nat. Javier Prado*. Lima, 8, 48 pp., 14 pl.
- Veloso, A.; Sallaberry, M.; Navarro, J.; Iturra, P.; Valencia, J.; Penna, M. y Díaz, N. 1982. Contribución sistemática al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile. *En El hombre y los ecosistemas de montaña*, pp. 135-265. MAB-6.

Veloso, A. y Navarro J. 1988. Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. *Boll. Mus. Reg. Sci. Nat. Torino*. 6: 481-539.

Walker, D.; Burke, V. J.; Barák, I. y Avise, J. C. 1995. A comparison of mtDNA restriction sites vs. control region sequences in phylogeographic assessment of the musk turtle (*Sternotherus minor*). *Mol. Ecol.* 4: 365-373.

Welsh, J. y McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.

Whitlock, M. y McCauley, D. 1999. Indirect measures of flow and migration:  $F_{ST} \approx 1 / (4Nm + 1)$ . *Heredity*. 82: 117-125.

Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

Williams, J. G. K.; Hanafey, M. K.; Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* 218: 704-740.





# PARTIDOR OPB-11

BANDA	P.B.	AZAPA					PARINACOTA							PUTRE										
		2877	2878	2879	2884	2885	2886	2705	2709	2710	2711	2712	2721	2722	2681	2682	2683	2703	2704	2707	2708	2720	2752	Put1
B-11.1	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.2	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.3	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.4	1110	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-11.5	1020	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.6	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.7	730	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.8	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-11.9	550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-11.10	440	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B-11.11	420	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0

BANDA	P.B.	ZAPAHUIRA					SOCOROMA				PACOLLO								
		1	2	3	4	5	2759	2760	2698	2699	2700	2743	2744	2745	2746	2747	1	2	3
B-11.1	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B-11.2	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.3	1200	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.4	1110	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B-11.5	1020	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.6	900	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B-11.7	730	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.8	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-11.9	550	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-11.10	440	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.11	420	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0

BANDA	P.B.	VILAMA								C. CHITA												
		2335	2814	2817	2618	2822	2632	2634	2663	2694	2701	2598	2599	2635	2636	2637	2674	2676	2691	2692	2697	
B-11.1	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.2	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.3	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.4	1110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
B-11.5	1020	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.6	900	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
B-11.7	730	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.8	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-11.9	550	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B-11.10	440	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.11	420	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

BANDA	P.B.	TATIO								Q. JEREZ												
		2149	2802	2803	2604	2611	2638	2839	2666	2668	2669	2828	2629	2630	2831	2662	2689	2690	2714	2715	2718	
B-11.1	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.2	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.3	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.4	1110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
B-11.5	1020	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.6	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B-11.7	730	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.8	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-11.9	550	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-11.10	440	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.11	420	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

BANDA	P.B.	FARELONES										PORTILLO								LAGUILLAS					
		2536	2538	2684	2665	2687	2688	2729	2731	Jun 3	Ma 11	2648	2647	2649	2650	2651	2652	2657	2658	2659	2660	2648	2653	2673	2717
B-11.1	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.2	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.3	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.4	1110	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-11.5	1020	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.6	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.7	730	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B-11.8	650	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
B-11.9	550	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B-11.10	440	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B-11.11	420	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ANEXO 1: Continuación.



# PARTIDOR OPG-06

		AZAPA					PARIHACOTA						PUTRE											
BANDA	P.B.	2677	2678	2679	2684	2685	2686	2705	2709	2710	2711	2712	2721	2722	2881	2882	2883	2703	2704	2707	2708	2720	2752	Punt
G-06.1	1220	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
G-06.2	1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.3	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.4	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.5	950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.6	910	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.7	850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.8	830	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.9	810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.10	740	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.11	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.12	680	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.13	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.14	520	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1

		ZAPAHUIRA					SOCOROMA					PACOLLO								
BANDA	P.B.	1	2	3	4	5	2759	2780	2698	2699	2700	2743	2744	2745	2746	2747	1	2	3	
G-06.1	1220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.2	1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.3	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.4	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.5	950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.6	910	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.7	850	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.8	830	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.9	810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.10	740	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.11	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.12	680	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.13	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.14	520	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0

