



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**Facultad de Ciencias Forestales**  
**Magíster Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza**



**RELACIÓN ENTRE EL PAISAJE Y LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE**  
***Rhinella spinulosa* (ANURA: BUFONIDAE)**  
**EN LA REGIÓN DE ANTOFAGASTA, CHILE**

Proyecto de grado presentado como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza.

**CAROLINA EVELYN GALLARDO GARRIDO**

Médico Veterinaria

Santiago, Chile

2009

Proyecto de grado presentado como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza.

Profesor Guía	Nombre	Marco Antonio Méndez Torres
	Nota	7.0
	Firma	_____

Profesor Guía	Nombre	Héctor Jaime Hernández Palma
	Nota	7.0
	Firma	_____

Profesor Consejero	Nombre	Cristián Estades Marfán
	Nota	7.0
	Firma	_____

Profesor Consejero	Nombre	Rodolfo Gajardo Michell
	Nota	6.5
	Firma	_____

## **Agradecimientos**

A mi madre por su apoyo incondicional. A Lorenzo por su cariño y fuerza que me ayudó a terminar este trabajo. A mis profesores guía Marco Méndez y Jaime Hernández que me ayudaron a realizar este trabajo y sortear todas las dificultades que se presentaron con mucha paciencia y dedicación. A mis compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución: Luis, Claudio, Paola, Mónica, Alejandro, Gonzalo por su gran ayuda y disposición ante mis repetidas dudas y a Pamela, Marjorie, Marcela por su compañía. A mis compañeros del laboratorio de Geomática y Ecología del Paisaje: Daniel por su valiosa colaboración, Andrea, Nélide, Marjorie, Benito. A mis profesores correctores Cristián Estades y Rodolfo Gajardo por su gran contribución al trabajo final. Muy especialmente quiero agradecer a las Becas de estancias cortas de investigación, al profesor José Alexandre Felizola Diniz-Filho por su gran motivación, a todos y cada uno de los alumnos y profesores del departamento de Biología General de la Universidad Federal de Goiás, especialmente a Bruno y Ghillerme por su alegría y a Fernanda, Marília y Sara por su gran acogida. Finalmente quiero agradecer al proyecto FONDECYT 1061256 que financió gran parte de este trabajo de investigación.

# Índice

Índice.....	i
Lista de Tablas.....	ii
Lista de Figuras.....	iv
Resumen.....	v
Summary.....	vi
Introducción.....	1
Material y Métodos.....	4
Resultados.....	11
Discusión.....	23
Referencias.....	26

## Lista de Tablas

**Tabla 1.** Localidades de muestreo de *Rhinella spinulosa*. Se indica el tamaño muestral (n), la altitud y la ubicación según cuenca y subcuenca.

**Tabla 2.** Diferenciación genética ( $F_{st}$ ) entre las localidades de muestreo de *Rhinella spinulosa* utilizando como marcador genético mtDNA. En negrita están los valores estadísticamente significativos de  $F_{st}$  ( $P = 0,05$ ). Sobre la diagonal se muestra la distancia en línea recta (km) entre las localidades. Las cuencas se muestran en gris y las subcuencas con líneas punteadas.

**Tabla 3.** Resultado del análisis de varianza molecular (AMOVA) con 10.000 permutaciones, dividiendo las poblaciones donde habita *Rhinella spinulosa* en cuencas y subcuencas. Los valores estadísticamente significativos están indicados con un asterisco.

**Tabla 4.** Resultado del análisis de componentes principales de 15 variables bioclimáticas asociadas a 16 localidades. Se muestran las cargas de cada variable en los primeros dos componentes y la proporción de varianza explicada por cada componente.

**Tabla 5.** Resultado del procedimiento de selección del mejor modelo, utilizando el criterio de información de Akaike (AICc), para explicar la diferenciación genética entre las localidades donde habita *Rhinella spinulosa*. Se muestran el mejor modelo para cada ruta y cada una de las rutas sin las variables ambientales. Las rutas simulan el movimiento entre localidades. DAICc es la diferencia entre el valor de AICc del modelo y el valor mínimo de AICc encontrado entre todos los modelos, AICc  $w_i$  es la probabilidad de ser el modelo verdadero,  $r^2$  es la cantidad de diferenciación genética explicada por cada modelo.

**Tabla 6.** Explicación de los cálculos de los componentes parciales basado en Lobo *et al.* 2002 para un conjunto de tres variables independientes. Las variables independientes analizadas aquí: diferencia de temperatura media anual (T), diferencia de altitud (A) y distancia en línea recta o euclidiana (D), corresponden al mejor modelo que explicó la diferenciación genética entre las poblaciones de *Rhinella spinulosa* en el altiplano de la Región de Antofagasta, según los criterios de AIC. La variable dependiente fue  $F_{st}$  (F). En cada paso la variable dependiente es modelada contra las variables independientes en un modelo de regresión lineal, siendo  $r^2$  interpretado como la fracción de la varianza total explicada por el modelo estadístico. Algunos de los pasos involucran obtener los residuos de todas las variables independientes, vía regresión de unas contra otras y conseguir de este modo, el modelo residual que será usado en el paso siguiente.

**Tabla 7.** Resultado de la selección del mejor modelo según AIC y del modelo de regresión lineal dentro de las subcuencas, en la Región de Antofagasta.

**Tabla 8.** Resumen de los resultados obtenidos en relación a los objetivos del estudio.

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Ubicación geográfica de las áreas de muestreo dentro de cuencas (línea continua) y subcuencas (línea punteada). Diferentes colores fueron asignados a cada localidad según subcuenca.

**Figura 2.** Ejemplo de los tres tipos de rutas hipotéticas de dispersión de *Rhinella spinulosa* creadas entre todas las localidades. Se muestran las rutas entre las localidades de El Tatio y Chita.

**Figura 3.** Gráfico de dispersión de la Prueba de Mantel entre la distancia geográfica (km) que separa cada localidad y la diferenciación genética de *Rhinella spinulosa* ( $F_{st}$ ),  $r = 0,735$ ,  $P = 0,001$ .

**Figura 4.** Variación geográfica de la frecuencia haplotípica de 16 poblaciones donde habita *Rhinella spinulosa*, utilizando como marcador la región control del DNA mitocondrial. El tamaño de los círculos es proporcional al tamaño de la muestra.

**Figura 5.** Diagrama de Venn que muestra la variación de  $F_{st}$  (variable dependiente) en función de tres variables explicativas: diferencia de temperatura, diferencia de altitud y distancia en línea recta o euclidiana. El modelo explicó un 63% de la variación total. Los efectos puros de la variación de la diferencia de altitud, distancia en línea recta y diferencia de temperatura se muestran en los valores a, b y c, respectivamente. El efecto de las variables combinadas se muestra en los valores e, d y f. La variación combinada de las tres variables se muestra en el valor de g. La descomposición de la variación fue realizada mediante regresiones parciales, utilizando modelos lineales y considerando el porcentaje de variación explicada.

## Resumen

En este estudio se analizaron los efectos de las características del paisaje y del ambiente sobre la diferenciación genética de *Rhinella spinulosa*, en la zona altiplánica y precordillerana en la región de Antofagasta en Chile. Se utilizó como marcador genético la región control del mtDNA y como medida de diferenciación los valores de  $F_{st}$ . Para determinar el efecto de la estructura geográfica sobre la estructura genética se realizó un AMOVA a nivel de cuencas y subcuencas. Las características del paisaje se incorporaron utilizando SIG, a través de tres rutas hipotéticas de dispersión: 1) distancia Euclidiana (modelo nulo); 2) de menor costo a través de humedales; y 3) de menor costo basado en la pendiente menor. Además, se incluyó la diferencia entre localidades de temperatura, precipitación y altitud. El modelo que mejor explicó la diferenciación genética fue seleccionado por el criterio de información de Akaike. Para establecer la influencia de cada variable dentro del modelo seleccionado, se utilizaron regresiones parciales. Se encontró una diferenciación genética alta y significativa entre todas las poblaciones ( $F_{st}$  global = 0.693,  $P = 0.001$ ) y un patrón claro de aislamiento por distancia ( $r = 0.735$ ,  $P = 0.001$ ). El AMOVA mostró que las cuencas explicaron un 10% de la varianza genética y las subcuencas un 33%. El modelo que mejor explicó la diferenciación genética entre todas localidades fue el que consideró la distancia euclidiana, la altitud y la temperatura. El mejor modelo fue diferente para las tres subcuencas estudiadas: para Río Loa Alto fue la diferencia de temperatura, en Río San Pedro fue la diferencia en altitud, mientras que en Salar de Atacama no se encontraron diferencias entre los modelos evaluados. Esta información sugiere que en las poblaciones de *R. spinulosa* estudiadas existirían diferentes procesos de diferenciación genética operando a diferentes escalas espaciales.

**Palabras clave:** Anfibios, diferenciación genética, SIG, Región Control del mtDNA, Genética del Paisaje, variables ambientales, Akaike.



## Summary

We analyzed the effects of landscape and environmental characteristics on the genetic differentiation of *Rhinella spinulosa* in the Altiplano and Andes foothills, of the region of Antofagasta, in Chile. We used control region of mtDNA to estimate  $F_{st}$  as a measure of genetic differentiation. To determine the effect of geographic structure on genetic structure we used AMOVA at watersheds and subwatersheds levels. Landscape characteristics were incorporated using GIS, with three hypothetical dispersion models: 1) Euclidean distance (null model); 2) least cost based in wetlands location, and 3) least cost based in least slopes. We also included differences in temperature, precipitation and altitude among localities. The Akaike's information criterion was used to select the model which best explained the genetic differentiation. The effect of each variable in the selected model was estimated through partial regressions. We found a high and significant difference among all populations (global  $F_{st} = 0.693$ ,  $P = 0.001$ ) and a clear pattern of isolation by distance ( $r = 0.735$ ,  $P = 0.001$ ). AMOVA showed that watersheds explained 10% of the genetic variance, while subwatersheds explained 33%. The model that best explained the genetic differentiation among all localities included straight-line Euclidean distance, altitude and temperature. The best model differed among the three watersheds studied: for Río Loa Alto it was the difference in temperature; in Río San Pedro it was the difference in altitude; while in Salar de Atacama we found no differences among the models evaluated. This information suggests that in the studied populations of *R. spinulosa* there are different genetic differentiation processes operating at different spatial scales.

