

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Forestales

Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza

PATRONES DE DIVERSIDAD GENEALÓGICA EN EL ANURO *RHINELLA SPINULOSA*;
CONSERVACIÓN INTRAESPECÍFICA DE SUS LINAJES Y POSIBLES REFUGIOS
PLEISTOCÉNICOS.

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

HUGO FELIPE SALINAS MASSABÓ

Médico Veterinario

SANTIAGO - CHILE.

2013

Agradecimientos

En primer lugar agradezco el constante apoyo de mi familia y de Fernanda durante la realización del magister y en particular de la tesis.

Además agradezco a mis compañeros del laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias por la continua colaboración y discusión que se genera, especialmente a mi tutor el Dr. Marco Méndez por la confianza depositada. Finalmente me gustaría agradecer al Proyecto Fondecyt 1120872 cuyo investigador principal es el Dr. Pedro Victoriano por el financiamiento y a mis profesores consejeros Dr. Jaime Hernandez y Dra Rosa Scherson por sus valiosos consejos.

Tabla de contenidos

Resumen	1
Palabras claves	1
Introducción	2
Objetivos	6
Materiales y Métodos	7
1- Extracción de ADN, secuenciación y alineamiento	7
2.- Objetivo específico 1: Reconstruir la genealogía de <i>R. spinulosa</i> utilizando marcadores mitocondriales (mtDNA) para las poblaciones distribuidas en Chile (filogenia intraespecífica).....	11
3.-Objetivo específico 2: Estimar la variación genética y la estructura genética espacial en las poblaciones de <i>R. spinulosa</i> distribuidas en Chile; y la analizar el comportamiento demográfico de éstas.	11
3.1.- <i>Análisis filogeográfico</i>	11
3.2.- <i>Análisis demográfico</i>	12
4.- Objetivo específico 3: Determinar áreas de distribución potencial para el anfibio <i>R. spinulosa</i> en el presente, durante el último máximo glacial y las áreas más estables en el tiempo mediante modelos de distribución potencial.....	13
4.1.- <i>Evaluación de los modelos generados</i>	17
4.2.- <i>Integración de los modelos del presente y UMG</i>	17
5.-Objetivo específico 4: Evaluar la representatividad de la diversidad genealógica dentro de las áreas protegidas (SNASPE) y determinar aquellas localidades que aportarían mayor diversidad genealógica complementaria a la actualmente resguardada.....	18
5.1.- <i>Diversidad genealógica dentro de las áreas protegidas del SNASPE</i>	19
5.2.- <i>Diversidad filogenética complementaria</i>	20
Resultados	21
1- Extracción de ADN, secuenciación y alineamiento	21
2.- Objetivo específico 1: Reconstruir la genealogía de <i>R. spinulosa</i> utilizando marcadores mitocondriales (mtDNA) para las poblaciones distribuidas en Chile (filogenia intraespecífica).....	21
3.-Objetivo específico 2: Estimar la variación genética y la estructura genética espacial en las poblaciones de <i>R. spinulosa</i> distribuidas en Chile; y la analizar el comportamiento demográfico de éstas.	25
3.1.- <i>Análisis filogeográfico</i>	25

3.2.-Análisis demográfico de poblaciones	31
4.- Objetivo específico 3: Determinar áreas de distribución potencial para el anfibio <i>R. spinulosa</i> en el presente, durante el último máximo glacial y las áreas más estables en el tiempo mediante modelos de distribución potencial.	34
4.1.-Modelos discretos	34
4.2.-Modelos probabilísticos – mapas continuos	37
5.-Objetivo específico 4: Evaluar la representatividad de la diversidad genealógica dentro de las áreas protegidas (SNASPE) y determinar aquellas localidades que aportarían mayor diversidad genealógica complementaria a la actualmente resguardada.....	41
5.1.-Diversidad genealógica dentro de las áreas protegidas del SNASPE	41
5.2.- Diversidad filogenética complementaria	43
Discusión	51
Bilbiografía	55

Índice de figuras

Figura 1. Localidades conocidas para <i>R.spinulosa</i>	10
Figura 2. Distribución geográfica de los linajes encontrados mediante el análisis filogenético bayesiano de <i>R. spinulosa</i>	22
Figura 3. Distribución geográfica de las localidades pertenecientes al linaje 2.	23
Figura 4. Distribución geográfica de las localidades pertenecientes al linaje 3 y 4.	24
Figura 5. Red de haplotipos para el gen mitocondrial D-loop obtenido mediante el método Median joining.	27
Figura 6. Agrupación espacial Bayesiana generada mediante el programa Geneland.	30
Figura 7. Distribución mismatch entre pares de secuencia bajo un modelo de expansión.....	32
Figura 8. Skyline plot bayesiano, muestra la historia demográfica de las distintas agrupaciones que entrego geneland.	33
Figura 9. Modelos de distribución discretos a partir de variables biolímáticas seleccionados para <i>R.spinulosa</i>	39
Figura 10. Modelos de distribución continuos a partir de variables biolímáticas seleccionados para <i>R.spinulosa</i>	40
Figura 11. Diversidad complementaria a los Parque Nacionales; criterio estricto.	47
Figura 12. Diversidad complementaria a las áreas protegidas SNASPE; criterio estricto.	48
Figura 13. Diversidad complementaria a los parques nacionales; criterio laxo..	49
Figura 14. Diversidad complementaria a las áreas protegidas SNASPE; criterio laxo.	50

Índice de tablas

Tabla 1. Localidades utilizadas para los análisis de ADN (gen mitocondrial D-loop).	8
Tabla 2. Índices de variación genética intrapoblacional por localidad.	25
Tabla 3. Análisis Molecular de Varianza. Análisis de los componentes de la varianza molecular entre poblaciones y dentro de poblaciones. En este análisis se consideró a la localidad de Quebrada de Jere dentro del grupo que forman todas las localidades entre Carcote y Socaire.	28
Tabla 4. Análisis Molecular de Varianza. Análisis de los componentes de la varianza molecular entre poblaciones y dentro de poblaciones. En este análisis se consideró a la localidad de Quebrada de Jere formando un grupo junto a Tilomonte y Peine.	29
Tabla 5. Índices de variación genética por agrupaciones Geneland.	30
Tabla 6. Resultados de las pruebas D de Tajima y F_s de Fu para las seis poblaciones de <i>R. spinulosa</i> inferidas mediante Geneland.	31
Tabla 7. Evaluación de los modelos de distribución discretos.	35
Tabla 8. Evaluación de modelos de distribución continuos.	36
Tabla 9. Localidades de <i>R. spinulosa</i> utilizadas para los análisis de ADN, que se encuentran protegidas por el sistema nacional de áreas protegidas (SNASPE) y aquellas que se encuentran en un área buffer de 10 Km.	42
Tabla 10. Valor de la Diversidad filogenética intraespecífica (genealógica) resguardada considerando las localidades que se encuentran dentro de las áreas protegidas del SNASPE y las localidades dentro de los Parque Nacionales.	43
Tabla 11. Valor de la Diversidad filogenética intraespecífica (genealógica) resguardada considerando las localidades que se encuentran dentro de las áreas protegidas del SNASPE y las localidades dentro de los Parque Nacionales; incluyendo aquellas localidades que se encuentran dentro de un área buffer de 10 km alrededor de esas áreas.	43
Tabla 12. Diversidad filogenética complementaría a los Parques Nacionales.	44
Tabla 13. Diversidad filogenética complementaría a las área SNASPE.	45

Tabla 14. Diversidad filogenética complementaria a Parque nacionales y localidades dentro de un área buffer de 10 Km..... 45

Tabla 15. Diversidad filogenética complementaria a áreas SNASPE y localidades dentro de un área buffer de 10 Km..... 46

Resumen

La biodiversidad es un término amplio y unificador que incluye a la diversidad genética. Actualmente este componente ha adquirido mayor relevancia porque se considera un recurso importante para que las poblaciones enfrenten los cambios ambientales (potencial evolutivo). *Rhinella spinulosa* es un anfibio que presenta una amplia distribución geográfica, desde el Altiplano hasta la Patagonia asociada principalmente a ambientes andinos. Es una especie clasificada como “preocupación menor” (IUCN), sin embargo hasta este trabajo no se había evaluado la singularidad evolutiva y genética de las subunidades biogeográficas, los procesos evolutivos que mantienen la diversidad genética, ni el grado de amenaza sobre estos procesos. Se evaluó la diversidad genética y las relaciones evolutivas de esta especie en Chile, utilizando un marcador genético (región Control, mtDNA); y el efecto que podría haber tenido el cambio climático desde el último máximo glacial (UMG) hasta el presente, mediante análisis de modelamiento de nicho. Finalmente se evaluó el grado en que las áreas protegidas del SNASPE se hacen cargo de la protección de la diversidad genética y los procesos evolutivos subyacentes.

Se encontraron cuatro linajes altamente diferenciados y segregados latitudinalmente, el primero correspondería a las poblaciones que se encuentran entre Umaqui (69°23'O; 17°44'S) y el Salar de Alconcha (68°29'O; 21°35'S). El segundo grupo incluiría a todas las poblaciones entre Carcote (68°19'O; 21°16'S) y Tilomonte (68°06'O; 23°47'S). El tercer grupo incluye a todas las poblaciones entre Portillo (70°10'O; 32°52'S) y El Flaco (70°27'O; 34°57'S), y el cuarto grupo a las poblaciones al sur de Lircay (70°59'O; 35°34'S). Los modelos de distribución sugieren leves cambios en la distribución de *R.spinulosa* desde el UMG al presente, los que habrían ocurrido en los extremos, norte y sur, de la distribución chilena de este anfibio. En términos generales la diversidad genealógica de esta especie se encontró escasamente representada dentro de las áreas protegidas del SNASPE, especialmente los linajes dos y tres. Los análisis de diversidad complementaria muestran que la protección de algunas poblaciones como Farellones y Quebrada de Jere, permitiría aumentar significativamente el grado de protección de esta especie.

Palabras claves

anfibios, filogeografía, modelamiento de distribución, diversidad genética

PATRONES DE DIVERSIDAD GENEALÓGICA EN EL ANURO *RHINELLA SPINULOSA*; CONSERVACIÓN INTRAESPECÍFICA DE SUS LINAJES Y POSIBLES REFUGIOS PLEISTOCÉNICOS.

Introducción

La biodiversidad es un término amplio que abarca la variación natural en todas sus formas, niveles y combinaciones (Gaston & Spicer 2004; Gaston 2010), incluyendo la diversidad genética; la que junto con la diversidad de especies y ecosistemas corresponden a los tres niveles biológicos, reconocidos por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) para los cuales deben enfocarse los esfuerzos de conservación (McNeely *et al.* 1990).

Gran parte de los proyectos de conservación orientan sus esfuerzos en maximizar la riqueza taxonómica y el endemismo a nivel de especie (Purvis & Hector 2000). Por ejemplo los “Hotspots de Biodiversidad” (<http://www.biodiversityhotspots.org>) categorizan estas áreas considerando ambos aspectos, junto al grado de amenaza (McNeely *et al.* 1990; Reid 1998). En el último tiempo el componente genético ha adquirido mayor relevancia, fundamentalmente porque se sabe que realizar acciones de conservación solamente a nivel de especie no garantiza la protección de la diversidad intraespecífica, que es el principal recurso que tienen las poblaciones para enfrentar los cambios ambientales, es decir el potencial evolutivo de éstas (Barker 2002).

En Chile, el componente intraespecífico se considera en la Estrategia Nacional de Biodiversidad pero no existen proyectos de conservación que consideren este aspecto de manera explícita y una de las principales razones sería la falta de información disponible para muchas de las especies chilenas (ejemplos en: Marin *et al.* 2008; Correa *et al.* 2010; Vianna *et al.* 2011; Nuñez *et al.* 2011; Fuentes-Hurtado *et al.* 2011).

La forma en que la diversidad biológica se asocia en el espacio se encontraría determinada por múltiples causas, entre las principales se consideran las glaciaciones pleistocénicas junto a los factores tectónicos y el vulcanismo. La oscilación climática severa, producida durante los ciclos glaciares, habría producido cambios en la distribución de las especies, algunas se habrían

extinguido en parte de su distribución, otras se habrían dispersado a nuevos territorios y otras habrían sobrevivido en refugios desde los cuales posteriormente se habrían expandido (Hewitt 2000). En cualquier caso estos cambios en la distribución habrían tenido consecuencias directas sobre la biodiversidad, incluyendo cambios en la variación y estructura genética de muchas especies.

La literatura sugiere que durante las glaciaciones los rangos geográficos de muchas especies se restringieron a uno o pocos refugios al sur, los cuales conformarían valiosos reductos para la sobrevivencia de especies en el largo plazo (Taberlet & Cheddadi 2002). Posterior a cada evento glacial, las poblaciones se expandieron por largas rutas avanzando desde las áreas refugio hacia latitudes y altitudes menores (Hewitt 2000; Taberlet & Cheddadi 2002). En estas expansiones, los dispersores rápidos habrían establecido colonias de avanzada respecto a las poblaciones refugiales y, en consecuencia, en las nuevas poblaciones predominarían los genomas de los dispersores rápidos sobre los migrantes tardíos (Hewitt 1996, 2000). Los repetitivos eventos migratorios producirían una disminución de la variación genética a menor altitud, luego de una serie de cuellos de botella sobre los genomas colonizadores (Hewitt 1996, 2000; Bernatchez & Wilson 1998; ejemplos en Davis & Shaw 2001).