		VILAMA										C. CHITA										
BANDA	P.B.	2335	2614	2617	2618	2622	2632	2634	2663	2694	2701	2598	2599	2635	2638	2637	2674	2676	2691	2692	2697	
G-06.1	1220	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.2	1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.3	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.4	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.5	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.6	910	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.7	850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.8	830	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.9	810	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.10	740	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.11	700	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.12	680	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.13	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.14	520	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		TATIO								Q. JEREZ												
BANDA	P.B.	2149	2602	2603	2604	2611	2638	2639	2666	2668	2669	2628	2629	2630	2631	2662	2689	2690	2714	2715	2716	
G-06.1	1220	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.2	1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.3	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.4	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.5	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.6	910	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.7	850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.8	830	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.9	810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.10	740	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.11	700	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.12	680	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.13	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.14	520	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		FARELLONES										PORTILLO							LAGUNILLAS						
BANDA	P.B.	2536	2538	2664	2665	2687	2688	2729	2731	Jun 3	Ma 11	2646	2647	2649	2650	2651	2652	2657	2658	2659	2660	2648	2653	2673	2717
G-06.1	1220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.2	1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.3	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.4	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.5	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.6	910	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.7	850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.8	830	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.9	810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.10	740	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.11	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-06.12	680	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.13	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-06.14	520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ANEXO 1: Continuación.

# PARTIDOR OPG-14

BANDA	P.B.	AZAPA					PARINACOTA										PUTRE									
		2677	2678	2679	2684	2685	2686	2705	2709	2710	2711	2712	2721	2722	2681	2682	2683	2703	2704	2707	2708	2720	2752	Pu11		
G-14.1	1000	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G-14.2	890	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
G-14.3	770	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1		
G-14.4	750	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
G-14.5	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
G-14.6	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
G-14.7	620	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
G-14.8	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
G-14.9	580	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G-14.10	520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
G-14.11	410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
G-14.12	390	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

BANDA	P.B.	ZAPAHUIRA					SOCOROMA					PACOLLO								
		1	2	3	4	5	2759	2760	2698	2699	2700	2743	2744	2745	2746	2747	1	2	3	
G-14.1	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-14.2	890	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.3	770	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-14.4	750	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
G-14.5	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.6	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.7	620	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.8	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.9	580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-14.10	520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.11	410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.12	390	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

BANDA	P.B.	VILAMA										C. CHITA										
		2335	2614	2617	2618	2622	2632	2634	2663	2694	2701	2598	2599	2635	2636	2637	2674	2676	2691	2692	2697	
G-14.1	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
G-14.2	890	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.3	770	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
G-14.4	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.5	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.6	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-14.7	620	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.8	600	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.9	580	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.10	520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.11	410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.12	390	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

BANDA	P.B.	TATIO										Q. JÉREZ										
		2149	2602	2603	2604	2611	2638	2639	2666	2668	2669	2628	2629	2630	2631	2662	2690	2689	2714	2715	2716	
G-14.1	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.2	890	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.3	770	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
G-14.4	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.5	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.6	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-14.7	620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.8	600	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.9	580	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
G-14.10	520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.11	410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G-14.12	390	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

BANDA	P.B.	FARELLONES										PORTILLO										LAGUNILLAS				
		2536	2538	2664	2665	2657	2658	2729	2731	Juv 3	Ma 11	2646	2647	2649	2650	2651	2652	2657	2658	2659	2660	2648	2653	2673	2717	
G-14.1	1000	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
G-14.2	890	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
G-14.3	770	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G-14.4	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
G-14.5	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
G-14.6	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
G-14.7	620	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
G-14.8	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
G-14.9	580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G-14.10	520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
G-14.11	410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
G-14.12	390	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

ANEXO 1: Continuación.