**Keywords:** Amphibians, Genetic differentiation, GIS, mtDNA control region, Landscape Genetics, environmental variables, Akaike.

## Introducción

La interacción entre las características del paisaje y del ambiente puede afectar fuertemente la dispersión de los organismos, proceso importante que configura la evolución de las poblaciones (Wiens 2001). Por lo tanto, identificar los factores bióticos y abióticos involucrados en los procesos de diferenciación es esencial para modelar y predecir la evolución de la diversidad genética (Guillot *et al.* 2005). La genética del paisaje tiene un potencial promisorio para facilitar estudios en evolución, ecología y biología de la conservación (Manel *et al.* 2003), ya que integra datos genéticos y aspectos complejos de la composición y la configuración del paisaje, en un contexto metapoblacional espacialmente explícito (Diniz-Filho *et al.* 2008), permitiendo investigar la interacción entre las características del paisaje y la dispersión espacial (Michels *et al.* 2001). Esta aproximación está basada en la utilización de herramientas de la ecología del paisaje (como los sistemas de información geográfico (SIG)), la genética de poblaciones y la estadística espacial. Las técnicas utilizadas en este campo describen patrones genéticos espaciales, y permiten explorar los procesos que originaron los patrones observados (Manel *et al.* 2003).

El proceso de aislamiento por distancia, en un análisis que incluya un paisaje complejo, debería ser visto como un modelo nulo (Broquet *et al.* 2006). Así, la desviación desde el modelo nulo implicaría que otros elementos pueden estar involucradas en los procesos de diferenciación genética (Spear *et al.* 2005, Telles *et al.* 2007). Varios estudios han utilizado los SIG para modelar diferentes escenarios de dispersión de menor costo, basados en características del paisaje y del ambiente, para posteriormente calcular una distancia geográfica modificada, y finalmente relacionarla con la distancia genética. Por ejemplo, Michels *et al.* (2001) implementaron una distancia de menor costo basada en las tasas de dispersión del zooplancton. Por otra parte, Clark *et al.* (2008) propusieron un modelo de menor costo para la serpiente cascabel (*Crotalus horridus*) basado en la cantidad de lugares de termorregulación (*basking*) entre sitios. En ambos trabajos, la correlación de la distancia genética con la distancia geográfica modificada fue mayor en comparación a la distancia euclidiana simple, logrando explicar en mayor grado la diferenciación genética observada.

Los anfibios son un grupo adecuado para estudios en genética del paisaje, por su vagilidad limitada, alta filopatría (Seppä y Laurila, 1999) y sitios reproductivos separados espacialmente. Los sitios reproductivos de estas especies en ambientes áridos y montañosos se encuentran en pequeños parches entre las altas pendientes y son dependientes de ríos

permanentes o de larga duración (Dayton y Fitzgerald 2006). De este modo, factores asociados al paisaje, podrían afectar la dispersión y flujo génico en estas especies (Funk *et al.* 2005). Spear *et al.* (2005), en un estudio sobre la salamandra tigre (*Ambystoma tigrinum melanostictum*), observaron que la diferencia de altitud y la distancia entre las poblaciones, eran los principales factores que favorecían la diferenciación genética, actuando como barrera en su dispersión y flujo génico. Funk *et al.* (2005) encontraron resultados similares, donde las diferencias en altitud y las montañas que separaban las poblaciones de *Rana luteiventris*, se asociaban a mayor diferenciación genética. En contraste, entre los sitios ubicados a baja altitud y que estaban separados por mayores distancias, observaron altos niveles de flujo génico.

*Rhinella spinulosa*, es una especie de anfibio, que se distribuye desde el altiplano de Perú y Bolivia hasta los 39° S, en Chile Central, habitando zonas altiplánicas y precordilleranas, con un rango altitudinal entre los 1.000 y 4.600 msnm (Ceí 1962; Veloso y Navarro 1988). Las áreas precordillerana y altiplánica de la zona andina chilena presentan un clima desértico de altura y estepárico de altura, respectivamente (Castillo *et al.* 1997). Estas condiciones de hiperaridez del altiplano de Chile (entre 18° y 24° latitud sur) se mantienen desde el Mioceno Superior (Abele 1991). En el altiplano, los niveles de precipitación aumentan gradualmente con la altitud de 10 a 200 mm/año (entre los 2.000 y por sobre los 4.000 msnm) y dependen principalmente de las precipitaciones estivales altiplánicas (diciembre a marzo) (Arroyo *et al.* 1988). El agua precipitada en la alta montaña alcanza las cuencas más bajas por escorrentía e infiltración subterránea y sustenta las regiones de menor altitud que presentan aridez extrema y déficit permanente de agua (Salazar 1997).

*R. spinulosa* está aclimatada física y conductualmente a la altitud y clima frío del altiplano (Sinsch 1989; Ruiz *et al.* 1989). Larvas y postmetamórficos tienen actividad diurna (Lambrinos y Kleier, 2003) y los adultos son principalmente nocturnos, habitando durante el día en grietas (Ceí 1962, Lambrinos y Kleier 2003). Mientras los adultos son más terrestres que acuáticos (Ceí 1962), los juveniles son más dependientes del ambiente hídrico (Tracy 1993). Espinoza y Quinteros (2008) observaron que los postmetamórficos siempre están cerca del agua (10-20 cm, máximo 1 m), en suelo húmedo o con vegetación. Respecto a la variabilidad genética, Méndez *et al.* (2004), analizaron poblaciones del norte y centro de Chile, con marcadores nucleares (RAPD) encontrando una correlación significativa entre la variación genética y geográfica. En particular, en la región de Antofagasta se pudo distinguir a nivel genético diferencias entre las poblaciones ubicadas en la cuenca del Salar de Atacama, y las

otras poblaciones estudiadas de esta región.

En el presente trabajo, se determinó la estructura genética de *Rhinella spinulosa* en el altiplano de la región de Antofagasta. Los objetivos fueron:

a) estimar la diferenciación genética entre las poblaciones: se esperaba que existiera una alta subdivisión genética por las condiciones de aridez extrema y las distancias entre las localidades y que esta subdivisión estuviera asociada a las cuencas hidrográficas de la región;

b) determinar si las variables del paisaje (pendiente, humedales de altura y altitud) y las variables ambientales (temperatura y precipitación), permiten explicar de mejor modo la diferenciación genética, en comparación a un modelo de aislamiento por distancia.

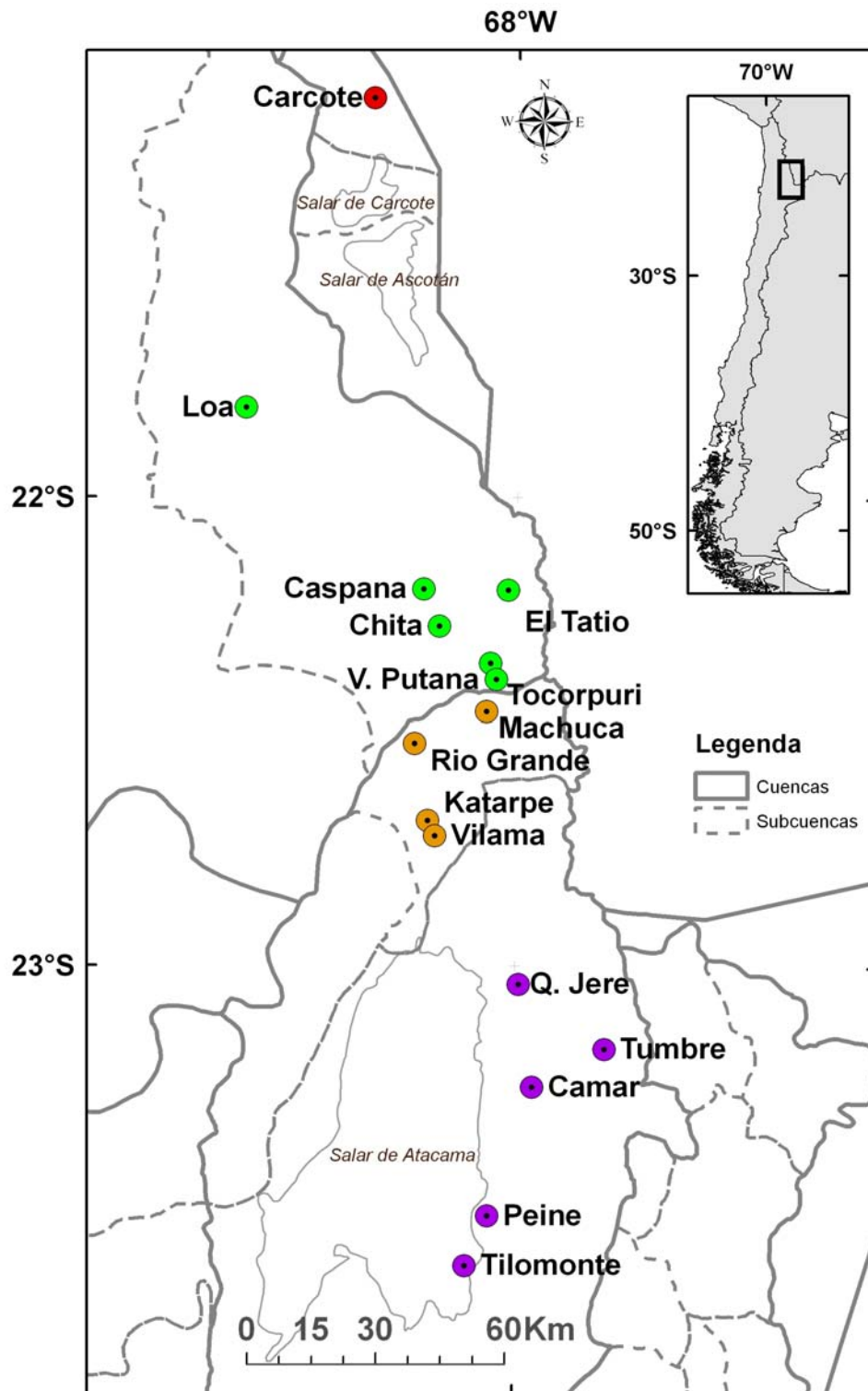
## Materiales y métodos

### Área de muestreo

Se utilizaron 216 individuos provenientes de 16 localidades (Tabla 1) de la zona altiplánica y precordillerana en la Región de Antofagasta (21-24° S). El área de estudio fue dividida en cuencas y subcuencas (Tabla1; Figura 1), y cada localidad fue georreferenciada en el sistema WGS84 UTM 19s.