Otros procesos evolutivos también podrían explicar los patrones de diversidad genética actuales (Hewitt & Ibrahim 2001; Canestrelli *et al.* 2010). Por ejemplo, que las poblaciones hayan sobrevivido en múltiples refugios dentro de una matriz inhóspita, en este caso se esperaría que el patrón filogeográfico actual se correspondiera con una mezcla de linajes provenientes de distintas poblaciones que sobrevivieron aisladas entre sí (Petit *et al.* 2003; Canestrelli *et al.* 2010; Shafer *et al.* 2011). A diferencia del modelo de expansión latitudinal, en este caso, se esperaría una mayor diversidad genética en aquellas áreas colonizadas posterior a la glaciación que en aquellas áreas que sirvieron de refugio.

Durante el Último Máximo Glacial, alrededor de 20.000 años atrás, las masas de hielo habrían cubierto totalmente el territorio continental de Chile hasta el nivel del mar, al sur de los 43° S (Hollin & Schilling 1981; Villagrán 1991; Armesto *et al.* 1994). Al norte, los glaciares ocuparon la Cordillera de los Andes hasta la latitud aproximada de Santiago (34° S) donde descendieron hasta los 500 m.s.n.m (Solbrig 1976; Victoriano *et al.* 2008) y en la Región de los Lagos, hasta los pies de la cordillera de la Costa (Villagrán 1991, 2001; Armesto *et al.* 1994). Victoriano *et al.* (2008) encontró que los reptiles *Liolaemus lemniscatus* y *L. tenuis* habrían seguido un patrón de

evolución asociado a ciclos de glaciaciones recientes y a los cambios florísticos asociados a estos eventos glaciares. Las poblaciones de *L. tenuis* en su rango más austral presentaron una menor diversidad nucleotídica y haplotípica al sur de los 38°, este patrón filogeográfico se encontraría asociado a la expansión reciente de la distribución de esta especie posterior a la retirada de los hielos glaciares. Sérsic *et al.* (2011), encontró en la Patagonia Chilena-Argentina patrones filogeográficos congruentes entre plantas y vertebrados terrestres que sugieren la presencia de al menos seis áreas estables donde las especies habrían sobrevivido durante el Último Máximo Glacial. En Chile habrían existido tres de estas áreas estables, las cuales se encontrarían en la costa alrededor de los 36° y 41° de latitud sur, y en el norte de la Isla Grande de Chiloé, el resto de las áreas estables se habrían encontrado en Argentina.

Actualmente la información sobre refugios pleistocénicos en la cordillera de Los Andes es escasa y en general se encuentra asociada a vegetación de bosques. Se han postulado potenciales refugios glaciares andinos para los bosques de *Nothofagus alpina* (= *N. nervosa*) y *N. obliqua* (Marchelli & Gallo 2006; Azpilicueta *et al.* 2009), mientras que para *Eucryphia cordifolia*, Segovia *et al.* (2012) señalan que no sería posible descartar que algunas poblaciones hayan sobrevivido en refugios andinos durante la última glaciación. En vertebrados, recientemente se ha encontrado evidencia de múltiples refugios, durante el Último Máximo Glacial, asociados a bosques andinos para el reptil *Liolaemus pictus* (Vera-Escalona *et al.* 2012).

Los anfibios son buenos modelos biológicos para evaluar patrones de diversidad y estructuración genética (Ej: Estoup *et al.* 2001; Monsen & Blouin 2003; Shaffer *et al.* 2004; Correa *et al.* 2010) debido a que presentan vagilidad limitada y en muchos casos alta filopatría (Beebee 1996, 2005). Como consecuencia, las poblaciones tenderían a presentar una estructuración genética alta en distancias geográficas relativamente cortas (Zeisset & Beebee 2008), reteniendo señales de eventos históricos que habrían generado la distribución actual de las especies (Zeisset & Beebee 2008).

Rhinella spinulosa (Anura: Bufonidae) es un anfibio que presenta una amplia distribución geográfica, desde el Altiplano de Chile, Argentina, Bolivia y Perú hasta la Patagonia argentina (*R. s. papillosus*) (Angulo *et al.* 2010), principalmente asociada a ambientes andinos hasta los 5100 m.

Mediante marcadores moleculares (RAPD y mtDNA D-loop) se ha logrado establecer que en Chile esta especie contaría con al menos tres linajes. El primero incluiría las poblaciones comprendidas entre el límite norte de Chile hasta el Salar Alconcha (21° 03' 39" S; 68° 29' 18" O), el segundo las poblaciones ubicadas entre el Salar de Carcote (21° 16' 46" S; 68° 19' 21" O) hasta la localidad de Tilomonte (23°47'42" S; 68°06'34" O) y el tercer linaje correspondería a las poblaciones que se distribuyen en la cordillera y pre-cordillera de Chile Central (Méndez et al. 2004; Correa et al. 2010). Además la evidencia molecular sugiere que las poblaciones de Peine, Tilomonte y Quebrada Jere corresponderían a zonas de contacto secundario entre dos subclados del linaje que incluye a las poblaciones de la Región de Antofagasta (Correa *et al.* 2010; Gallardo *et al.* 2011). Para las poblaciones que habitan en esta región tanto la temperatura como la altitud podrían actuar como barreras geográficas para poblaciones dentro de subcuencas, sin embargo a una escala geográfica mayor las diferencias genéticas se encontrarían mejor explicadas por un modelo de aislamiento por distancia, ya que los patrones asociados a las características del paisaje se diluirían en un contexto biogeográfico o filogenético (Gallardo *et al.* 2011).

La lista roja de la UICN clasifica a esta especie en la categoría de “preocupación menor” (Angulo *et al.* 2010). Sin embargo, en la actualidad no se ha evaluado la singularidad evolutiva y genética de las subunidades geográficas, junto con el rol que podrían jugar tales poblaciones en los procesos evolutivos que promueven la mantención de la diversidad genética, ni el grado de amenaza sobre estos procesos.

El presente proyecto permitió evaluar los patrones de diversidad filogenética a nivel intraespecífico (o diversidad genealógica) a lo largo de la distribución chilena de *R. spinulosa* y su correspondencia con el cambio climático experimentado desde el último máximo glacial hasta el presente. Además se evaluó la protección de las variantes genéticas por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNASPE).

Objetivos

Objetivo general: Caracterizar la historia evolutiva de *Rhinella spinulosa* y determinar su representatividad dentro de las áreas silvestres protegidas.

Objetivo específico 1: Reconstruir la genealogía de *R. spinulosa* utilizando marcadores mitocondriales (mtDNA) para las poblaciones distribuidas en Chile.

Objetivo específico 2: Estimar la variación genética y la estructura genética espacial en las poblaciones de *R. spinulosa* distribuidas en Chile; y analizar el comportamiento demográfico de éstas.

Objetivo específico 3: Determinar áreas de distribución potencial para el anfibio *R. spinulosa* en el presente, durante el último máximo glacial y las áreas más estables en el tiempo mediante modelos de distribución potencial.

Objetivo específico 4: Evaluar la representatividad de la diversidad genealógica dentro de las áreas protegidas (SNASPE) y determinar aquellas localidades que aportarían mayor diversidad genealógica complementaria a la actualmente resguardada.

Materiales y Métodos

La metodología del presente proyecto se divide en dos secciones. La primera se relaciona con los análisis moleculares (ADN), para los cuales se utilizaron 454 individuos pertenecientes a 57 localidades de la distribución chilena de *R. spinulosa* (Tabla 1; Figura 1). La totalidad de estos individuos estaban depositados en la Colección Herpetológica de la Universidad de Chile (DBGUCH) que se mantiene en el Laboratorio de Genética y Evolución del Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (GEVOL). La segunda parte correspondió al modelamiento de la distribución de *R. spinulosa* para el presente y durante el UMG. Esto se realizó a partir de coordenadas georeferenciadas que incluyeron a poblaciones de toda la distribución de *R. spinulosa* incluyendo Chile, Perú, Bolivia y Argentina las cuales se encontraban en la base de datos del Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (GEVOL) (Figura 1). Esta información fue complementada mediante la revisión de informes de proyectos y líneas base de fauna, disponibles de manera libre en internet, en aquellas áreas en que se encontraron las mayores brechas de distribución de la especie.

1- Extracción de ADN, secuenciación y alineamiento

La extracción de ADN se realizó utilizando el método de sales de (Jowett 1986) modificado y optimizado para *R. spinulosa* en el Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Posteriormente se amplificó un fragmento de la región control mitocondrial utilizando los partidores CytbA-L (5'-GAATTGGRGGWCAACCAGTAGAAGACCC-3') y controlP-H (5'-GTCCATAGATTCASTTCCGTCAG-3') reportados por (Goebel et al 1999). La reacción incluyó 3mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada dNTP, 0,26 mM de cada primer, 1,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 50-100 ng de ADN total. El perfil térmico del PCR fue: 94°C por 2 minutos, seguido de 36 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos y 72°C por 90 segundos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. El producto de PCR fue secuenciado en ambas direcciones en un secuenciador automático ABI3730XL (Applied Biosystems) en Macrogen Inc, Corea (www.macrogen.com).

Las secuencias de cada individuo fueron editadas usando el programa BioEdit v.7.07.0 (Hall 1999). La alineación múltiple de las secuencias editadas se realizó en el programa Clustal X v. 1.81 (Thompson *et al.* 1997) utilizando los parámetros predeterminados.

Tabla 1. Localidades utilizadas para los análisis de ADN (gen mitocondrial D-loop).

Localidad	Región/Provincia	Latitud (S)	Longitud (O)	Altura (msnm)
Umaqui	Arica y Parinacota	17° 44' 12,7"	69° 23' 26,4"	4130
Azapa	Arica y Parinacota	18° 31' 14,4"	70° 10' 29,6"	287
Lluta	Arica y Parinacota	18° 23' 46,2"	69° 58' 23,1"	836
Socoroma	Arica y Parinacota	18° 15' 48,0"	69° 36' 09,0"	3058
Zapahuira	Arica y Parinacota	18° 20' 02,8"	69° 35' 37,3"	3320
Putre	Arica y Parinacota	18° 11' 46,5"	69° 33' 34,7"	3507
Pacollo	Arica y Parinacota	18° 10' 46,2"	69° 31' 10,1"	4090
Vioco	Arica y Parinacota	18° 02' 43,1"	69° 16' 52,5"	4383
Chivatambo	Arica y Parinacota	18° 21' 53,7"	69° 16' 45,3"	4329
Lauca	Arica y Parinacota	18° 11' 39,3"	69° 16' 24,8"	4395
Parinacota	Arica y Parinacota	18° 12' 02,2"	69° 16' 04,0"	4445
Colpa	Arica y Parinacota	18° 03' 33,5"	69° 13' 58,6"	4353
Caquena	Arica y Parinacota	18° 03' 45,1"	69° 12' 23,1"	4398
Chungará	Arica y Parinacota	18° 13' 45,6"	69° 11' 02,6"	4562
Surire	Arica y Parinacota	18° 51' 13,6"	69° 08' 31,9"	4081
Chusmisa	Tarapacá	19° 40' 57,8"	69° 10' 59,7"	3213
Quebe	Tarapacá	19° 27' 30,6"	68° 48' 41,2"	3958
Isluga	Tarapacá	19° 15' 22,8"	68° 42' 22,8"	3776
Cancosa	Tarapacá	19° 57' 23,6"	68° 41' 59,0"	4007
Huasco	Tarapacá	20° 15' 45,9"	68° 52' 31,9"	3798
Collacagua	Tarapacá	20° 08' 02,4"	68° 50' 38,5"	3859
El Piga	Tarapacá	20° 01' 56,8"	68° 49' 16,4"	3944
Michincha	Tarapacá	20° 58' 39,5"S	68° 33' 02"W	4131
Alconcha	Antofagasta	21° 03' 39"	68° 29' 18"	4100
Carcote	Antofagasta	21° 16' 58,9"	68° 19' 27,9"	3688
Lasana	Antofagasta	22° 16' 23,7"	68° 37' 48,7"	2525
Cupo	Antofagasta	22° 06' 56,5"	68° 18' 56,7"	3379

Tabla 1(continuación). Localidades utilizadas para los análisis de ADN (gen mitocondrial D-loop)