BANDA	FAR	POR	LAG	JER	TAT	VIL	CHI	PAR	PUT	SOC	PAC	ZAP	AZA	I REGIÓN	II REGIÓN	CENTRO
B-08.1	0,000	0,000	0,000	0,684	1,000	1,000	1,000	0,684	0,452	1,000	0,293	0,622	1,000	0,621	0,921	0,000
B-08.2	1,000	1,000	1,000	0,051	0,000	0,163	0,368	0,293	0,163	0,368	0,592	0,622	0,184	0,362	0,146	1,000
B-08.3	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,106	0,684	1,000	0,423	1,000	1,000	0,620	1,000	1,000
B-08.4	1,000	0,684	1,000	1,000	1,000	0,553	0,684	0,684	0,553	1,000	1,000	1,000	1,000	0,814	0,809	0,868
B-08.5	0,106	1,000	1,000	0,106	0,293	0,163	0,106	0,163	0,163	0,225	0,293	0,244	0,423	0,223	0,167	0,627
B-08.7	0,684	1,000	1,000	0,000	0,051	0,225	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,069	0,868
B-08.8	1,000	0,684	1,000	1,000	0,452	0,553	1,000	0,684	0,452	1,000	0,592	0,345	1,000	0,618	0,751	0,868
B-08.9	0,051	0,000	0,000	1,000	0,553	1,000	1,000	0,553	0,684	1,000	1,000	1,000	1,000	0,814	0,888	0,021
B-08.10	0,452	0,163	0,134	0,051	0,163	0,293	0,553	0,452	0,553	0,553	1,000	1,000	0,423	0,661	0,265	0,279
B-08.11	0,452	0,684	1,000	1,000	1,000	1,000	0,163	0,684	1,000	0,553	1,000	1,000	1,000	0,868	0,791	0,640
B-08.12	0,000	0,163	0,000	0,000	0,553	0,684	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,559	0,068
B-08.13	1,000	1,000	1,000	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	1,000
B-08.14	1,000	0,553	1,000	0,684	0,225	0,452	0,293	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,414	0,814
B-08.15	0,000	0,000	0,000	0,452	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,087	0,000	0,000	0,013	0,113	0,000
B-08.16	0,452	0,452	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,423	0,000	1,000	0,062	0,000	0,544
B-08.17	0,684	0,293	1,000	0,553	0,000	0,368	0,000	0,368	0,293	0,553	1,000	0,622	0,184	0,495	0,230	0,574
B-10.1	1,000	1,000	1,000	0,553	0,452	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,751	1,000
B-10.2	1,000	1,000	1,000	0,553	0,553	0,684	1,000	1,000	1,000	1,000	0,592	1,000	1,000	0,940	0,697	1,000
B-10.3	1,000	1,000	1,000	0,452	0,553	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,751	1,000
B-10.4	1,000	1,000	1,000	1,000	0,452	1,000	1,000	1,000	0,684	1,000	0,592	1,000	1,000	0,863	0,863	1,000
B-10.5	0,163	0,163	0,000	0,225	0,163	0,106	0,051	0,452	0,553	1,000	0,592	0,074	1,000	0,540	0,136	0,136
B-10.6	1,000	1,000	1,000	0,368	0,225	0,225	0,452	0,000	0,000	0,000	0,087	0,074	0,000	0,025	0,318	1,000
B-10.7	0,452	0,163	0,000	0,106	0,368	0,452	0,368	1,000	0,684	1,000	1,000	0,622	1,000	0,858	0,323	0,257
B-10.8	1,000	0,553	1,000	0,163	0,553	0,684	0,684	0,000	0,225	1,000	1,000	1,000	0,000	0,495	0,521	0,814
B-10.9	1,000	0,293	1,000	0,051	0,293	0,225	0,452	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,256	0,705
B-10.10	0,000	0,163	0,000	1,000	0,000	0,051	0,106	0,051	0,000	0,000	0,000	0,074	0,000	0,025	0,289	0,068
B-10.11	0,000	0,000	0,000	1,000	0,452	0,684	0,684	0,684	0,684	1,000	1,000	1,000	1,000	0,846	0,705	0,000
B-10.12	1,000	0,684	1,000	0,000	0,163	0,000	0,000	0,163	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,041	0,868
B-10.13	0,000	0,106	0,000	0,051	1,000	0,684	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,684	0,044
B-10.14	0,000	0,000	0,134	0,051	1,000	1,000	1,000	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,763	0,022
B-10.15	0,000	0,000	0,000	0,000	0,163	0,684	0,684	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,383	0,000

ANEXO 2: Frecuencias del alelo "presencia de banda" para las 71 bandas consideradas en los análisis genéticos en poblaciones y Regiones consideradas para *Bufo spinulosus*. Las localidades de se indican por las tres letras iniciales.