**Tabla 1.** Localidades de muestreo de *Rhinella spinulosa*. Se indica el tamaño muestral (n), la altitud y la ubicación según cuenca y subcuenca.

Cuenca	Subcuenca	Localidad	n	Altitud (msnm)	
Fronterizas Salar Michincha-Río Loa	Salar de Ollagüe	Carcote	13	3688	
		Río Loa	Loa	5	3053
			Caspana	13	3245
			El Tatio	19	4264
			Cuesta Chita	15	3741
			Tocorpuri	3	4215
			Vado Putana	15	4286
Salar de Atacama	Río San Pedro	Machuca	15	3979	
		Río Grande	10	3045	
		Katarpe	17	2460	
		Vilama	15	2579	
		Salar de Atacama	Q. Jere	23	2513
	Tumbre		5	3761	
	Camar		15	2727	
	Peine		16	2440	
			Tilomonte	17	2365



**Figura 1.** Ubicación geográfica de las áreas de muestreo dentro de cuencas (línea continua) y subcuencas (línea punteada). Diferentes colores fueron asignados a cada localidad según subcuenca.

## Extracción del DNA y secuenciación

Para la extracción del DNA se utilizó una modificación del método de sales (Jowett 1986). Se usaron tejidos provenientes de hígado, músculo, lengua o dedo de cada espécimen. Como marcador genético se utilizó la región control del mtDNA, que fue amplificada a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los partidores CytbA-L (5' - GAATY GGRGG WCAAC CAGTA GAAGA CCC-3') y Control P-H (5' -GTCCA TAGAT TCAST TCCGT CAG-3') diseñados por Goebel *et al.* (1999). El PCR se realizó en un volumen total de 30  $\mu$ L que contuvo: 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 3 mM de  $MgCl_2$ , 0.3 mM de cada dNTP y 0,8  $\mu$ M de cada partidor y 10-50 ng de DNA genómico. El perfil termal fue el siguiente: 2 min a 94°C (desnaturalización inicial), seguido por 42 ciclos a 94 °C por 30 seg, 56 °C por 45 seg y 1.30 min a 72 °C, la extensión final fue a 72°C por 5 min. Se realizaron controles negativos a lo largo de los PCR para comprobar una posible contaminación. Los productos PCR fueron secuenciados en un equipo ABI3700 (*Applied Biosystems*). Las secuencias se editaron y alinearon en el programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999) utilizando la opción Clustal W 1.4 (Thompson *et al.* 1994) y por inspección visual.

## Diversidad, diferenciación y estructura genética

Para determinar la diferenciación genética se estimaron los valores pares de  $F_{st}$  entre las localidades utilizando el programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) con 10.000 permutaciones.  $F_{st}$  es una medida de diferenciación genética entre poblaciones (se determinó estimando el número de loci para los cuales dos haplotipos son diferentes), el valor teórico mínimo es cero, e indica que no hay divergencia entre las poblaciones, y el máximo es uno, que indica fijación de un alelo en una población, lo que muestra una máxima diferenciación (Hartl y Clark 1997). Para evaluar la existencia de aislamiento por distancia, se utilizó la prueba de Mantel, que estima la significancia estadística de correlaciones de matrices (Manly 1985). Las matrices de  $F_{st}$ , y de distancia geográfica entre localidades, fueron correlacionadas utilizando el programa XLSTAT 1.02 (Addinsoft, 2005) con 10.000 permutaciones. Para calcular los índices de diversidad haplotípicos y nucleotídicos se utilizó el programa DNAsp 4.5 (Rozas *et al.* 2003). Para determinar la influencia de las cuencas hidrográficas sobre la estructura genética, se realizaron análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa

Arlequin 3.11, con 10.000 permutaciones, agrupando las localidades según cuenca y subcuenca.

### Análisis del paisaje y del ambiente

Con el objetivo de determinar cuáles variables permitían explicar la diferenciación genética a distintas escalas espaciales, se realizaron tres análisis: uno con todas las localidades en conjunto; un segundo análisis agrupándolas a nivel de cuencas y; un tercer análisis a nivel de subcuencas hidrográficas. Las variables descriptivas del paisaje fueron representadas en formato ráster.

### *Rutas de dispersión*

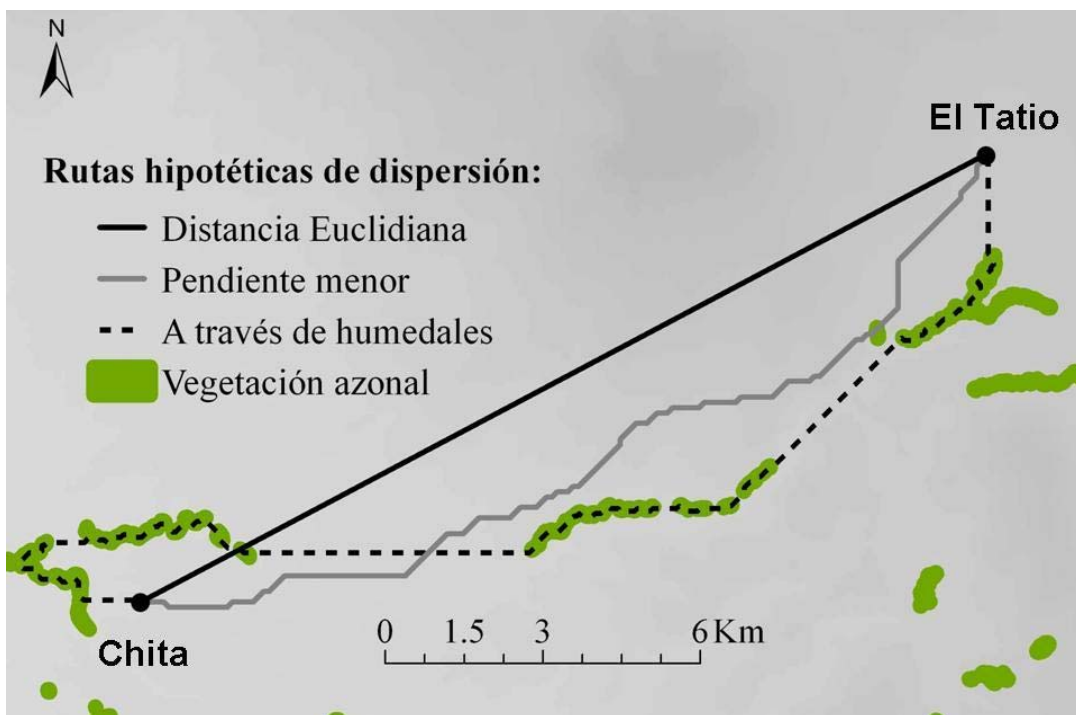
Entre todas las localidades muestreadas se crearon tres tipos de rutas probables de dispersión (Figura 2), utilizando el programa ArcGis 9.2®. La primera ruta fue la de distancia en línea recta (modelo nulo). El segundo tipo de ruta fue un modelo de menor costo basado en los humedales de altura (vegas y bofedales), los cuales están condicionados por el régimen hídrico de esta zona conformado por afloramientos que dan origen a ríos y vertientes (Castillo *et al.* 1997). En esta ruta el costo de trasladarse al interior de estos humedales fue de 0 y fuera de los humedales fue de 100, para esto se utilizó la cobertura de vegetación azonal creada por Faúndez y Escobar (2006). El valor de 100, se eligió debido a que en el área de distribución de la especie, el hábitat está distribuido en forma de parches, siendo frecuente observar entre estos parches sitios con ausencia de fuentes de agua, lo que presumiblemente impediría la dispersión. El tercer tipo de ruta fue también un modelo de menor costo, pero basado en la pendiente: el costo de trasladarse desde un píxel a otro aumentaba de manera lineal a medida que aumentaba la pendiente, hasta los 45° (se utilizaron los datos de SRTM 90 m).

### *Altitud, temperatura y precipitación*

Las variables incluidas en los análisis fueron la diferencia de altitud, temperatura y precipitación. La diferencia de altitud, fue incluida debido a que esta característica ha sido



relacionada positivamente con la diferenciación genética en anfibios (Funk *et al.* 2005; Spear *et al.* 2005). La precipitación fue incorporada debido a que, dentro de las cuencas altiplánicas, muestra variación espacial asociada a efectos de la orografía, existiendo una variación entre la meseta y los puntos más elevados (Salazar 1997). Finalmente, se incluyó la temperatura, por presentar una importante variación altitudinal y estacional entre las localidades de estudio, donde la media es relativamente baja y disminuye con la altitud (Aceituno 1997). Estas variables fueron obtenidas desde Worldclim 1.4 (Hijmans *et al.* 2005), disponibles en <http://www.worldclim.org>. Para seleccionar, entre 15 variables bioclimáticas relacionadas con la temperatura y precipitación, aquellas que explicaran de mejor modo la variación observada entre las localidades de estudio, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con matriz de covarianza en el programa R (R Development Core Team 2009). Luego de seleccionar las variables, con cada una se crearon matrices de distancia euclidiana entre las localidades utilizando el programa NTSYSpc 2.10 (Rohlf 2000). Estas variables fueron incluidas en la selección del mejor modelo que explicara la diferenciación genética.