Localidad	Región/Provincia	Latitud (S)	Longitud (O)	Altura
Río Grande	Antofagasta	22° 40' 08,4"	68° 13' 44,7"	3045
Caspana	Antofagasta	22° 20' 16,0"	68° 12' 36,9"	3245
Katarpe	Antofagasta	22° 50' 02,2"	68° 11' 54,8"	2460
Vilama	Antofagasta	22° 52' 01,4"	68° 10' 56,6"	2579
Cuesta Chita	Antofagasta	22° 25' 04,3"	68° 10' 28,3"	3741
Río Caspana	Antofagasta	22° 23' 41,4"	68° 07' 54,7"	3800
Machuca	Antofagasta	22° 36' 03,0"	68° 03' 58,9"	3979
Tocorpuri	Antofagasta	22° 29' 49,9"	68° 03' 30,6"	4215
Vado Putana	Antofagasta	22° 31' 55,3"	68° 02' 41,6"	4229
El Tatio	Antofagasta	22° 20' 22,8"	68° 01' 06,3"	4264
Tilomonte	Antofagasta	23° 47' 24,4"	68° 06' 34,2"	2365
Peine	Antofagasta	23° 40' 59,8"	68° 03' 31,5"	2440
Quebrada Jere	Antofagasta	23° 11' 08,2"	67° 59' 27,3"	2513
Camar	Antofagasta	23° 24' 23"	67° 57' 30,3"	2727
Socaire	Antofagasta	23° 34' 19,8"	67° 54' 41"	3134
Tumbre	Antofagasta	23° 19' 25,5"	67° 47' 40,7"	3761
Portillo	Valparaíso	32° 51' 44"	70° 10' 24"	2119
Farellones	Metropolitana	33° 21' 00"	70° 18' 59"	2331
Lagunillas	Metropolitana	33° 36' 32"	70° 17' 19"	2242
El Yeso	Metropolitana	33° 37' 13"	70° 00' 36"	2608
Baños Morales	Metropolitana	33° 49' 25"	70° 03' 10"	1913
El Teniente	O'Higgins	34° 04' 25"	70° 26' 35"	2098
Termas Del Flaco	O'Higgins	34° 57' 26"	70° 26' 52"	1701
Altos de Lircay	del Maule	35° 34' 47"	70° 59' 14"	1670
Baños Campanario	del Maule	35° 56' 10"	70° 36' 22"	1523
Cajón Ibañez	del Maule	36° 22' 30"	71° 09' 35"	1289
Termas de Chillán	Bío-Bío	36° 54' 22"	71° 17' 08"	2432
Laguna del Laja	BíoBío	37° 23' 00"	71° 22' 40"	1398
Ensenada	Los Lagos	41° 13' 33"	72° 35' 42"	58

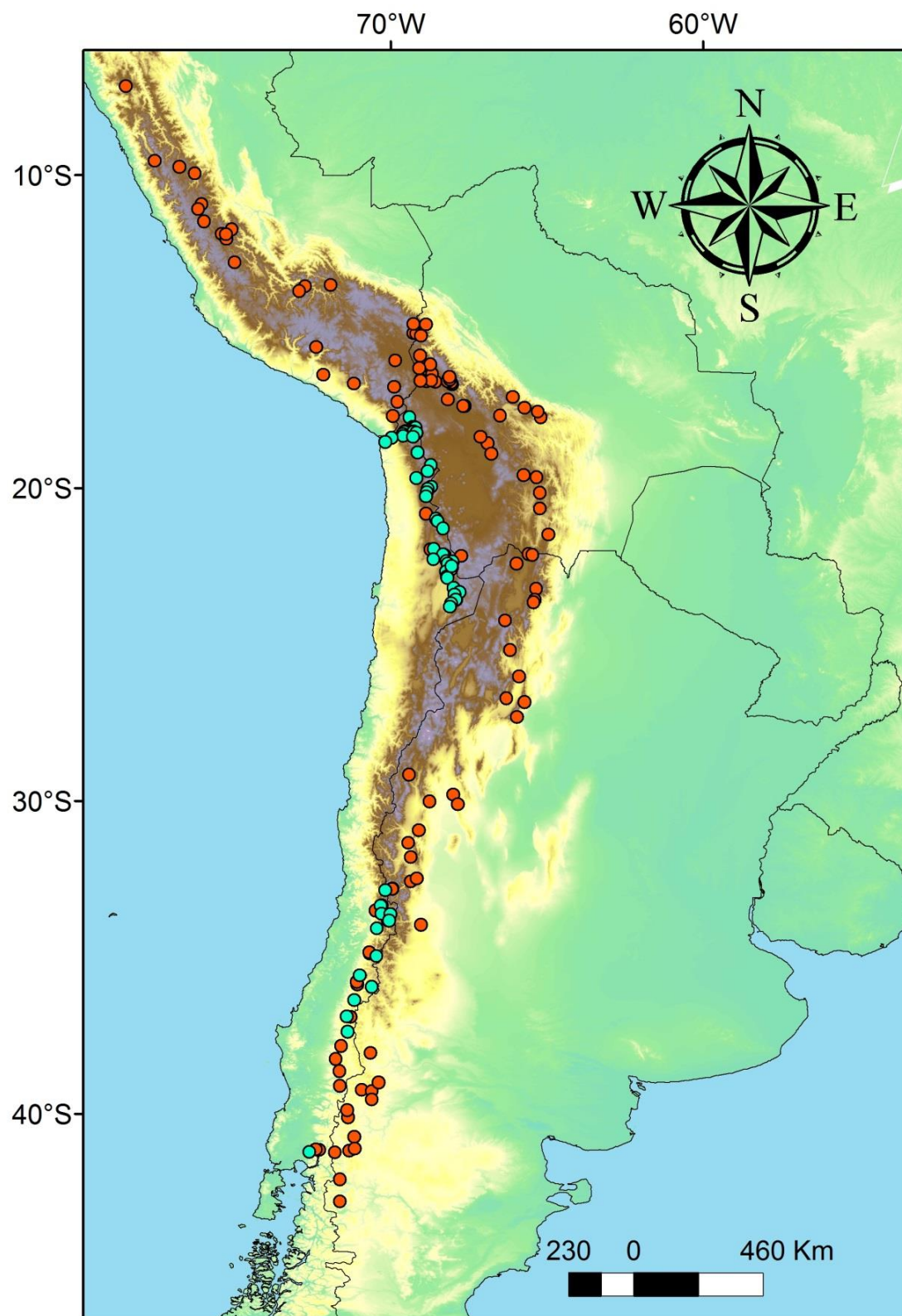


Figura 1. Localidades conocidas para *R.spinulosa*. ● Localidades con material disponible para realizar los análisis genéticos; ● localidades sin material genético pero que fueron incluidas para realizar los modelamientos de distribución.

2.- Objetivo específico 1: Reconstruir la genealogía de *R. spinulosa* utilizando marcadores mitocondriales (mtDNA) para las poblaciones distribuidas en Chile (filogenia intraespecífica).

Para el alineamiento obtenido se calculó el mejor modelo de sustitución nucleotídica a través del programa Jmodel test 0.1 (Posada 2008) utilizando el método BIC (Bayesian Information Criterion). El mejor modelo de sustitución nucleotídica se utilizó para realizar análisis filogenéticos en el programa MR.Bayes v3.2.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003) y análisis demográficos en el programa BEAST v1.7.5 (Drummond *et al.* 2012).

Con el objetivo de recuperar la genealogía de *R. spinulosa* se realizó un análisis filogenético a nivel intraespecífico utilizando el método de Inferencia Bayesiana (IB). Este método estadístico considera el conocimiento a priori y utiliza modelos de evolución molecular para realizar la inferencia filogenética (Henning 1968; Peña 2011). El resultado de este análisis es una estimación de la probabilidad de qué tan bien los árboles filogenéticos son explicados por los datos (la matriz de caracteres) (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Se empleó el algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para encontrar el mejor árbol según su probabilidad a posteriori (Peña 2011) utilizando los siguientes parámetros: número de generaciones = 5.000.000; fracción descartada (burning) = 0,25; frecuencia de muestreo = 1000; número de cadenas = 4. Este análisis se realizó utilizando secuencias de *R. rubropunctata* y *R. arunco* como grupos externos, las secuencias de estas especies se encuentran disponibles en el Laboratorio de Genética y Evolución, Universidad de Chile.

3.-Objetivo específico 2: Estimar la variación genética y la estructura genética espacial en las poblaciones de *R. spinulosa* distribuidas en Chile; y analizar el comportamiento demográfico de éstas.

3.1.- Análisis filogeográfico

La diversidad genética para cada localidad fue estimada utilizando los siguientes índices, el número de sitios polimórficos (S), el número de haplotipos (K), la diversidad haplotípica (H) y número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π) utilizando el programa DnaSP v.5.10 (Librado & Rozas 2009). Posteriormente este mismo programa fue utilizado para extraer los diferentes haplotipos (genotipos de ADN mitocondrial).

Una vez obtenidos los haplotipos se exploró la relación filogenética entre estos construyendo una red de haplotipos mediante el método de median-joining (Bandelt *et al.* 1999) en el programa Network v.4.6.1. (<http://www.fluxusengineering.com/sharenet.htm>). Este algoritmo permite trabajar con datos multiestados, es decir, un mismo locus puede ser A, C, G o T. En la red que se obtiene, cada círculo representa un haplotipo diferente cuyo tamaño corresponde a su frecuencia dentro de la muestra y la distancia que separa a cada par de haplotipos corresponde al número de diferencias o pasos mutacionales que hay entre ellos.

Las localidades fueron agrupadas en poblaciones homogéneas utilizando el paquete Geneland (Guillot *et al.* 2005, 2008) para la plataforma R (R Development Core Team 2008). Este paquete utiliza un algoritmo Bayesiano para agrupar las muestras de manera tal que cada grupo sea homogéneo, siendo el principal supuesto que los grupos putativos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg con equilibrio de ligamiento entre loci (Geneland development group 2012). Este análisis utiliza los datos genéticos en un contexto espacial para establecer el número de poblaciones más probable. Se realizaron cinco corridas independientes con el parámetro “modelo espacial” activado, el cual considera la posición geográfica para establecer los grupos más probables. Cada corrida del programa se ejecutó utilizando 500.000 iteraciones y un “burning” del 15%. Luego, se estableció si los grupos inferidos por Geneland eran estadísticamente significativos mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa Arlequin (Excoffier *et al.* 2005). Este análisis permitió descomponer la varianza molecular en tres partes: varianza total (F_{st}), entre grupos (F_{ct}) y dentro de grupos (F_{sc}). Basados en la evidencia entregada por estos análisis se definieron los grupos genéticos y posteriormente se calcularon los índices de diversidad genética para cada uno de ellos K , H y Π .

3.2.- Análisis demográfico

Para inferir si las poblaciones han presentado cambios demográficos en tiempos recientes se realizaron las pruebas de neutralidad de Tajima (1989) y Fu (1997) con el programa DnaSP, utilizando como unidades poblacionales los haplogrupos observados con el método de median-joining en el programa Network. La significancia estadística del F_s de Fu fue evaluada por una simulación de coalescencia con 1000 permutaciones. Luego se realizó un análisis de distribución mismatch, dado que el número de diferencias entre alelos depende del tiempo desde que éstos divergieron. Este análisis permite inferir los cambios demográficos recientes a

partir de la distribución de estas diferencias; cuando existe un exceso de variantes poco frecuentes esto sugiere que la población ha atravesado por una expansión poblacional reciente (Holsinger 2008). Los resultados obtenidos fueron complementados con un análisis bayesiano de Skyline Plot (Drummond *et al.* 2005; Ho & Shapiro 2011) utilizando el programa BEAST 1.7.5 (Drummond *et al.* 2012) y el programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2007) para graficar la curva demográfica. El análisis de Skyline Plot utiliza el principio de coalescencia para estimar los patrones históricos de tamaño poblacional a partir de genealogías sin la necesidad de señalar modelos demográficos para su ejecución. Este análisis se ejecutó con 10 millones de generaciones y utilizando el modelo de sustitución nucleotídica HKY I+G. Los resultados se analizaron en el Programa Tracer (Rambaut & Drummond 2007).

4.- Objetivo específico 3: Determinar áreas de distribución potencial para el anfibio *R. spinulosa* en el presente, durante el último máximo glacial y las áreas más estables en el tiempo mediante modelos de distribución potencial.

Con el fin de determinar las áreas de mayor estabilidad bioclimática y posibles áreas de refugio durante el UMG para *R. spinulosa*, se generaron distintos modelos de distribución tanto para el presente como para su distribución durante el Último Máximo Glacial. Estos modelos se generaron utilizando 159 coordenadas georeferenciadas de “presencia de *R. spinulosa*” (localidades donde habita la especie) y variables bioclimáticas obtenidas desde WorldClim (Hijmans *et al.* 2005). Los datos de presencia se obtuvieron a partir de la base de datos del Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Esta base de datos contiene información prospectada por académicos y estudiantes a partir del año 2003 asociada a diversos proyectos de investigación, y además incluye información proporcionada por distintos especialistas y herpetólogos. Estos datos fueron complementados con la revisión de 22 publicaciones que incluyeron informes de proyectos, catastros de fauna e información oficial del ministerio del medio ambiente, todas ellas disponibles de manera libre en internet. Para realizar esta revisión se puso especial énfasis en aquellas áreas donde existían las mayores brechas en el conocimiento de la distribución de *R. spinulosa*. Gracias a esta revisión se pudieron obtener seis datos de presencia adicional para la generación de los mapas predictivos, uno en la región Metropolitana, dos en la región del Maule y tres en la región de La Araucanía.