BANDA	FAR	POR	LAG	JER	TAT	VIL	CHI	PAR	PUT	SOC	PAC	ZAP	AZA	I REGIÓN	II REGIÓN	CENTRO
B-11.4	0,051	0,000	0,293	0,368	1,000	1,000	0,553	0,000	0,051	0,000	0,087	0,466	0,423	0,136	0,730	0,070
B-11.6	1,000	1,000	1,000	0,684	1,000	0,684	0,684	1,000	1,000	0,368	0,000	0,000	0,000	0,606	0,763	1,000
B-11.8	0,452	0,293	0,134	0,000	0,000	0,000	0,000	0,051	0,051	0,000	0,000	0,074	1,000	0,038	0,000	0,333
B-11.9	0,684	0,368	1,000	0,106	0,051	0,106	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000	0,074	0,000	0,013	0,078	0,605
B-11.10	0,051	0,051	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,225	0,684	1,000	0,592	1,000	1,000	0,674	1,000	0,043
B-11.11	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,452	0,106	0,000	0,184	0,000	0,000	0,163	0,000	1,000
G-05.1	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,293	0,553	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,073	0,711	0,000
G-05.3	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,452	1,000	0,592	1,000	0,000	0,734	0,000	1,000
G-05.4	0,051	0,106	0,000	0,051	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,013	0,065
G-05.5	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
G-05.6	1,000	1,000	0,500	1,000	0,684	0,553	1,000	0,553	0,684	0,000	0,087	0,000	0,000	0,314	0,809	0,917
G-05.7	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,423	1,000	1,000	0,916	1,000	0,833
G-05.8	0,051	0,051	1,000	1,000	0,684	1,000	0,452	0,293	0,163	1,000	1,000	1,000	0,000	0,550	0,784	0,209
G-05.9	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,452	0,452	1,000	0,592	1,000	1,000	0,673	0,000	1,000
G-05.10	0,000	0,000	0,000	1,000	0,368	0,368	0,368	0,368	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,090	0,526	0,000
G-05.11	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,684	1,000	0,553	0,163	0,000	0,087	0,244	0,000	0,229	0,921	1,000
G-05.12	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,466	1,000	0,909	0,000	0,000
G-05.13	1,000	0,106	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,452	0,452	1,000	1,000	1,000	1,000	0,733	1,000	0,627
G-05.14	0,684	0,684	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,927	1,000	0,653
G-05.15	0,000	0,051	0,134	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,293	0,553	0,087	0,622	0,423	0,289	0,000	0,044
G-05.16	0,368	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,051	0,225	0,106	0,293	0,155	0,184	0,163	0,000	0,153

ANEXO 2: Continuación.

BANDA	FAR	POR	LAG	JER	TAT	VIL	CHI	PAR	PUT	SOC	PAC	ZAP	AZA	I REGIÓN	II REGIÓN	CENTRO
G-06.1	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,051	0,106	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038	1,000	0,000
G-06.4	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,051	0,106	0,000	0,293	0,000	0,184	0,095	1,000	0,000
G-06.5	1,000	0,368	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	0,163	0,225	0,106	0,000	0,155	0,000	0,134	1,000	0,653
G-06.6	0,553	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,452	0,684	0,225	0,592	0,244	1,000	0,506	0,000	0,814
G-06.7	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,423	0,622	1,000	0,851	1,000	0,000
G-06.8	0,000	0,000	0,134	0,000	0,000	0,000	0,000	0,368	1,000	0,553	1,000	1,000	1,000	0,791	0,000	0,022
G-06.9	0,000	0,000	0,000	0,553	0,163	1,000	1,000	0,000	0,000	0,106	0,000	0,000	0,000	0,013	0,679	0,000
G-06.10	1,000	0,051	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,605
G-06.11	0,000	0,293	0,000	1,000	0,225	0,553	1,000	0,051	0,051	0,000	0,087	0,074	0,000	0,050	0,695	0,122
G-06.12	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,684	0,684	0,368	1,000	1,000	1,000	0,769	0,000	1,000
G-06.14	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,553	0,368	0,553	0,592	1,000	1,000	0,622	0,000	1,000
G-14.1	0,163	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,452	0,225	0,000	0,000	0,000	0,000	0,184	0,068	0,863	0,651
G-14.3	0,051	0,000	1,000	0,553	1,000	0,368	0,553	0,106	0,225	0,000	0,184	0,074	0,000	0,120	0,614	0,188
G-14.4	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,684	1,000	1,000	0,684	0,553	0,423	0,466	0,423	0,650	0,921	1,000
G-14.6	1,000	0,684	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,368	1,000	1,000	0,592	1,000	1,000	0,786	0,000	0,868
G-14.7	0,293	1,000	0,293	1,000	1,000	0,452	1,000	0,368	0,051	0,225	0,423	0,244	0,000	0,233	0,863	0,588
G-14.8	1,000	1,000	1,000	1,000	0,225	0,553	0,553	0,684	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,923	0,583	1,000
G-14.9	0,000	0,000	0,000	0,000	0,553	0,553	0,684	0,106	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,447	0,000
G-14.12	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,051	0,000	0,000	0,184	0,000	0,000	0,039	1,000	0,000

ANEXO 2: Continuación.