**Figura 2.** Ejemplo de los tres tipos de rutas hipotéticas de dispersión de *Rhinella spinulosa* creadas entre todas las localidades. Se muestran las rutas entre las localidades de El Tatio y Chita.

### *Criterio de selección del mejor modelo*

Se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC) para la selección del mejor modelo, dentro de todas las posibles combinaciones de variables que explicara la diferenciación genética. AIC toma en consideración la medida en que el modelo se ajusta a las series observadas, como el número de parámetros utilizados en el ajuste, de esta manera determina la combinación de variables que mejor explican los datos observados. El AIC de cada modelo es transformado en un DAIC, que es la diferencia entre AIC de cada modelo y el valor mínimo AIC encontrado en el conjunto de los modelos comparados. Un valor DAIC mayor que 7 indica que el modelo tiene un ajuste relativamente pobre respecto al mejor modelo; un valor menor a 2 indica que es un modelo equivalente al modelo AIC mínimo. Los valores de DAIC pueden ser usados para calcular la ponderación Akaike de cada modelo ( $w_i$ ), que da evidencia de que el modelo seleccionado, es actualmente el mejor modelo explicativo (Burnham y Anderson 2002).

Se utilizaron los valores de AIC para disminuir todos los posibles modelos a tres modelos candidatos, uno para cada ruta, y posteriormente escoger el mejor modelo dentro de los tres seleccionados. De esta manera, se determinó cuál ruta y cuáles variables estaban más fuertemente relacionadas con los datos genéticos. Las variables del paisaje y del ambiente que no estuvieron incluidas en el modelo seleccionado, fueron excluidas de análisis posteriores. Para realizar este análisis, se utilizó el programa SAM 3.0 (*Spatial Analyst in Macroecology*) (Rangel *et al.* 2006).

### *Partición de la variación del mejor modelo*

Después de seleccionar el mejor modelo, se estimó el grado de diferenciación genética explicado por cada variable. Para esto se utilizaron regresiones parciales, lo que permitió considerar diferentes grupos de variables explicativas, y determinar la capacidad de explicar los patrones observados (Legendre y Legendre 1998). Diferentes trabajos han utilizado los análisis de regresión en genética de poblaciones para evaluar hipótesis acerca de la estructura espacial, temporal y ambiental sobre la diferenciación genética (Diniz-Filho 2000; Telles y Diniz-Filho 2005). Como las variables explicativas no son independientes entre sí, este procedimiento puede ayudar a identificar la influencia de cada componente y la interacción de estos sobre la variable dependiente, clarificando la influencia de las variables consideradas en el modelo (Anderson y Gribble 1998). Sin embargo, este método no necesariamente identifica

los factores causales, sólo facilita la formulación de hipótesis acerca de los procesos que pueden haber generado los patrones observados (Legendre y Legendre 1998). Para estos análisis se utilizaron los programas Statistica 6.0 (StatSoft Inc. 2001) y SAM 3.0 (Rangel *et al.* 2006).

## Resultados

### Análisis de las secuencias, diferenciación y estructura genética

A partir de los 216 especímenes secuenciados, se obtuvo un total de 863 sitios nucleotídicos, 27 sitios fueron polimórficos y cinco presentaron *indels* (inserción-delección). Se recuperaron 25 haplotipos, al incluir los sitios con *indels*. Los valores de diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica por sitio fueron 0,8390 y 0,00567, respectivamente. Las secuencias fueron depositadas en GenBank, con números de acceso AY663485-AY663519; FJ643165-FJ643276 y FJ790426- FJ790434.

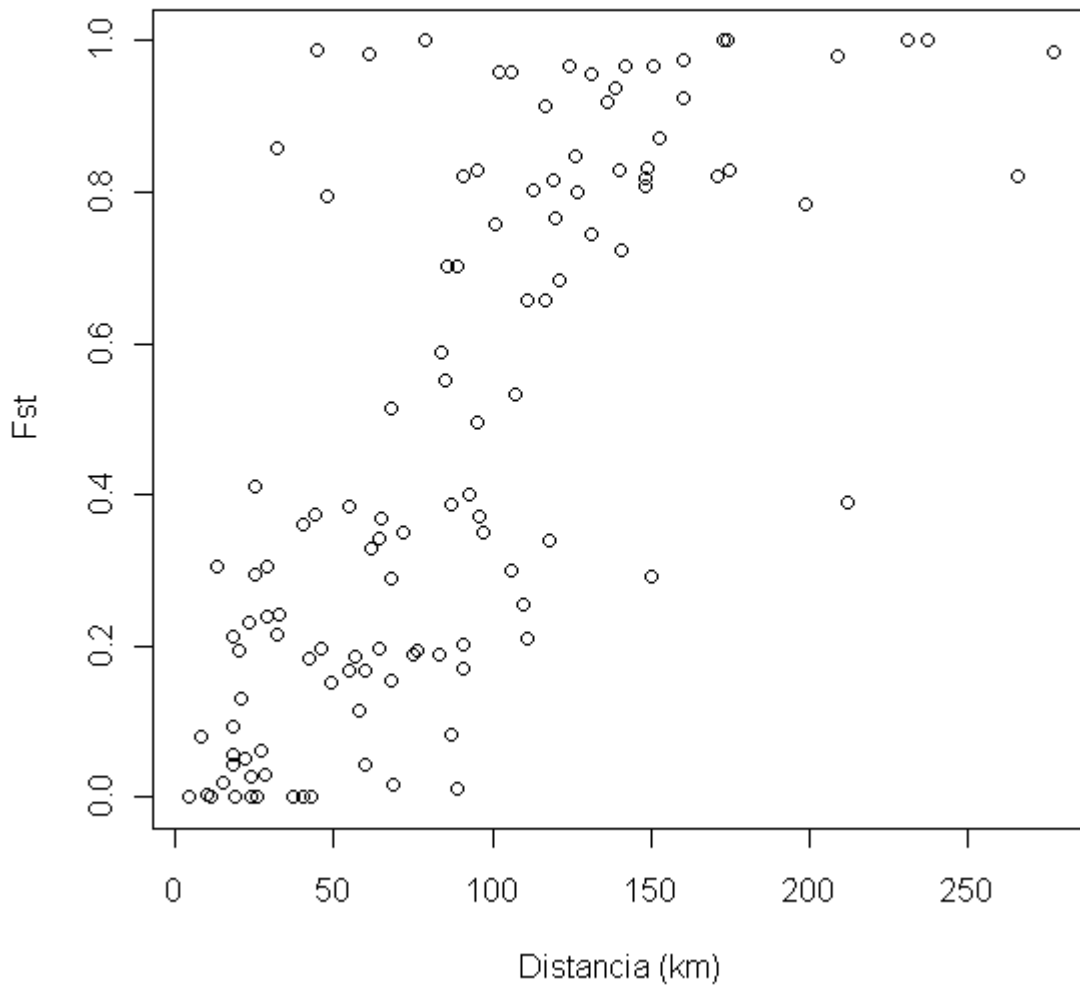
La diferenciación genética entre los sitios fue alta y significativa ( $F_{st}$  global = 0,693;  $P = 0,001$ ), con un amplio rango de variación entre las poblaciones (Tabla 2). La Prueba de Mantel evidenció un patrón significativo de aislamiento por distancia ( $r = 0,735$ ,  $P = 0,001$ ) (Figura 3). Al agrupar las poblaciones de acuerdo a su ubicación geográfica en cuencas y subcuencas, el AMOVA mostró que éstas explicaron un 10% y 33% de la diferenciación genética, respectivamente (Tabla 3). Una de las localidades más diferenciadas es Carcote, que se ubica en una cuenca diferente del resto de las localidades y a 79 km de la localidad más cercana. Dentro de la subcuenca Río Loa Alto las localidades de Tocarपुरi y Loa presentaron valores no significativos de diferenciación genética, lo que podría deberse al bajo tamaño muestral de ambas localidades; lo mismo ocurrió para la localidad de Río Grande de la subcuenca Río San Pedro (Tabla 2). La frecuencia haplotípica de cada localidad y su relación con las subcuencas se puede observar en la Figura 4.

### Relaciones de la genética, el paisaje y el ambiente

#### *Selección de variables ambientales*

El PCA mostró que la proporción de varianza explicada por los dos primeros componentes fue de un 84,3% (Tabla 4). Las variables relacionadas con la temperatura presentaron un peso mayor en el primer componente, mientras que las variables relacionadas con la precipitación, presentaron un peso mayor en el segundo componente. Se escogió la

temperatura media anual por ser una de las variables con mayor peso y que podría ser más representativa de la condición climática del hábitat de *R. spinulosa* en comparación a las variables temperatura mínima del mes más frío y temperatura media de los meses más fríos, que presentaron igual carga, ya que este anfibio a bajas temperaturas se refugia y, por lo tanto, no se dispersa. También, se escogió la precipitación anual que mostró la mayor carga en el segundo componente.