La información bioclimática utilizada para la generación de los modelos se encuentra disponible de manera gratuita en WORLDCLIM (<http://www.worldclim.org/>). Los modelos se generaron a partir de un subconjunto de las variables bioclimáticas disponibles, evitando incluir variables colineales o cercanas a la colinealidad. Estas se seleccionaron mediante un análisis de correlación entre todos los “rasters” bioclimáticos en el programa ENM tools (Warren *et al.* 2010). Cuando dos variables se encontraron fuertemente correlacionadas (coeficiente de correlación > 0,95) sólo una de ellas fue seleccionada para los análisis posteriores.

A continuación se detallan todas las variables disponibles en WorldClim para el presente y para el Último Máximo Glacial:

- Bio 1: Temperatura anual promedio
- Bio 2: Rango diurno promedio
- Bio 3: Isotermalidad
- Bio 4: Estacionalidad de la temperatura
- Bio 5: Temperatura máxima del mes más cálido
- Bio 6: Temperatura mínima del mes más frío
- Bio 7: Rango anual de temperatura
- Bio 8: Temperatura promedio del trimestre más húmedo
- Bio 9: Temperatura promedio del trimestre más seco
- Bio 10: Temperatura promedio del trimestre más cálido
- Bio 11: Temperatura promedio del trimestre más frío
- Bio 12: Precipitación anual
- Bio 13: Precipitación del mes más húmedo
- Bio 14: Precipitación del mes más seco
- Bio 15: Estacionalidad de la precipitación
- Bio 16: Precipitación del trimestre más húmedo
- Bio 17: Precipitación del trimestre más seco
- Bio 18: Precipitación del trimestre más cálido
- Bio 19: Precipitación del trimestre más frío

Los datos de presencia y las variables bioclimáticas permitieron generar distintos modelos de distribución utilizando tres programas diferentes: a) Maxent (Phillips *et al.* 2004, 2006; Elith *et al.* 2011), b) ModEco (Guo & Liu 2010), c) Open Modeller (Souza Muñoz *et al.* 2009). A

continuación se detalla la metodología empleada para cada programa y los algoritmos utilizados:

a) Maxent

En el programa Maxent se generó un modelo de distribución utilizando solamente datos de presencia. Este programa emplea el algoritmo de “Máxima Entropía” y genera puntos de pseudoausencias, en toda el área de estudio, extrayendo información de las variables ambientales (método “background”). Este método permite determinar las condiciones ambientales que limitarían la presencia de la especie y a partir de esos datos generar un modelo probabilístico de distribución. Se ajustaron los siguientes parámetros del algoritmo:

- Random test Percentage = 20%, este valor corresponde al porcentaje de “presencias” dejados fuera del modelo al azar, con el fin de validarlo. Estos puntos se utilizan para el cálculo del valor AUC, que corresponde al área bajo la curva ROC (receiver operating characteristic), y que en general se utiliza para evaluar el desempeño de los modelos.
- Maximum number of Background points = 10000, corresponde al número máximo de muestras que se extraerán desde el área de estudio, para las cuales no existen datos de presencia y que serán utilizados para la generación del modelo.

b) ModEco v3.02

En este programa se modeló la distribución de *R. spinulosa* mediante 9 algoritmos distintos (BIOCLIM, DOMAIN, Support Vector, Maximum Entropy, Maximum Likelihood, Rough Set, Clasifficaion Tree, Artificial Neural Network y Generalized Linear Model) utilizando cuatro tipos de datos de entrada (sólo presencias; presencias y pseudoausencias; presencias y “método background”; presencias y ausencias reales).

Cada algoritmo fue ejecutado con una o más clases de datos según su capacidad. Se generaron 17 modelos de distribución diferentes. A continuación se detallan las propiedades de cada algoritmo ejecutado, agrupados por el tipo de dato de entrada que se utilizó para generar el modelo.

- Modelos que utilizan sólo datos de presencias: “BIOCLIM”, “DOMAIN” y “OneClassSupport Vector machine”

- Modelos que utilizan datos de presencia y pseudoausencias: : “Two Class Support vector Machine”, “Maximum Likelihood”, “Rough Set”, “Clasiffication Tree”, “BP-Artificial Neural Network”, “Maximum Entropy” y “Generalized Linear Model”. Para correr estos modelos se utilizaron 10000 coordenadas de pseudoausencia colectados mediante el método “Multidimensional Envelope=10% expanded”.
- Modelos “basados en el ambiente” y datos de presencia (método “background”): “Support Vector Regression”, “Generalized Linear Model” y “Artifical Neural Network”. Estos modelos obtienen los puntos de pseudoausencia a partir de toda el área de estudio, utilizando el mismo método implementado en el programa Maxent. Una vez ejecutado el algoritmo, los resultados son entregados en probabilidades condicionales (Phillips & Dudík 2008). Se utilizaron 10000 puntos de pseudoausencia y se dejó el 20% de los datos de presencia fuera del modelo para la posterior validación de estos.
- Modelos utilizando datos de ausencia y presencia: “MaximumEntropy”, “Support Vector Regression”, “Generalized Linear Model” y “Artifical Neural Network”. Estos modelos se construyen utilizando el método “Background” pero con datos de ausencias reales en vez de pseudoausencias. Se obtuvieron 88 datos georeferenciados de ausencia de *R.spinulosa* en Chile a partir de prospecciones realizadas por el Laboratorio de Genética y Evolución de la Universidad de Chile, y otras prospecciones cuya información se encuentra libremente disponibles como: informes de catastros de fauna, líneas bases y monitoreo de fauna. El 20% de los datos de presencia quedaron fuera del modelo para su posterior validación.

c) Open Modeller:

El programa Open Modeller v.1.2 fue utilizado para generar un modelo con el algoritmo GARP (genetic algorithm for rule set prediction), el cual es uno de los algoritmos más utilizado para la generación de modelos predictivos. El algoritmo se ejecutó utilizando un tamaño muestral de comisión igual a 10000, 400 iteraciones, 2500 remuestreos y 20 ejecuciones del algoritmo.

4.1.-Evaluación de los modelos generados

Se obtuvieron mapas predictivos de tipo determinísticos o probabilísticos (continuos) los que se evaluaron utilizando distintos métodos. Los resultados determinísticos se obtuvieron a partir de los algoritmos que utilizaban sólo los datos de presencias y aquellos algoritmos que utilizaban datos de presencias y pseudo-ausencias, todos ellos ejecutados en el programa ModEco. La precisión de estos modelos fue evaluada a partir de la relación entre la proporción de verdaderos positivos (“True Positive Rate”, TPR) y el área total predicha. El primero de estos índices corresponde a la razón entre las presencias georeferenciadas, que se encontraron dentro del rango de distribución predicho (se utilizaron los mismos datos con los que se construyó el modelo), dividido por el total de presencias utilizadas para la generación del modelo. Según Engler, Guisan, & Rechsteiner (2004) un buen modelo predictivo generado a partir de datos de presencia debería predecir un área potencial lo más pequeña posible y a la vez cubrir el máximo de puntos de ocurrencia. Es decir el valor de TPR debiera maximizarse, mientras que el valor del área total predicha debiera ser el mínimo posible.

Los modelos probabilísticos se evaluaron mediante el valor de AUC. Este valor corresponde al área bajo la curva ROC (receiver operating characteristic) y si bien es el método estándar para evaluar la certeza de un modelo de distribución, este tiene que ser tomado con cautela ya que AUC es una medida del grado en que una especie se encuentra restringida a una parte del rango de variación de los predictores modelados, es decir qué tan bien las presencias pueden separarse de las ausencias, por ello un valor bajo de AUC podría deberse simplemente a la naturaleza generalista de una especie (Lobo *et al.* 2008).

4.2.-Integración de los modelos del presente y UMG

Los resultados de las proyecciones para ambos periodos (presente y UMG) fueron transformados a formato “raster” e ingresadas al programa ArcGis 10 (ESRI 2010). Para cada modelo se creó una composición RGB (rojo, verde y azul) utilizando el color rojo para el raster que proyecta la distribución en el presente y el color verde para la proyección de la distribución durante el Último Máximo Glacial. El color azul fue dejado fuera de la composición. En la composición obtenida los píxeles de color rojo indicarían la presencia de *R. spinulosa* sólo en el presente, el color verde la presencia sólo en el UMG y el color amarillo aquellos lugares donde

R.spinulosa se habría encontrado en ambos periodos, es decir zonas de estabilidad bioclimática para dicha especie.

En los modelos determinísticos la composición obtenida fue de tipo discreta y cada pixel tomó cuatro posibles valores: rojo que indica presencia sólo en el presente, verde que indica presencia sólo en el UMG, amarillo que indica presencia en ambos periodos y negro que indica ausencia de predicción en ambos periodos.

En los modelos probabilísticos se generaron mapas continuos (gradiente de color) donde la tonalidad del color se relaciona con la probabilidad de que *R.spinulosa* se haya encontrado en el presente, el UMG o en ambos periodos y la intensidad del color con la probabilidad de ocurrencia *R.spinulosa*, independiente del periodo de tiempo. Es decir cuando los colores se acercan al negro la presencia de *R. spinulosa* sería menos probable. La interpretación de los resultados en este tipo de mapas es más complejo, sin embargo entrega un panorama más realista de como las condiciones ambientales podrían haber afectado a las distintas poblaciones.

5.-Objetivo específico 4: Evaluar la representatividad de la diversidad genealógica dentro de las áreas protegidas (SNASPE) y determinar aquellas localidades que aportarían mayor diversidad genealógica complementaria a la actualmente resguardada.

El valor de conservación de las poblaciones de una especie se encontraría determinado por la distribución espacial y las relaciones evolutivas de las distintas variantes genéticas lo cual puede evaluarse en un área determinada (Faith *et al.* 2004). Este concepto sería análogo al de diversidad filogenética (Faith 1992), el cual se aplica para evaluar el valor filogenético de un grupo de especies que habitan en un área determinada, pero a nivel intraespecífico. La diversidad filogenética es un indicador del valor de conservación y utiliza las filogenias para predecir la diversidad subyacente. Este índice se puede calcular en un cladograma (o filograma) como la suma de la longitud de todas las ramas de la ruta de menor expansión que une los taxa a evaluar (Faith 1992). Para los fines de este proyecto a la diversidad filogenética intraespecífica la denominaremos “diversidad genealógica”. Valores más altos de diversidad filogenética se corresponderían con una mayor diversidad de la característica evaluada, en este caso diversidad genealógica (Faith 1992). Para los fines de este proyecto, todos los valores de

diversidad filogenética serán calculados a partir de la longitud de las ramas del árbol filogenético, por lo que los valores resultantes sólo serán comparables para una misma filogenia.

5.1.-Diversidad genealógica dentro de las áreas protegidas del SNASPE

Se evaluó la magnitud en que las áreas protegidas del SNASPE resguardan la diversidad genealógica de *R. spinulosa* en Chile. Para ello se calculó la Diversidad Filogenética utilizando el método propuesto por Faith (1992), mediante el paquete de R, Picante (Phylocom Integration, Community Analyses, Null-models, Traits and Evolution in R) (Kembel 2010) de aquellas poblaciones que se encontraron asociadas a estas áreas protegidas y se contrastó con la diversidad filogenética que no se encontraba protegida. Se realizaron cuatro análisis utilizando distintos criterios para determinar si las localidades correspondían a localidades protegidas por SNASPE o no protegidas.

El primer criterio para analizar las poblaciones protegidas fue el más estricto y consideró que los Parques Nacionales son las únicas áreas protegidas que poseen fines de conservación explícitos dentro del sistema de áreas protegidas. Bajo este criterio se georeferenciaron todas las localidades y se clasificaron como “protegidas” sólo si éstas se encontraban al interior de algún Parque Nacional. El segundo criterio fue menos estricto y consideró como localidades protegidas a todas aquellas que se encontraron dentro de un área protegida del Sistema Nacional de Áreas Protegidas, es decir Parque Nacional, Monumento Natural o Reserva Nacional.

Los otros dos criterios (tercer y cuarto) incluyeron dentro del grupo de localidades protegidas a aquellas localidades que se encontraban al interior o cercanas a las áreas protegidas. Para ello se creó un área “buffer” de 10 kilómetros alrededor de las áreas protegidas utilizando el programa ArcGis10 (ESRI 2010), luego aquellas poblaciones que se encontraban dentro de esta área buffer, fueron clasificadas como localidades protegidas. Para el tercer criterio se consideraron sólo los Parques Nacionales y su área “buffer”, mientras que para el cuarto criterio se consideraron todas las áreas protegidas del SNASPE y su área “buffer”.

5.2.- Diversidad filogenética complementaria

Finalmente se determinó qué poblaciones aportarían mayor diversidad filogenética complementaria a la actualmente protegida. Estas poblaciones serían prioritarias pues su protección maximizaría la diversidad filogenética resguardada de *R. spinulosa* minimizando el número de poblaciones a proteger. Para lograr este objetivo se realizó un análisis de la diversidad filogenética bajo el supuesto de que todas las poblaciones serían candidatas a protegerse.