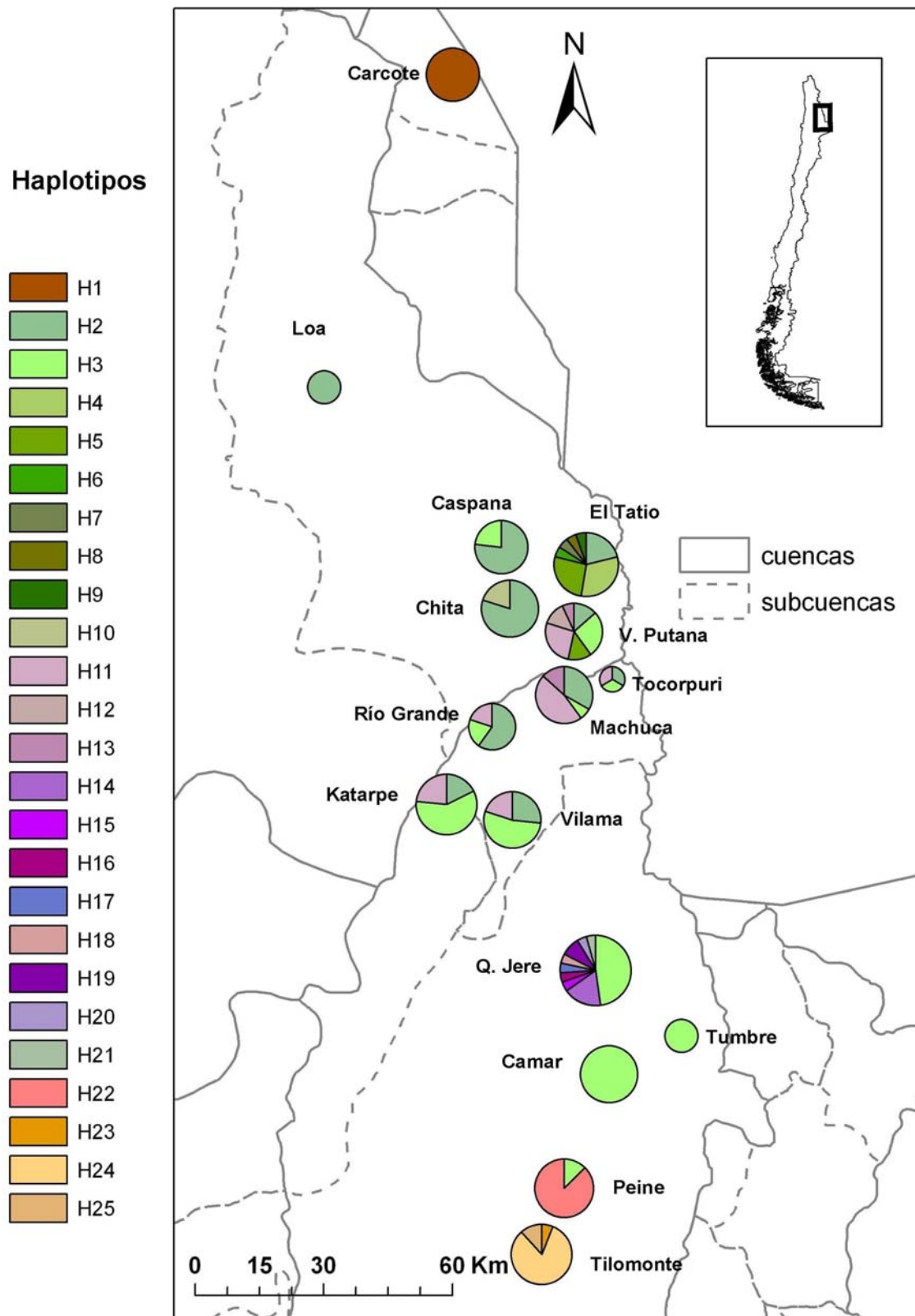
**Figura 3.** Gráfico de dispersión de la Prueba de Mantel entre la distancia geográfica (km) que separa cada localidad y la diferenciación genética de *Rhinella spinulosa* ( $F_{st}$ ),  $r = 0,735$ ,  $P = 0,001$ .

**Tabla 2.** Diferenciación genética ( $F_{st}$ ) entre las localidades de muestreo de *Rhinella spinulosa* utilizando como marcador genético mtDNA. En negrita están los valores estadísticamente significativos de  $F_{st}$  ( $P = 0,05$ ). Sobre la diagonal se muestra la distancia en línea recta (km) entre las localidades. Las cuencas se muestran en gris y las subcuencas con líneas punteadas.

Cuencas	FSM <sup>1</sup>	Río Loa						Salar de Atacama								
Subcuencas	SO <sup>2</sup>	Río Loa Alto			Río San Pedro			Salar de Atacama								
Localidades	Carcote	Loa	Caspana	El Tatio	Chita	Tocorpuri	V. Putana	Machuca	Río Grande	Katarpe	Vilama	Q. Jere	Tumbre	Camar	Peine	Tilomonte
Carcote	*	79	117	121	126	136	141	148	153	171	175	212	231	237	266	277
Loa	<b>1</b>	*	60	75	69	83	87	91	89	106	110	150	173	174	199	209
Caspana	<b>0,914</b>	0,044	*	20	10	24	27	33	37	55	58	96	117	120	149	160
El Tatio	<b>0,684</b>	0,189	<b>0,195</b>	*	18	18	21	29	42	57	60	93	111	118	148	160
Chita	<b>0,848</b>	0,016	0,003	<b>0,213</b>	*	15	18	23	28	46	49	87	107	111	140	151
Tocorpuri	<b>0,92</b>	0,189	0,028	0,057	0,02	*	4	11	26	40	43	76	95	101	131	142
V. Putana	<b>0,724</b>	0,082	0,061	<b>0,132</b>	<b>0,094</b>	0	*	8	24	37	40	72	91	97	127	139
Machuca	<b>0,817</b>	0,17	<b>0,242</b>	<b>0,307</b>	<b>0,231</b>	0	0,081	*	18	29	32	65	84	89	119	131
Río Grande	<b>0,871</b>	0,012	0	<b>0,183</b>	0,031	0	0	0,043	*	18	22	62	85	86	113	124
Katarpe	<b>0,822</b>	<b>0,301</b>	<b>0,168</b>	<b>0,186</b>	<b>0,197</b>	0	0,001	<b>0,24</b>	0,094	*	4	44	68	68	95	106
Vilama	<b>0,829</b>	0,255	0,116	<b>0,169</b>	<b>0,151</b>	0	0	<b>0,216</b>	0,051	0	*	40	64	64	91	102
Q. Jere	<b>0,39</b>	<b>0,293</b>	<b>0,372</b>	<b>0,4</b>	<b>0,386</b>	0,195	<b>0,35</b>	<b>0,368</b>	<b>0,33</b>	<b>0,374</b>	<b>0,362</b>	*	25	25	55	68
Tumbre	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,657</b>	<b>0,211</b>	<b>0,533</b>	0,496	0,203	<b>0,587</b>	<b>0,552</b>	0,155	0,197	0,296	*	19	48	61
Camar	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,765</b>	<b>0,339</b>	<b>0,657</b>	<b>0,758</b>	<b>0,349</b>	<b>0,702</b>	<b>0,702</b>	<b>0,289</b>	<b>0,343</b>	<b>0,41</b>	0	*	32	45
Peine	<b>0,821</b>	<b>0,785</b>	<b>0,83</b>	<b>0,808</b>	<b>0,83</b>	<b>0,744</b>	<b>0,8</b>	<b>0,815</b>	<b>0,804</b>	<b>0,828</b>	<b>0,822</b>	<b>0,385</b>	<b>0,796</b>	<b>0,859</b>	*	13
Tilomonte	<b>0,984</b>	<b>0,981</b>	<b>0,975</b>	<b>0,925</b>	<b>0,966</b>	<b>0,968</b>	<b>0,938</b>	<b>0,956</b>	<b>0,967</b>	<b>0,957</b>	<b>0,959</b>	<b>0,515</b>	<b>0,982</b>	<b>0,988</b>	<b>0,305</b>	*

<sup>1</sup>FSM: Cuenca Fronterizas Salar Michincha-Río Loa.

<sup>2</sup>SO: Subcuenca Salar de Ollagüe.



**Figura 4.** Variación geográfica de la frecuencia haplotípica de 16 poblaciones donde habita *Rhinella spinulosa*, utilizando como marcador la región control del DNA mitocondrial. El tamaño de los círculos es proporcional al tamaño de la muestra.

**Tabla 3.** Resultado del análisis de varianza molecular (AMOVA) con 10.000 permutaciones, dividiendo las poblaciones donde habita *Rhinella spinulosa* en cuencas y subcuencas. Los valores estadísticamente significativos están indicados con un asterisco.

Fuente de variación	Nº de grupos	Índice de fijación	Porcentaje de variación	P
<b>A nivel de cuencas</b>				
	3			
Entre grupos		Fsc = 0,673	10,2	0,001*
Entre poblaciones dentro de grupos		Fst = 0,706	60,44	0,001*
Dentro de poblaciones		Fct = 0,101	29,36	0,2295
<b>A nivel de subcuencas</b>				
	4			
Entre grupos		Fsc = 0,578	33,05	0,001*
Entre poblaciones dentro de grupos		Fst = 0,717	38,71	0,001*
Dentro de poblaciones		Fct = 0,330	28,25	0,035*

**Tabla 4.** Resultado del análisis de componentes principales de 15 variables bioclimáticas asociadas a 16 localidades. Se muestran las cargas de cada variable en los primeros dos componentes y la proporción de varianza explicada por cada componente.

Variables	Comp.	Comp.
	1	2
Temperatura media anual	0,32	
Rango de temperatura media diurna	-0,316	
Temperatura máxima del mes más cálido	0,319	
Temperatura mínima del mes más frío	0,32	
Temperatura media de los tres meses más húmedos	0,319	
Temperatura media de los tres meses más secos	0,315	
Temperatura media de los tres meses más cálidos	0,319	
Temperatura media de los tres meses más fríos	0,32	
Precipitación anual		0,547
Precipitación del mes más húmedo		0,475
Estacionalidad de precipitaciones (coeficiente de variación)	-0,16	-0,187
Precipitación de los tres meses más húmedos	-0,199	0,433
Precipitación de los tres meses más secos	0,2	0,116
Precipitación de los tres meses más cálidos	-0,19	0,446
Precipitación de los tres meses más fríos	0,2	0,116
Proporción de la varianza	0,6264	0,2166
Proporción de la varianza acumulada	0,6264	0,843



### Selección del mejor modelo

Basados en los valores de AIC (Tabla 5), las variables altitud y temperatura media anual fueron seleccionadas en todos los modelos candidatos para cada tipo de ruta. La precipitación anual no fue seleccionada en ninguno de los modelos.

El mejor modelo que explicó la diferenciación genética ( $r^2 = 63\%$ ) fue el que incluyó a la distancia en línea recta más las variables altitud y temperatura (DAICc = 1,682; AICc  $w_i = 0,111$ ), y explicó un 9% más que el modelo en línea recta (modelo nulo). El modelo de la ruta de menor pendiente más la altitud y la temperatura podría considerarse equivalente al anterior, sin embargo, tiene menor probabilidad de ser el mejor modelo (DAICc = 2,879; AICc  $w_i = 0,061$ ). La ruta a través de humedales fue la que tuvo el mayor valor de AIC y explicó la menor cantidad de variación genética (DAICc = 42,275; 0,464).

**Tabla 5.** Resultado del procedimiento de selección del mejor modelo, utilizando el criterio de información de Akaike (AICc), para explicar la diferenciación genética entre las localidades donde habita *Rhinella spinulosa*. Se muestran el mejor modelo para cada ruta y cada una de las rutas sin las variables ambientales. Las rutas simulan el movimiento entre localidades. DAICc es la diferencia entre el valor de AICc del modelo y el valor mínimo de AICc encontrado entre todos los modelos, AICc  $w_i$  es la probabilidad de ser el modelo verdadero,  $r^2$  es la cantidad de diferenciación genética explicada por cada modelo.

Rutas	Variables	AICc	DAICc	AICc $w_i$	$r^2$	$P$
Euclidiana	Temperatura; Altitud	-18,595	1,682	0,111	0,631	0,001
Euclidiana		3,461	23,738	<,001	0,540	0,001
Pendiente menor	Temperatura; Altitud	-17,398	2,879	0,061	0,627	0,001
Pendiente menor		7,499	27,776	<,001	0,525	0,001
A través de humedales	Temperatura; Altitud	-9,528	10,749	0,001	0,602	0,001
A través de humedales		21,998	42,275	<,001	0,464	0,001

A modo de evaluar si la localidad de Carcote estaría influenciando los resultados obtenidos, ya que mostró un alto valor de diferenciación genética; y la mayor distancia entre las localidades (i.e. la localidad más cercana está a 79 km), se realizó un segundo análisis sin utilizar esta localidad. Los resultados fueron similares al análisis previo, que incluyó todas las localidades, ya que el mejor modelo seleccionó a las mismas variables (altitud, temperatura y distancia) y la explicación fue similar ( $r^2 = 67.7\%$ ,  $P < .001$ ). Por lo tanto, Carcote no estaría influyendo en la selección de las variables que explicaron la diferenciación genética al incluir todas las localidades.

#### *Partición de la variación del mejor modelo*

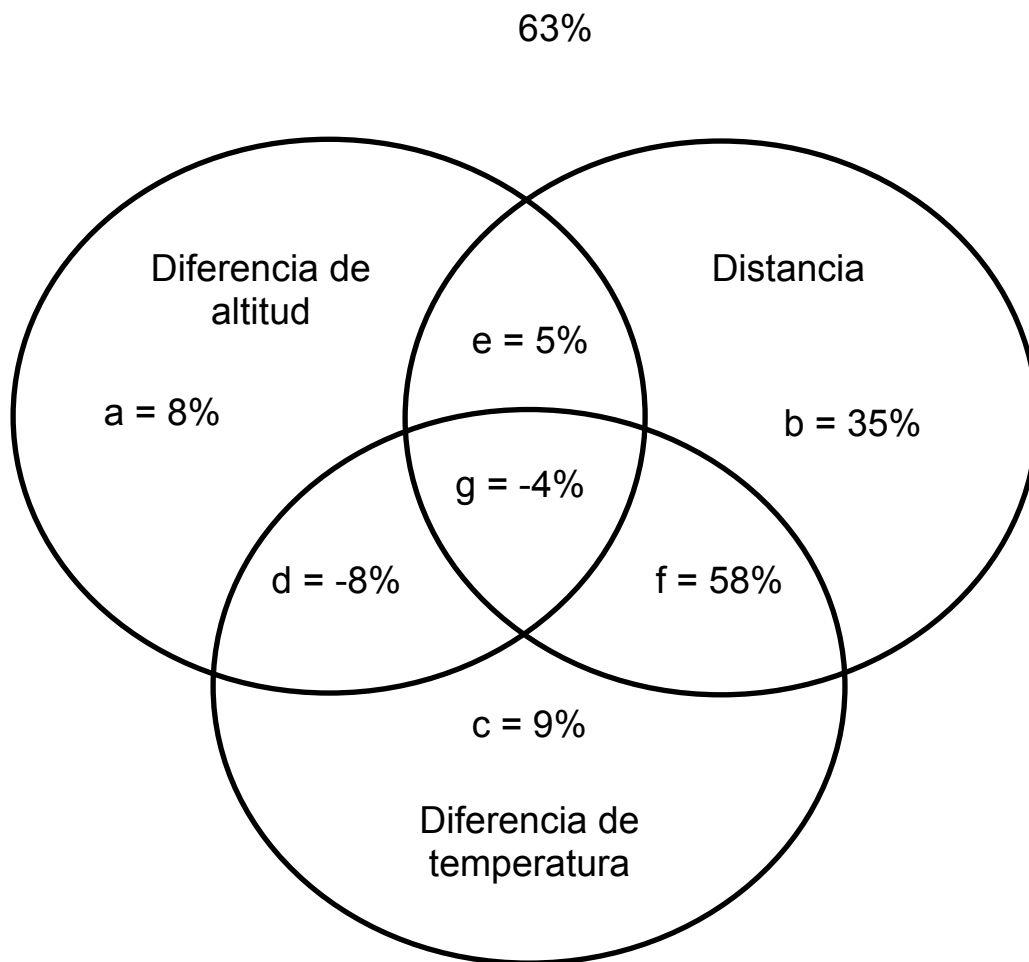
Según el criterio de AIC las variables independientes temperatura, altitud y distancia en línea recta correspondieron al mejor modelo. Se determinó el aporte de cada variable modelando la variable dependiente ( $F_{st}$ ) contra las variables independientes en un modelo de regresión lineal. EL  $r^2$  es interpretado como la fracción de la varianza total explicada por el modelo estadístico (Tabla 6).

La altitud, la temperatura y la distancia por si solas tuvieron valores de 8%, 9% y 35%, respectivamente (Figura 5). La mayor proporción de la diferenciación fue explicada por la combinación de la distancia y la temperatura (58%). El valor negativo de la sobreposición entre la temperatura y la altitud, se debe probablemente a que tienen efectos opuestos sobre la diferenciación genética. Es importante señalar que a pesar de que la altitud fue una de las variables escogidas, los análisis de regresión mostraron valores no significativos sobre la diferenciación genética ( $P = 0,75297$ ), además de su bajo valor, lo cual sugiere que podría no ser una buena variable predictiva a esta escala de trabajo. Por otra parte, la distancia y la temperatura sí mostraron valores significativos ( $P = 0,001$ ). La sobreposición de las tres variables del modelo tuvieron un valor bajo y negativo ( $g = -4\%$ ).

**Tabla 6.** Explicación de los cálculos de los componentes parciales basado en Lobo *et al.* 2002 para un conjunto de tres variables independientes. Las variables independientes analizadas aquí: diferencia de temperatura media anual (T), diferencia de altitud (A) y distancia en línea recta o euclidiana (D), corresponden al mejor modelo que explicó la diferenciación genética entre las poblaciones de *Rhinella spinulosa* en el altiplano de la Región de Antofagasta, según los criterios de AIC. La variable dependiente fue  $F_{st}$  (F). En cada paso la variable dependiente es modelada contra las variables independientes en un modelo de regresión lineal, siendo  $r^2$  interpretado como la fracción de la varianza total explicada por el modelo estadístico. Algunos de los pasos involucran obtener los residuos de todas las variables independientes, vía regresión de unas contra otras y conseguir de este modo, el modelo residual que será usado en el paso siguiente.

Pasos	Variable respuesta	Variables predictivas	Fracción	Residuo	Interpretación de $r^2$
1	F	A, T, D	$a + b + c + d + e + f + g$		Varianza total explicada
2	F	A	$a + d + e + g$		Explicada por ALTITUD
3	F	T	$b + d + f + g$		Explicada por TEMPERATURA
4	F	D	$c + e + f + g$		Explicada por DISTANCIA
5	F	A, T			
6	F	A, D			
7	F	T, D			
8	A	T, D		A(T,D)	
9	F	A(T,D)	$a$		Explicada solo por A
10	D	A, T		D(A,T)	
11	F	D(A,T)	$b$		Explicada solo por D
12	T	A, D		T(A,D)	
13	F	T(A,D)	$c$		Explicada solo por T
14			$d + e + g = (R^2_{Step 2}) - (R^2_{Step 9})$		
15			$d + f + g = (R^2_{Step 3}) - (R^2_{Step 13})$		
16			$e + f + g = (R^2_{Step 4}) - (R^2_{Step 11})$		
17			$d = (R^2_{Step 5}) - (R^2_{Step 16}) - [(R^2_{Step 9}) + (R^2_{Step 13})]$		Explicada por A y T
18			$e = (R^2_{Step 6}) - (R^2_{Step 15}) - [(R^2_{Step 9}) + (R^2_{Step 11})]$		Explicada por A y D
19			$f = (R^2_{Step 7}) - (R^2_{Step 14}) - [(R^2_{Step 11}) + (R^2_{Step 13})]$		Explicada por T y D
20			$g = (R^2_{Step 14}) - (R^2_{Step 17}) - (R^2_{Step 18})$		Explicada por A, T y D

**Figura 5.** Diagrama de Venn que muestra la variación de  $F_{st}$  (variable dependiente) en función de tres variables explicativas: diferencia de temperatura, diferencia de altitud y distancia en línea recta o euclidiana. El modelo explicó un 63% de la variación total. Los efectos puros de la variación de la diferencia de altitud, distancia en línea recta y diferencia de temperatura se muestran en los valores a, b y c, respectivamente. El efecto de las variables combinadas se muestra en los valores e, d y f. La variación combinada de las tres variables se muestra en el valor de g. La descomposición de la variación fue realizada mediante regresiones parciales, utilizando modelos lineales y considerando el porcentaje de variación explicada.