En primer lugar se evaluó cuánto aumentaba la diversidad genealógica resguardada por las áreas protegidas al agregar una localidad “no protegida” a este sistema de protección. Este análisis se realizó para cada localidad y permitió crear un “ranking” de aporte de diversidad filogenética (diversidad filogenética complementaria). Aquella localidad que obtuvo el mayor valor de diversidad complementaria fue incluida en la lista de localidades protegidas, de manera de simular su protección. Bajo este nuevo escenario de protección se realizó un nuevo análisis de diversidad filogenética, con lo cual se pudo determinar qué localidad aportaría mayor diversidad filogenética en este contexto. Esta metodología se repitió hasta que la diversidad protegida no presentó un incremento significativo al incluir una nueva población. Todos los cálculos de diversidad filogenética complementaria se realizaron para los cuatro criterios (ver sección 3.1) en el programa Picante.

Resultados

1- Extracción de ADN, secuenciación y alineamiento

A partir de las 454 secuencias se logró obtener un alineamiento de 889 sitios que fue utilizado en los análisis filogenéticos a nivel intraespecífico, filogeográficos y demográficos

2.- Objetivo específico 1: Reconstruir la genealogía de *R. spinulosa* utilizando marcadores mitocondriales (mtDNA) para las poblaciones distribuidas en Chile (filogenia intraespecífica).

En Mr. Bayes, el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó al obtenido por BIC fue HKY+I+G (nst=2; rates=invgamma). La filogenia intraespecífica de *R. spinulosa* permitió distinguir cuatro linajes mayores, el primero correspondería a las poblaciones que se encuentran entre Umaqui (69°23'O; 17°44'S) y el Salar de Alconcha (68°29'O; 21°35'S). El segundo grupo incluiría a todas las poblaciones entre Carcote (68°19'O; 21°16'S) y Tilomonte (68°06'O; 23°47'S). El tercer grupo incluye a todas las poblaciones entre Portillo (70°10'O; 32°52'S) y El Flaco (70°27'O; 34°57'S), y el cuarto grupo a las poblaciones conocidas al sur de Lircay (70°59'O; 35°34'S) (Figura 2).

Dentro del segundo linaje se puede distinguir un grupo de individuos de ciertas localidades que se agrupan dentro de este linaje, en una posición filogenética incierta con respecto al resto de los individuos. Este grupo de individuos se divide en dos subclados (probabilidad a posteriori=1), el mayor de estos subclados incluye a todos los individuos de Tilomonte, la mayoría de los individuos de Peine y dos individuos de Socaire, mientras que el menor de estos subclados está conformado por algunos individuos de Quebrada de Jere (Figura 3).

En el linaje de Chile central, las localidades de Farellones, Lagunillas, El Yeso, El Morado y El Teniente forman un grupo monofilético separado de las poblaciones de Portillo y El Flaco. Estas dos poblaciones corresponderían a linajes independientes sin embargo los valores de sustento no permiten establecer la relación filogenética entre estos dos clados y el clado principal (Figura 4). El linaje que agrupa a las poblaciones más australes de *Rhinella spinulosa* se separa en dos clados, sin embargo esta separación tiene un valor de sustento bajo (probabilidad posteriori <0,95).

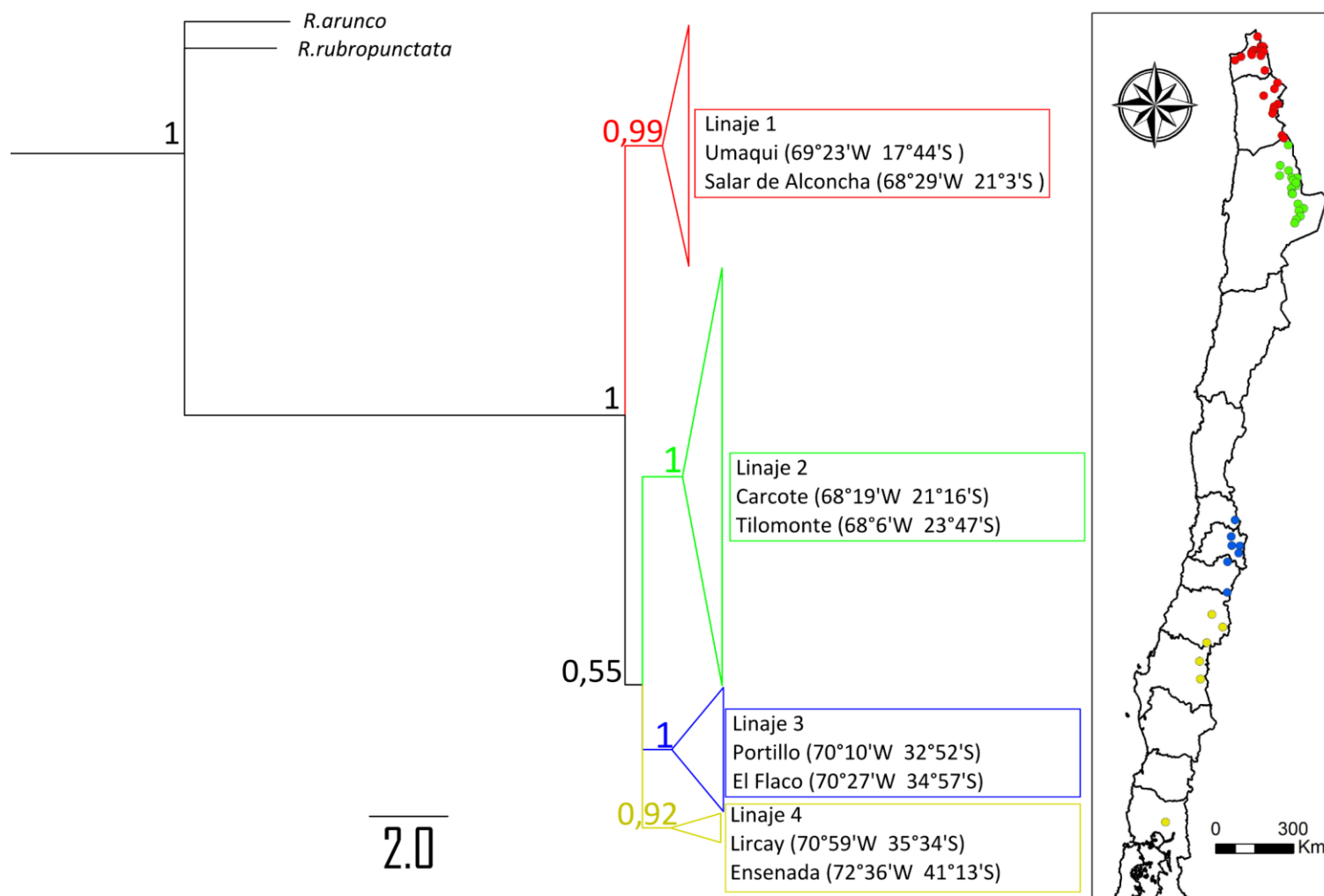


Figura 2. Distribución geográfica de los linajes encontrados mediante el análisis filogenético bayesiano de *R. spinulosa*. El árbol principal se encuentra enraizado a dos especies externas, *Rhinella arunco* y *R. rubropunctata*. El árbol filogenético muestra colapsado los nodos que corresponden a los linajes principales. Los rótulos de los nodos indican la probabilidad posterior del análisis filogenético bayesiano. En el mapa se muestra la distribución espacial de los linajes para Chile.

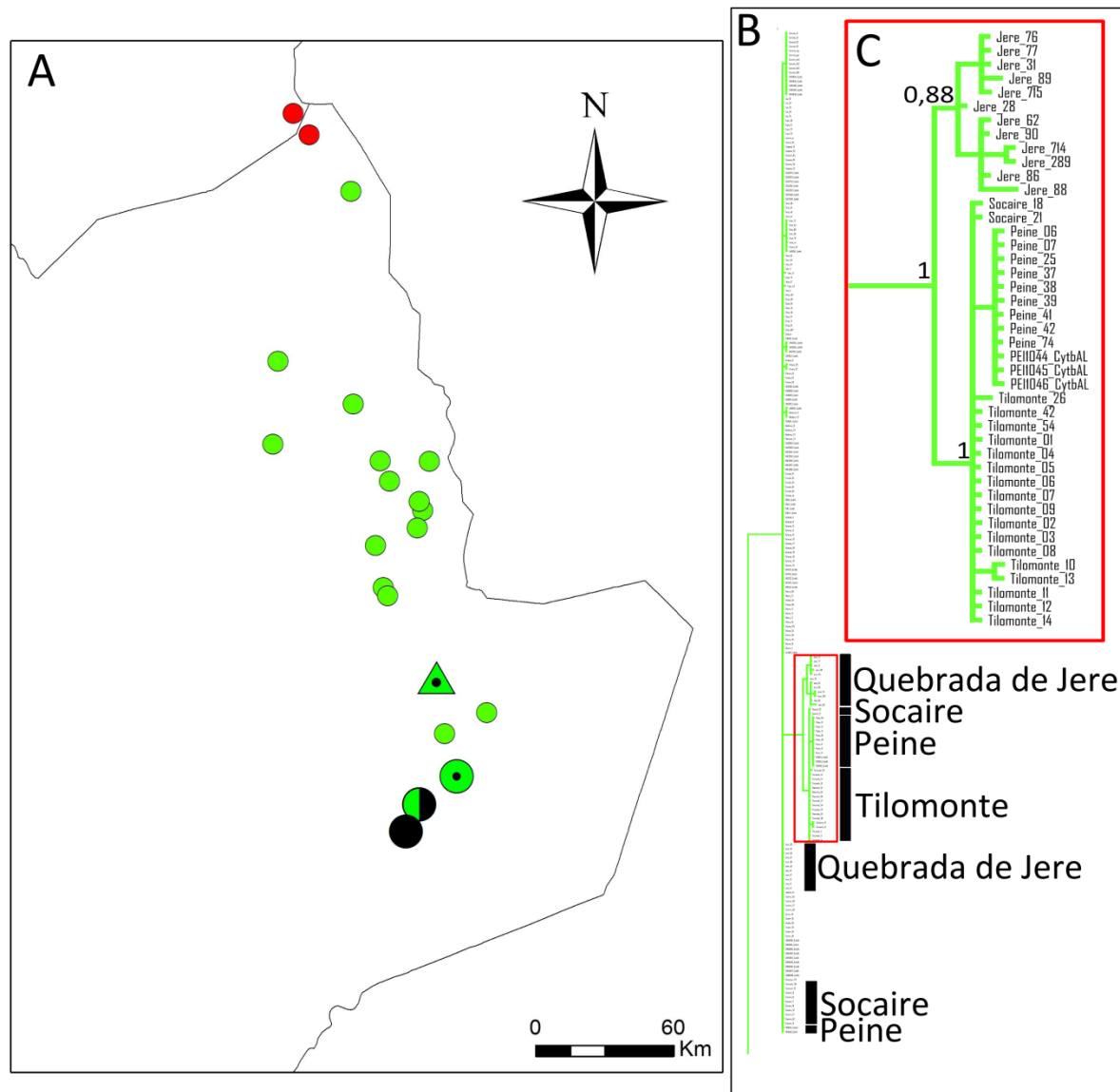


Figura 3. Distribución geográfica de las localidades pertenecientes al linaje 2. A) Mapa de localidades pertenecientes al linaje 2 (B): ● Localidades pertenecientes al linaje principal. El resto de los símbolos muestran aquellas localidades que presentan individuos pertenecientes a la agrupación de individuos destacada en el cuadro rojo (C): ▲ Quebrada de Jere; ● Socaire; ● Peine; ● Tilomonte. Los rótulos en los nodos del cuadro C indican la probabilidad *a posteriori* de esa agrupación y de los dos subclados calculados mediante análisis filogenético bayesiano.

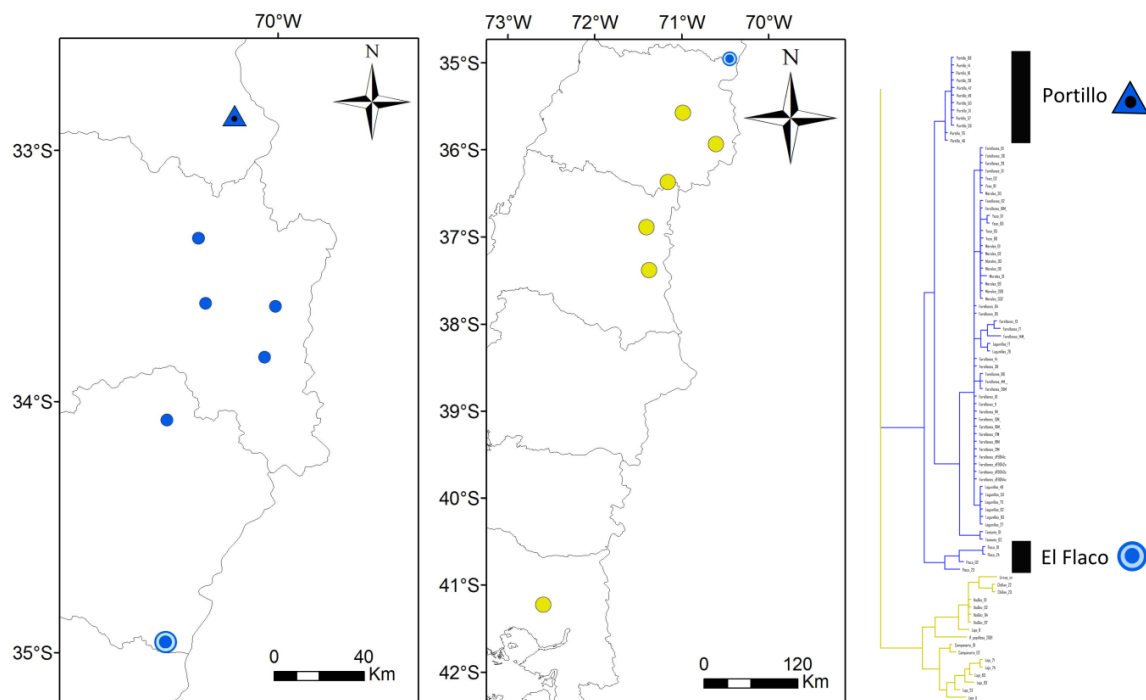


Figura 4. Distribución geográfica de las localidades pertenecientes al linaje 3 y 4. ● Localidades pertenecientes al clado principal del linaje 3; ▲ Portillo; ● El Flaco. ● Localidades pertenecientes al linaje 4.