### *Análisis a nivel de subcuencas*

El AMOVA mostró que la mayor varianza genética se encontró entre las subcuencas. Por lo tanto, se analizó dentro de cada una de éstas las rutas y variables que mejor podían explicar la diferenciación genética, sin considerar el resto de las localidades. Contrario a lo que se obtuvo al analizar todas las poblaciones, dentro de las subcuencas se encontró que la distancia euclidiana no fue una variable escogida dentro del mejor modelo explicativo. La localidad de Carcote quedó fuera de estos análisis debido a que se ubica en una subcuenca diferente del resto de las localidades.

Dentro de las subcuencas Río Loa Alto y Río San Pedro los valores de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) fueron mucho más bajos que el global, 0,132 ( $P = 0,0003$ ) y 0,120 ( $P = 0,0145$ ) respectivamente, en cambio en la subcuenca del Salar de Atacama fue 0,671 ( $P = 0,0001$ ).

El criterio de Akaike mostró que el mejor modelo en la subcuenca Río Loa Alto fue la variable temperatura, la altitud fue equivalente pero tiene una menor probabilidad de ser el mejor modelo. La regresión lineal entre la temperatura y la diferenciación genética no fue significativa. En la subcuenca Río San Pedro, los mejores modelos fueron la temperatura y la altitud, pero la altitud tuvo una mayor probabilidad de ser el mejor modelo y explicó más de un 80% de la diferenciación genética, siendo significativo el análisis de regresión. En la subcuenca Salar de Atacama, el mejor modelo fue la ruta de menor pendiente, seguido por las rutas a través de los humedales y euclidiana, todas estas rutas fueron equivalentes y ninguna mostró valores significativos con la diferenciación genética al realizar los modelos de regresión (Tabla 7). Un resumen con los principales resultados obtenidos en este estudio se muestra en la tabla 8.

**Tabla 7.** Resultado de la selección del mejor modelo según AIC y del modelo de regresión lineal dentro de las subcuencas, en la Región de Antofagasta.

Subcuencas Variables	AICc	Delta AICc	AICc wi	r	r <sup>2</sup>	P
<b>Río Loa Alto</b>						
Temperatura	-31,372	0	0,194	0,478	0,229	0,072
Altitud	-29,952	1,42	0,096	0,39	0,152	0,151
Pendiente	-28,791	2,581	0,053	0,289	0,084	0,296
<b>Río San Pedro</b>						
Temperatura	-4,9	0	0,531	0,917	0,84	0,01
Altitud	-4,655	0,245	0,775	0,913	0,834	0,01
Pendiente	-2,507	2,393	0,558	0,873	0,762	0,023
<b>Salar de Atacama</b>						
Pendiente	11,598	0	0,276	0,565	0,319	0,089
A través de humedales	11,781	0,183	0,252	0,554	0,307	0,097
Euclidiana	11,839	0,241	0,244	0,55	0,303	0,099

**Tabla 8.** Resumen de los resultados obtenidos en relación a los objetivos del estudio.

Objetivos del estudio	Principales resultados
a) Estimar la diferenciación genética entre las poblaciones y su asociación con las cuencas hidrográficas.	El valor de diferenciación genética entre todas las poblaciones fue muy alto ( $F_{st} = 0,692$ ). El AMOVA mostró que las subcuencas explicaron más variación que las cuencas (33% y 10%, respectivamente). En dos de las tres subcuencas los valores de $F_{st}$ fueron moderados ( $F_{st} = 0,132$ y $0,120$ ).
b) Determinar si las variables ambientales y del paisaje permiten explicar de mejor modo la diferenciación genética, en comparación a un modelo de aislamiento por distancia.	Al analizar todas las poblaciones, se observa un patrón claro y significativo de aislamiento por distancia, el que sumado a la temperatura y la altitud, generó un modelo que explicó un 63% de la diferenciación genética. A nivel de subcuencas la distancia euclidiana no fue escogida como parte del modelo explicativo. En la cuenca Río Loa Alto la variable escogida fue la temperatura. En la subcuenca Río San Pedro fue la altitud. En la subcuenca del Salar de Atacama no fue posible determinar cuál variable sería el mejor modelo explicativo de la diferenciación genética.

## Discusión

Se ha observado que la distancia geográfica puede ser un factor de menor importancia en mantener la estructura genética, en relación a otras características del ambiente que puedan limitar la dispersión, tales como los gradientes climáticos y cambios en la topografía (Kozak *et al.* 2008). Los resultados de este estudio muestran que en las poblaciones de *R. spinulosa* estudiadas la diferenciación genética está fuertemente influenciada por un patrón de aislamiento por distancia, lo que sugiere una limitación en la dispersión entre poblaciones debido a este factor. Adicionalmente, se observó que la temperatura correspondería a un factor importante en la diferenciación poblacional, existiendo entre la temperatura y la distancia una interacción fuerte que no permitió dilucidar el aporte de cada una sobre la diferenciación genética.

Es interesante que las subcuencas explicaron un porcentaje mayor de la varianza genética de las poblaciones de *R. spinulosa* que las cuencas, y que la diferenciación dentro de cada subcuenca fue explicada por diferentes variables. Esto sugiere una fuerte asociación entre la estructura geográfica local y la estructura genética.

En la subcuenca Río Loa Alto el mejor modelo según AIC fue la diferencia de temperatura, explicando un 22% de la diferenciación genética, aunque no fue significativa la regresión lineal. Esta variable es un factor que determina la movilidad y adquisición de energía en los anfibios (Bennet 1990). Al ser organismos ectotermos, todos los aspectos de la historia de vida se ven influenciados por el medio externo (Ultsch *et al.* 1999). El estudio mostró que los individuos de El Tatio se diferenciaron significativamente de las otras localidades de la subcuenca y a su vez esta localidad fue la que presentó la menor temperatura ambiental. En esta localidad, el hábitat tanto de larvas, juveniles y adultos de *R. spinulosa* se restringe a aguas termales (25 °C durante todo el año). Todas estas características podrían favorecer la permanencia de los individuos en el lugar y evitar la dispersión a localidades contiguas, lo que implicaría una diferenciación genética mayor. Méndez y Correa-Solis (2009) y encontraron que en esta especie la edad y tamaño a la metamorfosis y la tasa de crecimiento son afectadas por la temperatura, reportando adaptación local a la temperatura para esta población, por lo que esta variable podría influenciar la diferenciación genética a nivel local.

En la subcuenca Río San Pedro el mejor modelo fue la diferencia de altitud; encontrándose una relación lineal significativa que explicó más del 80% de la diferenciación genética. Se observó que la menor diferenciación estuvo entre los individuos de las poblaciones



ubicadas a altitudes relativamente similares. Machuca es la localidad que se encuentra a mayor altitud dentro de esta subcuenca y es la más diferenciada genéticamente. La diferencia de altitud entre esta localidad y el resto de las localidades ubicadas en esta subcuenca (Río Grande, Katarpe y Vilama) es de más de 900 m y la diferencia de altitud entre éstas es de menos de 500 m (Tabla 1). Funk *et al.* (2005) y Spear *et al.* (2005) también encontraron que esta característica del paisaje estaba relacionada con la diferenciación genética en anfibios, presumiblemente debido a una menor movilidad de los individuos a medida que aumenta la pendiente. Esta característica estaría actuando como barrera a la dispersión de *R. spinulosa* lo que podría traducirse en menor flujo génico y una mayor diferenciación genética asociada a la diferencia de altitud.

En la subcuenca Salar de Atacama el mejor modelo fue la ruta de menor pendiente, sin embargo, esta ruta fue equivalente a las otras dos y la regresión lineal no fue significativa para ninguna. Con este resultado, no fue posible atribuir a ninguna de rutas los altos valores de diferenciación dentro de esta subcuenca. Es probable que la disposición espacial de las localidades dentro de esta subcuenca permita la existencia de altos valores de diferenciación, ya que podría implicar una menor probabilidad de contacto entre ellas (ver Figura 2). Correa *et al.* (*en prensa*) en un estudio filogeográfico utilizando la región D-Loop, postulan que las poblaciones de Peine, Tilomonte y Q. Jere, serían relictas, y que habrían quedado aisladas, luego de sufrir una retracción en su distribución. Esto podría explicar los altos niveles de diferenciación observados incluso entre poblaciones relativamente cercanas como Peine y Tilomonte.

Aunque se ha argumentado que los patrones de flujo génico contemporáneos a escala de paisaje, pueden no ser obtenidos al utilizar marcadores mitocondriales (Hull *et al.* 2008), en este estudio fue posible obtener información acerca de los factores que potencialmente estarían actuando sobre la diferenciación genética de *R. spinulosa* a diferentes escalas espaciales. La variable distancia euclidiana entre localidades estaría otorgando información acerca de la diferenciación genética a una escala espacial mayor, la diferencia en altitud a una escala espacial menor y la diferencia en temperatura a ambas escalas.

Una limitante de este trabajo corresponde al uso de un solo tipo de marcador. Esto debido a que, si bien la información genética nos permite conocer cómo los organismos responden al paisaje, estos procesos espaciales pueden no tener una “señal genética” única, siendo entonces las conclusiones de este estudio dependientes del marcador utilizado (Latta 2006). Por lo anterior, complementar los resultados de este trabajo utilizando otro tipo de

marcador genético que informe a una escala temporal más próxima como AFLPs o microsatélites, permitirá entender de mejor manera el fenómeno de la variación genética de esta especie en una dimensión temporal reciente.

Este tipo de estudio que incorpora las variables del paisaje y del ambiente en los análisis de la estructura genética de las poblaciones, será cada vez más importante para entender los procesos espaciales y temporales que determinan la estructura genética en diferentes especies (Kozak *et al.* 2008). La integración estos datos además del manejo de otras técnicas que evalúen estas correlaciones, por ejemplo, la utilización de modelos no lineales (Balkenhol *et al.* 2009) podrá mostrar una nueva aproximación de las causas ecológicas sobre los patrones evolutivos.

## Referencias

- Abele, G. 1991. The influence of age, climate, and relief on the preservation of volcanic landforms in the North Chilean Andes. *Bamberger Geographische Schriften* 11: 45-57.
- Aceituno, 1997. Aspectos generales del clima en el altiplano sudamericano. En: Universidad de Chile (ed), *Altiplano, Ciencia y Conciencia de los Andes*. Actas del II Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos. Universidad de Chile, pp 63-69.
- Addinsoft, 2005. XLSTAT-Pro Your data analysis solution. Software, version 2009.1.02. <http://www.xlstat.com>
- Anderson, M. J. y Gribble, N. A. 1998. Partitioning the variation among spatial, temporal and environmental components in a multivariate dataset. *Aust. J. Ecol.* 23: 158-167.
- Arroyo, M. T. K., Squeo, F. A., Armesto, J. y Villagrán, C. 1988. Effects of aridity on plant diversity in the northern Chilean Andes: results of a natural experiment. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 55-78.
- Balkenhol, N., Waits y L. P. y Dezzani, R. J. 2009. Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data. *Ecography* doi: 10.1111/j.1600-0587.2009.05807.x
- Bennett, A. F. 1990. Thermal-dependence of locomotor capacity. *Am. J. Physiol.* 259: R253–R258.
- Broquet, T., Ray, N., Petit, E., Fryxell, J.M. y Burel, F. 2006. Genetic isolation by distance and landscape connectivity in the American marten (*Martes americana*). *Land. Ecol.* 21: 877-889.
- Burnham, K. P y Anderson, D. R. 2002. *Model Selection and Multimodel Inference. A Practical Information - Theoretical Approach*. Springer.
- Castillo, G., Castro, M., Bahamondes. M. y Lorca, V. 1997. Caracterización de la calidad sanitaria de aguas de bofedales y vegas del área andina chilena. En: Universidad de Chile (ed), *Altiplano Ciencia y Conciencia de los Andes*. Actas del II Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos. Universidad de Chile, pp 117-123.
- Cei, J. 1962. *Batracios de Chile*. Ediciones Universidad de Chile. cviii + 128 p.

- Clark, R., Brown, W., Stechert, R. y Zamudio, K. 2008. Integrating individual behaviour and landscape genetics: the population structure of timber rattlesnake hibernacula. *Mol. Ecol.* 17: 719-730.
- Correa, C., Pastenes, L., Veloso, A., Sallaberry, M., Méndez, M. Phylogeography of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) in northern Chile. *Amphibia-Reptilia (en prensa)*.
- Dayton, G. H. y Fitzgerald, L. A. 2006. Habitat suitability models for desert amphibians. *Biol. Conserv.* 132: 40-49.
- Diniz-Filho, J. A. F. 2000. Métodos Filogenéticos Comparativos. Holos, Ribeirão Preto. 162 p.
- Diniz-Filho, J. A. F., Telles, M. P. C., Bonatto, S., Eizirik, E., De Freitas, Th., De Marco, P., Santos, F., Sole-Cava, A. y Soares, T. N. 2008. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *J. Biogeogr.* 11: 753-763.
- Espinoza, R. E. y Quinteros, S. 2008. A hot knot of toads: Aggregation provides thermal benefits to metamorphic Andean toads. *J. Therm. Biol.* 33: 67-75.
- Excoffier, L. Laval, G. y Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online* 1: 47-50.
- Faúndez, L. y Escobar, M. 2006. Estudio de los sistemas vegetacionales azonales hídricos del altiplano. Biota Gestión y Consultorías Ambientales Ltda. 47 p.
- Funk, CH., Blouin, M., Corn, P., Maxell, B., Pilliod, D., Amish, S. y Allendorf, F. 2005. Population structure of columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Mol. Ecol.* 14: 483-496.
- Goebel, A., Donnelly, J. y Atz, M. 1999. PCR Primers and amplifications 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. Phylog. Evol.* 11: 163-199.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F. y Cosson, J. 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261–1280.
- Hall, T. 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT, version 5.0.9, 2001. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hartl, D. L. y Clark, A. G. 1997. Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer.

- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. y Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25: 1965-1978.
- Hull, J., Hull, A., Sacks, J., Smith, J. y Holly, E. 2008. Landscape characteristics influence morphological and genetic differentiation in a widespread raptor (*Buteo jamaicensis*). *Mol. Ecol.* 17: 810-824.
- Jowett, T. 1986. Preparation of nucleic acids. En: Roberts, D. B (ed), *Drosophila: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 275-286.
- Kozak, K., Graham, C. y Wiens, J. 2008. Integrating GIS-based environmental data into evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 23: 141-148.
- Lambrinos, J. G. y Kleier, C. C. 2003. Thermoregulation of juvenile Andean Toads (*Bufo spinulosus*) at 4300 m. - *J. Therm. Biol.* 28: 15-19.
- Legendre, P. y Legendre, L. 1998. *Numerical ecology*. Elsevier, Amsterdam.
- Latta RG (2006) Integrating patterns across multiple genetic markers to infer spatial processes. - *Landsc. Ecol.* 21: 809-820.
- Lobo, J. M., Lumaret, J. y Jay-Robert, P. 2002. Modelling the species richness distribution of French dung beetles (Coleoptera, Scarabaeidae) and delimiting the predictive capacity of different groups of explanatory variables. - *Global Ecol. Biogeogr.* 11: 265-277.
- Manel, S., Schwartz, M., Luikart, G. y Taberlet, P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. - *Trends Ecol. Evol.* 18:189-197.
- Manly, B. 1985. *The Statistics of Natural Selection*. Chapman and Hall, London.
- Méndez, M., Soto, E., Correa, C., Veloso, A., Vergara, E., Sallaberry, M. e Iturra, P. 2004. Diferenciación morfológica y genética entre poblaciones chilenas de *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). - *Rev. Chil. Hist. Nat.* 77: 559-567.
- Méndez, M. A. y Correa-Solis, M. 2009. Divergence in morfometric and life history trait in two thermally contrasting Andean populations of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *J. Therm. Biol.* doi:10.1016/j.jtherbio.2009.06.006
- Michels, E., Cottenie, K., Neys, L., De Gelas, K., Coppin, P. y De Meester L. 2001. Geographical and genetic distances among zooplankton populations in a set of interconnected ponds: a plea for using GIS modeling of the effective geographical distance. - *Mol. Ecol.* 10: 1929-1938.

- R Development Core Team. 2009. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>
- Rangel, T. F. L. V. B., Diniz-Filho, J. A. F. y Bini, L. M. 2006. Towards an integrated computational tool for spatial analysis in macroecology and biogeography. - *Global Ecol. Biogeogr.* 15: 321-327.
- Rohlf, F. J. 2000. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Exeter Publishing, Ltd. Setauket, NY.
- Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X. y Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Ruiz, G., Rosenmann, M. y Veloso, A. 1989. Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Comp. Bioch. Phys.* 94A: 643-646.
- Salazar, C. 1997. Hidrología del sector altiplánico chileno. En: Universidad de Chile (ed), Altiplano Ciencia y Conciencia de los Andes. Actas del II Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos. Universidad de Chile, pp 71-77.
- Seppä, P. y Laurila, A. 1999. Genetic Structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo Bufo*. *Heredity* 82: 309-317.
- Sinsch, U. 1989. Behavioural thermoregulation of the Andean Toad (*Bufo spinulosus*) at high altitudes. *Oecologia* 80: 32-38.
- Spear, S. F., Peterson, Ch., Matocq, M. y Storfer, A. 2005. Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Mol. Ecol.* 14: 2553-2564.
- Statsoft, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6.0 <http://www.statsoft.com>
- Telles, M. P. C., Diniz-Filho, J. A. F. 2005. Multiple Mantel tests and isolation-by-distance, taking into account long-term historical divergence. *Genet. Mol. Res.* 4: 742-748.
- Telles, M. P. C., Diniz-Filho, J. A. F., Bastos, R. P., Soares, T. N., Guimaraes, L. D. y Lima, L. P. 2007. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: Correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. *Biol. Conserv.* 139: 37-46.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tracy, C. R., Christian, K. A., O'Connor, M. P. y Tracy, C. R. 1993. Behavioral thermoregulation by *Bufo americanus*: the importance of the hydric environment. *Herpetologica* 49: 375-382.
- Ultsch, G. R., Bradford, D. F. y Freda, J. 1999. Physiology: Coping with the Environment. En: R. W. McDiarmind y Altig, R. A. (eds), *Tadpoles: The biology of anuran larvae*. Chicago: University of Chicago Press, pp. 189-214.
- 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.
- Wiens, J. A. 2001. The landscape context of dispersal. En: Clobert, J. *et al.* (eds), *Dispersal*. Oxford University Press, pp. 96-109.