3.-Objetivo específico 2: Estimar la variación genética y la estructura genética espacial en las poblaciones de *R. spinulosa* distribuidas en Chile; y analizar el comportamiento demográfico de éstas.

3.1.- Análisis filogeográfico

De los 889 sitios alineados, 111 sitios correspondieron a sitios polimórficos (S). El número de haplotipos (K) para este set de datos fue de 75, la diversidad haplotípica fue de 0,9353 y el número de diferencias entre pares de secuencias (Π) igual a 22,1852. En la tabla 2 se señala el número de secuencias utilizadas y el número de haplotipos diferentes encontrados para cada localidad.

Tabla 2. Índices de variación genética intrapoblacional por localidad, número de haplotipos, diversidad haplotípica (H) y promedio de diferencias por par de secuencias (π); d.e=desviación estándar.

Localidad	N de secuencias	N de haplotipos	H \pm d.e	$\Pi \pm$ d.e	Haplotipos
Umaqui	3	2	0.002331 \pm 0.002198	2.000000 \pm 1.511858	1,2
Vioco	4	2	0.000583 \pm 0.000722	0.500000 \pm 0.519115	1,3
Colpa	1	1	0.000000 \pm 0.000000	0.000000 \pm 0.000000	4
Caquena	4	4	0.004079 \pm 0.003119	3.500000 \pm 2.241144	1,5,6,7
Pacollo	6	3	0.004351 \pm 0.002946	3.733333 \pm 2.188861	1,8,9
Lauca	2	1	0.000000 \pm 0.000000	0.000000 \pm 0.000000	1
Putre	8	5	0.002414 \pm 0.001715	2.071429 \pm 1.291617	9,10,11,12,13
Parinacota	14	5	0.004439 \pm 0.002667	3.813187 \pm 2.040828	1,9,14,15,16
Chungará	5	4	0.004662 \pm 0.003269	4.000000 \pm 2.399187	1,9,17,18
Socoroma	5	4	0.003730 \pm 0.002697	3.200000 \pm 1.979406	9,12,13,19
Zapahuira	9	5	0.003043 \pm 0.002034	2.611111 \pm 1.538136	8,11,12,13,19
Chivatambo	4	2	0.001166 \pm 0.001155	1.000000 \pm 0.829646	1,17
Lluta	4	2	0.001554 \pm 0.001426	1.333333 \pm 1.024941	9,12
Azapa	3	2	0.002331 \pm 0.002198	2.000000 \pm 1.511858	12,20
Surire	7	3	0.001220 \pm 0.001047	1.047619 \pm 0.784818	1,21,22
Isluga	3	1	0.000776 \pm 0.000968	0.666667 \pm 0.666667	1
Quebe	16	5	0.001106 \pm 0.000893	0.950000 \pm 0.684993	1,22,23,24,25
Chusmisa	8	2	0.000291 \pm 0.000413	0.250000 \pm 0.311294	20,21
Cancosa	6	3	0.001010 \pm 0.000943	0.866667 \pm 0.700793	1,4,22
Piga	1	1	0.000000 \pm 0.000000	0.000000 \pm 0.000000	22
Collacagua	5	2	0.000699 \pm 0.000766	0.600000 \pm 0.562226	1,22
Huasco	11	2	0.000381 \pm 0.000466	0.000381 \pm 0.000466	1,22
Michincha	2	2	0.002331 \pm 0.002855	2.000000 \pm 1.732051	1,26

Tabla 2 (continuación). Índices de variación genética intrapoblacional por localidad, número de haplotipos, diversidad haplotípica (H) y promedio de diferencias por par de secuencias (π); d.e=desviación estándar.

Localidad	N de secuencias	N de haplotipos	H \pm d.e	π \pm d.e	Haplotipos
Alconcha	2	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	22
Carcote	15	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	27
Loa	5	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	28
Cupo	4	2	0.001160 +/- 0.001149	1.000000 +/- 0.829646	28,29
Lasana	2	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	28
Caspana	13	2	0.000446 +/- 0.000504	0.384615 +/- 0.386303	28,29
Tatio	19	5	0.002225 +/- 0.001479	1.918129 +/- 1.141059	28,29,30,31,32
Chita	15	2	0.000795 +/- 0.000717	0.685714 +/- 0.551335	28,33
Putana	15	6	0.001812 +/- 0.001283	1.561905 +/- 0.986054	28,29,30,34,35,36
Machuca	15	4	0.001061 +/- 0.000871	0.914286 +/- 0.669358	28,29,35,36
Grande	10	3	0.000825 +/- 0.000761	0.711111 +/- 0.580366	28,29,35
Katarpe	17	3	0.001041 +/- 0.000852	0.897059 +/- 0.656349	28,29,35
Vilama	15	3	0.001016 +/- 0.000846	0.876190 +/- 0.650034	28,29,35
Quebrada de Jere	23	6	0.009682 +/- 0.005189	8.355731 +/- 4.015668	29,37,38,39,40,41,42
Tumbre	5	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	29
Camar	15	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	29
Tocorpuri	3	3	0.001547 +/- 0.001589	1.333333 +/- 1.098339	28,29,35
Socaire	10	2	0.006000 +/- 0.003588	5.177778 +/- 2.738188	29,43
Peine	16	2	0.004326 +/- 0.002580	3.733333 +/- 1.988173	29,44
Tilomonte	17	2	0.000392 +/- 0.000458	0.338235 +/- 0.352607	43,45
Portillo	12	2	0.000352 +/- 0.000441	0.303030 +/- 0.336985	47,48
Farrellones	28	6	0.001492 +/- 0.001074	1.283069 +/- 0.829913	49,50,51,52,53,54,55
Lagunillas	8	2	0.001495 +/- 0.001188	1.285714 +/- 0.896539	56,57
Yeso	6	3	0.001860 +/- 0.001471	1.600000 +/- 1.095445	49,50,58
Morales	9	3	0.000775 +/- 0.000740	0.666667 +/- 0.561202	49,50,59
Teniente	2	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	60
Flaco	4	3	0.007964 +/- 0.005672	6.833333 +/- 4.075540	61,62,63
Lircay	1	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	64
Campanario	2	2	0.001166 +/- 0.001648	1.000000 +/- 1.000000	65,66
Ibañez	4	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	67
Chillan	2	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	68
Laja	7	6	0.010066 +/- 0.006068	8.666667 +/- 4.561213	69,70,71,72,73,74
Ensenada	1	1	0.000000 +/- 0.000000	0.000000 +/- 0.000000	75

La red de haplotipos que resultó del análisis de median-joining soportó la evidencia encontrada por el análisis filogenético. Se encontraron cuatro haplogrupos principales, altamente diferenciados entre sí, separados por al menos de 27 pasos mutacionales (Figura 5). El primer grupo, que incluyó a las localidades entre Umaqui y el salar de Alconcha, presentó una alta diversidad de haplotipos (26) y dos haplotipos muy frecuentes, los haplotipos 1 y 22. El segundo haplogrupo, que incluyó las localidades entre Carcote y Tilomonte, presentó una estructuración interna que separó a las localidades de Peine, Tilomonte y algunos individuos provenientes de la Quebrada de Jere del resto de las poblaciones. Los haplotipos más frecuentes fueron el 29 y

28. El tercer grupo que incluyó a las localidades de la zona central (entre Portillo y El Teniente) presentó pocos haplotipos de alta frecuencia y una gran cantidad de haplotipos inferidos por el programa Network, lo que sugiere que habría una alta variación genética que no ha sido detectada aún. El cuarto grupo incluyó a todas las localidades desde Lircay hasta Ensenada. Todos los haplotipos de este grupo se encontraron en baja frecuencia. La estructura encontrada dentro de este haplogrupo podría ser explicada por variación genética que no ha sido detectada debido a la baja cantidad de muestras (n=17).

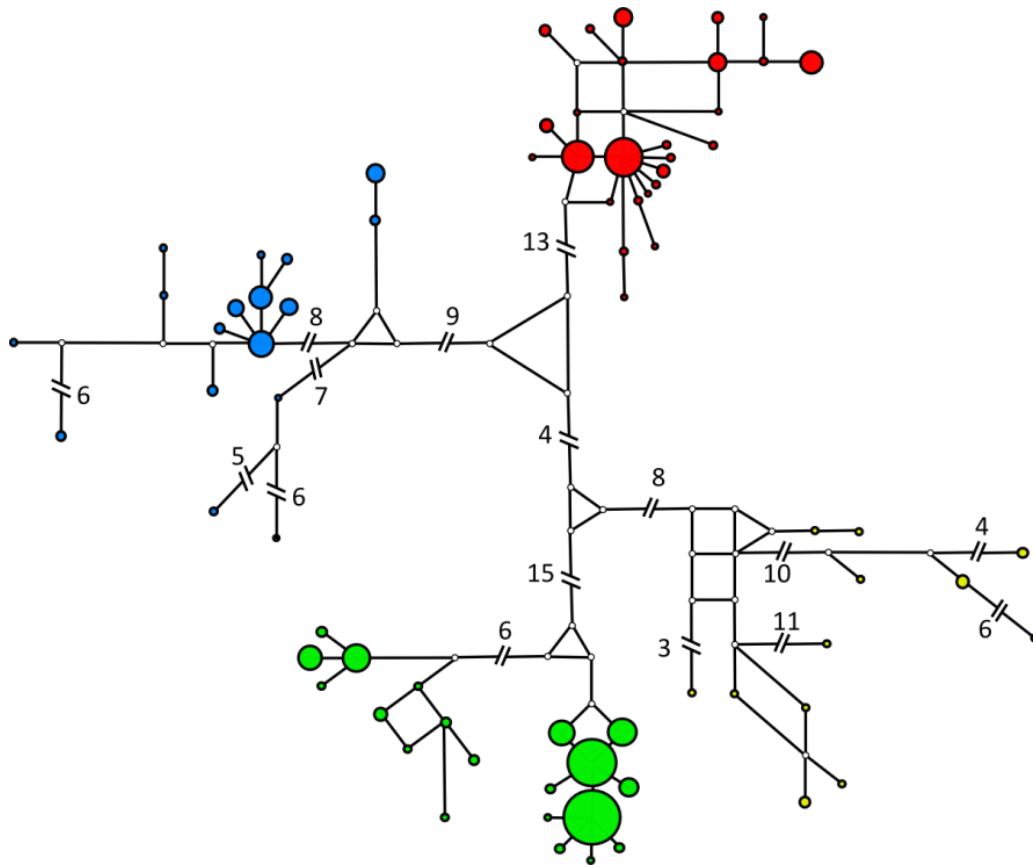


Figura 5. Red de haplotipos para el gen mitocondrial D-loop obtenida mediante el método Median joining. Los colores muestran los diferentes haplogrupos encontrados: ● localidades entre Umaqui y el salar de Alconcha; ● Localidades entre Carcote y Tilomonte; ● localidades entre Portillo y El Flaco; ● localidades entre Lircay y Ensenada.

El resultado del análisis Geneland mostró la presencia de 6 poblaciones que concordaron plenamente con lo observado en la red de haplotipos y el análisis filogenético, es decir, un grupo que incluye las poblaciones desde el norte de Chile hasta el Salar de Alconcha, un segundo grupo que incluye a todas las localidades de la Región de Antofagasta con excepción

de Peine y Tilomonte, que pertenecerían a un tercer grupo; el cuarto grupo que incluiría a las poblaciones de la zona central de Chile hasta El Teniente, excluyendo a Portillo y El Flaco que pertenecerían al grupo 5 y finalmente, el sexto grupo agruparía a todas las poblaciones desde Lircay al sur.

La única población para la cual el Geneland mostró resultados contrapuestos fue Quebrada de Jere (67°58'O; 23°10'S). De las cinco corridas, esta localidad fue agrupada en el grupo 2 en dos ocasiones; mientras que en las otras tres corridas fue asignada al grupo de Peine y Tilomonte (Grupo 3). El valor promedio de la densidad de probabilidad fue mayor en aquellas corridas donde Jere fue clasificada en el grupo 2, sin embargo este resultado debe ser tomado con cautela por la presencia de haplotipos compartidos entre esta población, Peine y Tilomonte. Para resolver este conflicto se analizaron ambas agrupaciones mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA). Cuando la población de Jere se incluyó dentro del grupo 2 la varianza entre grupos fue levemente mayor (porcentaje de variación = 88,45%) a cuando se incluyó en el grupo de Peine y Tilomonte (porcentaje de variación = 87,93%); y la varianza dentro de grupos (entre poblaciones) disminuyó. Este resultado apuntaría en la misma dirección que lo encontrado por Geneland y la población de Jere se encontraría más relacionada con el grupo 2 que con Peine y Tilomonte (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Análisis Molecular de Varianza. Análisis de los componentes de la varianza molecular entre poblaciones y dentro de poblaciones. En este análisis se consideró a la localidad de Quebrada de Jere dentro del grupo que forman todas las localidades entre Carcote y Socaire. Índices de fijación: FSC=Entre poblaciones dentro de grupos; FST=Entre poblaciones; FCT=Entre grupos.

Fuente de Variación	G.L.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de Variación
Entre grupos	5	4931,977	15,43523	88,45
Entre poblaciones, dentro de grupos	50	460,157	1,08272	6,20
Dentro de poblaciones	398	371,397	0,93316	5,35
Total	453	5763,531	17.45110	

Índices de Fijación	
FSC	0,5371
FST	0,94653
FCT	0,88448

Tabla 4. Análisis Molecular de Varianza. Análisis de los componentes de la varianza molecular entre poblaciones y dentro de poblaciones. En este análisis se consideró a la localidad de Quebrada de Jere formando un grupo junto a Tilomonte y Peine. Índices de fijación: FSC=Entre poblaciones dentro de grupos; FST=Entre poblaciones; FCT=Entre grupos.

Fuente de Variación	G.L.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de Variación
Entre grupos	5	4931,087	14,72926	87,93
Entre poblaciones, dentro de grupos	50	461,047	1,08962	6,50
Dentro de poblaciones	398	371,397	0,93316	5,57
Total	453	5763,531	16,75204	

Índices de Fijación	
FSC	0,53867
FST	0,94430
FCT	0,87925

Para los siguientes análisis se establecieron como grupos genéticos las 6 poblaciones inferidas por Geneland (Figura 6). La población de Quebrada Jere se agrupó junto a todas las poblaciones de la región de Antofagasta con excepción de Peine y Tilomonte. De esta forma los grupos quedaron conformados de la siguiente manera:

Grupo 1: Todas las localidades que conforman el clado norte, entre Umaqui y el Salar de Alconcha

Grupo 2: Todas las localidades entre el Salar de Carcote y Socaire

Grupo 3: Localidades de Peine y Tilomonte

Grupo 4: Localidades entre Farellones y El Teniente

Grupo 5: Portillo y El Flaco

Grupo 6: Todas las poblaciones de Lircay hacia el sur

De los seis grupos conformados la mayor diversidad de haplotipos se encontró en el grupo más austral (grupo 6) a pesar de haber menos individuos muestreados (Tabla 5).

Tabla 5. Índices de variación genética por agrupaciones Geneland, número de haplotipos, diversidad haplotípica (H) y promedio de diferencias por par de secuencias (π); d.e=desviación estándar. Grupo 1: Todas las localidades que conforman el clado norte, entre Umaqui y el Salar de Alconcha; Grupo 2: Todas las localidades entre el Salar de Carcote y Socaire; Grupo 3: Localidades de Peine y Tilomonte; Grupo 4: Localidades entre Farellones y El Teniente; Grupo 5: Portillo y El Flaco; Grupo 6: Todas las poblaciones de Lircay hacia el sur.

Población	N de secuencias	N de haplotipos	H \pm d.e	π \pm d.e
Grupo 1	132	27	0,003677 \pm 0,002121	3,158455 \pm 1,645824
Grupo 2	203	24	0,004257 \pm 0,002393	3,677803 \pm 1,868284
Grupo 3	33	5	0,002831 \pm 0,001749	2,443182 \pm 1,357311
Grupo 4	53	12	0,002589 \pm 0,001609	2,226415 \pm 1,247506
Grupo 5	16	5	0,007607 \pm 0,004251	6,541667 \pm 3,264161
Grupo 6	17	12	0,015560 \pm 0,00824	13,397059 \pm 6,339438

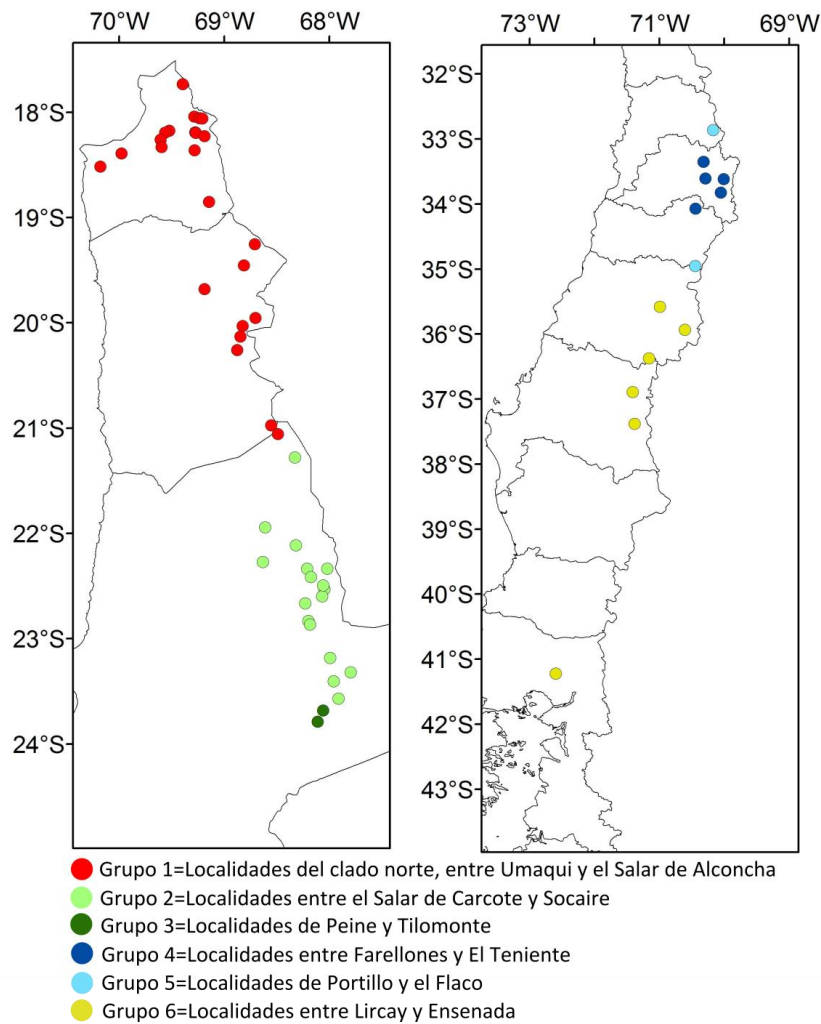


Figura 6. Agrupación espacial Bayesiana generada mediante el programa Geneland.

3.2.-Análisis demográfico de poblaciones

Sólo se evidenciaron posibles cambios demográficos para el clado norte de *R. spinulosa* (grupo 1). Este grupo obtuvo un valor negativo y estadísticamente significativo en la prueba F_s de F_u (F_s de $F_u = -10,832$; $p = 0,006$; Tabla 6). Este resultado permite inferir que habría existido una expansión poblacional reciente de este grupo. En el resto de los grupos no existió evidencia de expansiones poblacionales o cuellos de botella (las Prueba D de Tajima y F_s de F_u no fueron estadísticamente significativas) Este resultado indicaría que los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 podrían encontrarse en equilibrio entre deriva génica y mutación. El mismo resultado se evidencia al analizar la distribución mismatch, el grupo 1 fue el único que se ajustó a un modelo de expansión poblacional, mientras que para el resto de los grupos la curva mismatch sugiere que las poblaciones se han mantenido estables (Figura 7).

Tabla 6. Resultados de las pruebas D de Tajima y F_s de F_u para las seis poblaciones de *R. spinulosa* inferidas mediante Geneland. Π : Diversidad nucleotídica, Θ /sitio: Θ por sitio

Población	Π	Θ /sitio	D de Tajima (p)	F_s de F_u (p)
Grupo 1	0,00350	0,0049	-0,8163 ($p > 0,1$)	-10,832 ($p = 0,006$)
Grupo 2	0,00295	0,00495	-1,11638 ($p > 0,1$)	-2,854 ($p = 0,2050$)
Grupo 3	0,00256	0,00458	-1,46601 ($p > 0,1$)	1,809 ($p = 0,8246$)
Grupo 4	0,00257	0,00436	-1,27178 ($p > 0,1$)	-3,022 ($p = 0,099$)
Grupo 5	0,00669	0,00667	0,01100 ($p > 0,1$)	3,755 ($p = 0,941$)
Grupo 6	0,01417	0,01277	0,45273 ($p > 0,1$)	-0,470 ($p = 0,550$)

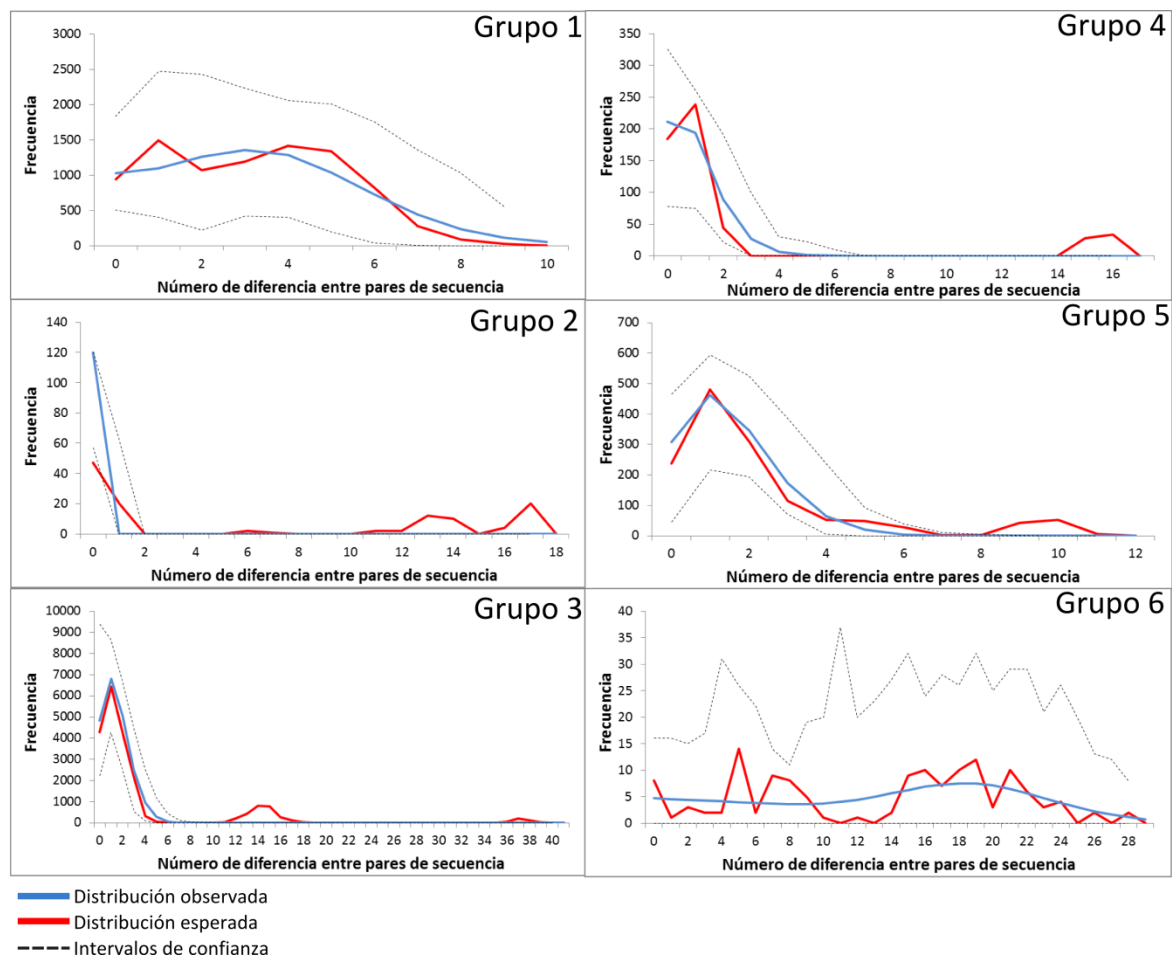


Figura 7. Distribución mismatch entre pares de secuencias bajo un modelo de expansión. Grupo 1: localidades entre Umaqui y el salar de Alconcha; grupo 2: localidades entre salar de Carcote y Socaire; grupo 3: Peine y Tilomonte; grupo 4: localidades entre Farellones y El Teniente; grupo 5: Portillo y el Flaco; grupo 6: localidades entre Lircay y Ensenada.

El análisis de Skyline Plot con 10 millones generaciones fue suficiente para que los grupos 3, 4, 5 y 6 alcanzaran un tamaño efectivo de la muestra suficiente para obtener un resultado consistente, sin embargo para el grupos 1 y 2 se debió realizar un nuevo análisis con 50 millones de generaciones. A pesar de esto el grupo 2 no alcanzó un tamaño efectivo adecuado. Entre las 6 poblaciones, solamente el grupo 1 mostró indicio de cambio demográfico, la curva obtenida muestra un crecimiento lineal. Este resultado sustenta lo evidenciado con las pruebas Fs de Fu en el sentido que el clado norte de *R. spinulosa* habría experimentado una expansión demográfica reciente (Figura 8).

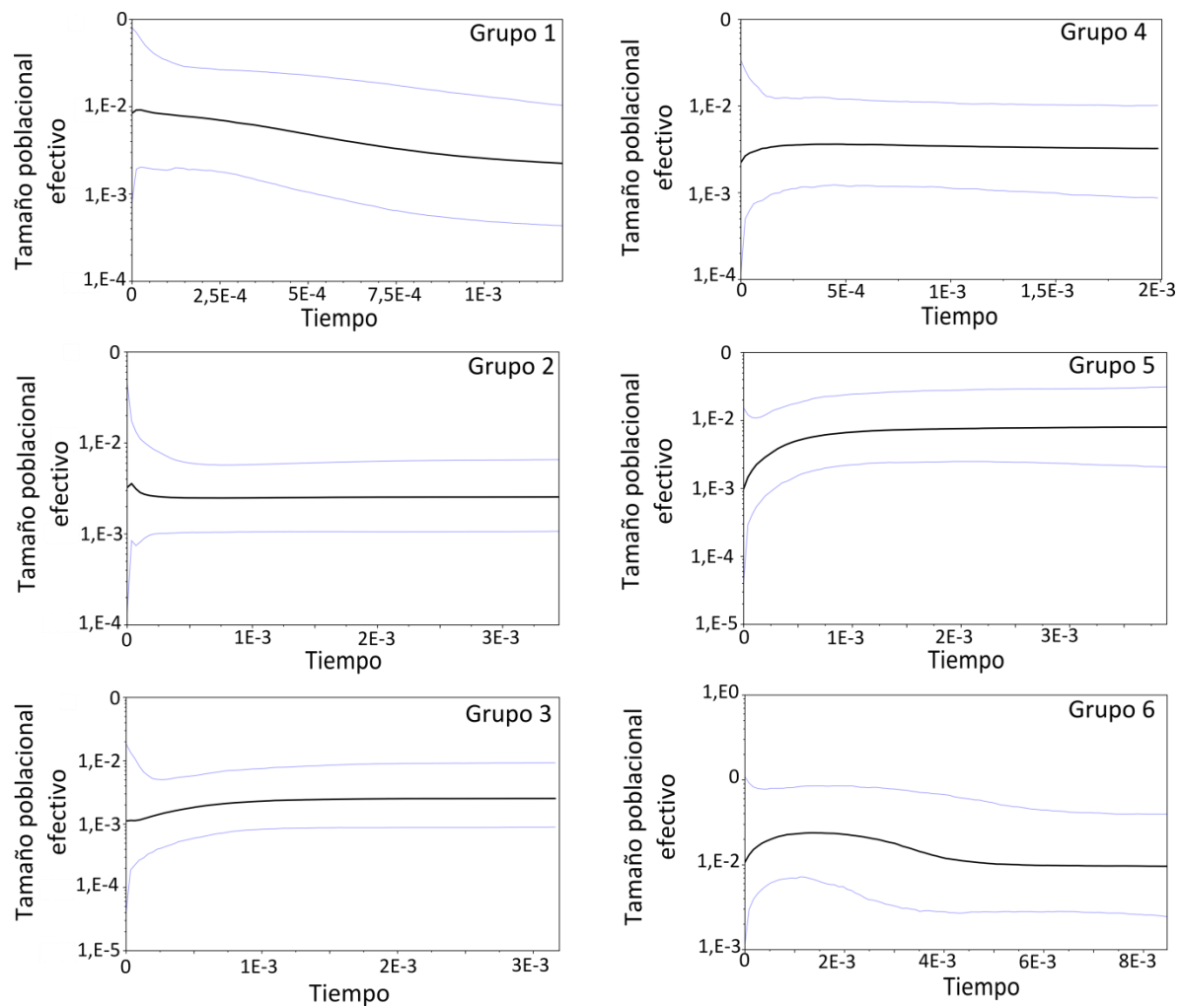


Figura 8. Skyline plot bayesiano, muestra la historia demográfica de las distintas agrupaciones que entrego geneland. Grupo 1: localidades entre Umaqui y el salar de Alconcha; grupo 2: localidades entre salar de Carcote y Socaire; grupo 3: Peine y Tilomonte; grupo 4: localidades entre Farellones y El Teniente; grupo 5: Portillo y el Flaco; grupo 6: localidades entre Lircay y Ensenada. La línea negra es la media estimada y el área entre las dos líneas azules señala el límite del 95% de la mayor densidad posterior.

4.- Objetivo específico 3: Determinar áreas de distribución potencial para el anfibio *R. spinulosa* en el presente, durante el último máximo glacial y las áreas más estables en el tiempo mediante modelos de distribución potencial.

De las 19 variables disponibles en WorldClim finalmente se trabajó con 8: Bioclim1, Bioclim2, Bioclim4, Bioclim6, Bioclim12, Bioclim14, Bioclim15, Bioclim18 y Bioclim19 y adicionalmente se incluyó la altitud. En el anexo 1 se pueden observar los valores de correlación entre todas las variables disponibles y en el anexo 2 se describe en detalle las variables utilizadas.

4.1.-Modelos discretos

Los modelos discretos se evaluaron utilizando el criterio de Engler et al. (2004). Los tres modelos contruidos con datos sólo de presencia tuvieron un bajo poder predictivo ($TPR < 0.9$). Sin embargo el algoritmo “Domain” fue considerado para los análisis posteriores ya que tuvo un desempeño mucho mejor que los modelos “BioClim” y “One Class Support Vector Machine” (Tabla 7). De los modelos contruidos utilizando datos de presencia y pseudoausencias sólo tuvieron un buen desempeño los algoritmos “Two Class Support Vector Machine”, “Maximum Entropy” y “Generalized Linear Model”, descartándose los algoritmos “Rough Set”, “Artificial Neural Network (ANN) – Back Propagation Algorithm”, “Maximum likelihood” y “Classification Tree” debido a que la relación entre el valor TPR y el área predicha fue deficiente (Tabla 7).

El mapa resultante a partir del algoritmo “Domain” contrastó con los modelos contruidos a partir de datos de presencia y pseudoausencia; la distribución predicha para el presente y el UMG fue mucho más restringida que la proyectada por los otros modelos, esta restricción fue más fuerte para el UMG donde sólo se predijo la presencia de *R. spinulosa* en pequeños fragmentos de la Cordillera de los Andes peruana y al altiplano boliviano durante este periodo. Biologicamente este es un resultado poco realista, pues es difícil que *R. spinulosa* se hubiese refugiado solamente en estas regiones durante el Último Máximo Glacial y en menos de 20000 años alcanzar la amplia distribución que tiene en el presente (Figura 9).

Los tres modelos restantes (Two-Class Support Vector Machine, Maximum Entropy y Generalize Linear Model) coincidieron en gran parte de la distribución proyectada y se ajustaron a la distribución conocida de *R. spinulosa*. La única deficiencia de estos modelos fue que en

algunas zonas geográficas la distribución modelada abarcó un área mucho más amplia a la conocida, alcanzando la costa chilena en algunas regiones y proyectando la distribución de *R. spinulosa* al sur de los 47°S en Argentina.

Entre los 36° y 47°S en la Patagonia Argentina los tres modelos proyectaron la distribución de *R. spinulosa* en áreas donde no teníamos datos de distribución georeferenciados, sin embargo este resultado coincidiría con la distribución propuesta por Cei (1980). Los tres modelos muestran que la distribución en esta área podría haber abarcado un área mayor durante el UMG.

Tabla 7. Evaluación de los modelos de distribución discretos.

Algoritmo	Datos de entrada	% de área predicha del área total	Tasa de verdaderos positivos (TPR).
BioClim	Sólo presencias	1,497	0,6981
Domain	Sólo presencias	0,395	0,862
One Class Support Vector Machine	Sólo presencias	2,551	0,792
Two Class Support Vector Machine	Presencias - pseudo ausencias	3,714	0,956
Maximum Likelihood Classification	Presencias- pseudo ausencias	9,461	0,994
Rough Set	Presencias- pseudo ausencias	1,394	0,862
Classification Tree	Presencias- pseudo ausencias	5,495	0,987
Artificial Neural Network (ANN) – Back Propagation Algorithm	Presencias- pseudo ausencias	3,08	0,893
Maximum Entropy	Presencias- pseudo ausencias	3,685	0,943
Generalize Linear Model (logistic)	Presencias- pseudo ausencias	3,485	0,943

Tabla 8. Evaluación de modelos continuos. Evaluación de ausencias= tipos de datos de ausencias utilizado en el modelamiento; Programa=software utilizado para ejecutar el algoritmo; AUC=área bajo la curva ROC (receiver operating characteristic)

Modelo	Evaluación de ausencias	Programa	AUC(ROC)
Maximum Entropy	“background”	MaxEnt	0,975
GLM logit	“background”	ModEco	0,965
BP-ANN	“background”	ModEco	0,976
SVM	“background”	ModEco	0,949
GLM logit	Ausencias reales	ModEco	0,952
Maximum Entropy	Ausencias reales	ModEco	0,955
BP-ANN	Ausencias reales	ModEco	0,952
SVM	Ausencias reales	ModEco	0,916
GARP	“background”	Open Modeller	0,97

Los resultados sugieren leves cambios en la distribución de *R.spinulosa*. En Chile todas las poblaciones conocidas de *R.spinulosa* quedan dentro del área de estabilidad bioclimática con excepción de cinco poblaciones ubicadas en los extremos latitudinales de la distribución en Chile. Las poblaciones de Lluta y Azapa ubicadas en la Región de Arica y Parinacota por el norte; y tres poblaciones en la Región de Los Lagos: Puntahuano, Petrohue Sur y Ensenada. De las poblaciones que se encuentran en zonas inestables las del norte se comporta como un “outlier” en todas las predicciones y su posición no es inferida por ningún algoritmo ni en el presente ni en el Último Máximo Glacial; y para las poblaciones sur los distintos modelos sugieren 2 escenarios distintos, que éstas se encontrarían en un área bioclimáticamente inestable y corresponderían a poblaciones “outliers” para ambos periodos o que las condiciones bioclimáticas sólo serían adecuadas para su persistencia en el presente, por lo que corresponderían a poblaciones colonizadas posterior a la retirada de los hielos.

Además los tres modelos proponen que entre los 21° y los 29° de latitud sur existiría una zona al oeste del área de estabilidad bioclimática donde las condiciones bioclimáticas permitirían la presencia de *R.spinulosa* a menor altitud que durante el UMG; mientras que los modelos Generalize Linear Model y Two Class Support Vector Machine coinciden que entre los 33° y los 40° de latitud sur *R. spinulosa* habría tenido una distribución más amplia durante el UMG y

podría haber alcanzado la costa. Los mismos modelos sugieren que en el presente existirían condiciones bioclimáticas adecuadas para la presencia de poblaciones de *R. spinulosa* entre los 41° y 45° S aunque entre esas latitudes sólo existen poblaciones reportadas en Argentina. (Figura 9).

4.2.-Modelos probabilísticos – mapas continuos

Los modelos probabilísticos se evaluaron mediante su valor AUC. Todos los modelos probabilísticos obtuvieron valores de AUC altos (> 0.95) con excepción del algoritmo “Support Vector Machine” (Tabla 8). Los valores altos de AUC indican que las variables utilizadas fueron capaces de discriminar efectivamente las áreas de presencia de aquellas de ausencias. En el programa ModEco los algoritmos fueron corridos mediante la metodología “background” y con datos de ausencia reales. Los resultados muestran que todos los modelos de distribución obtuvieron un mejor ajuste al ser ejecutados con la metodología “background” que con datos reales de ausencia, esto se debería a que sólo se consideraron datos de ausencia dentro de Chile no abarcando la totalidad de la distribución de *R. spinulosa* (Tabla 8). Para los siguientes análisis sólo se consideraron los algoritmos ejecutados con la metodología “background” descartándose todos los modelos creados a partir de datos de presencia y ausencias verdaderas.

Los algoritmos Maximum Entropy y Garp tuvieron un buen ajuste a la distribución conocida de *R. spinulosa*, mientras que los algoritmos BP ANN y GLM logit mostraron deficiencias en sus resultados. El modelo BP-ANN falló en predecir las poblaciones al sur de los 36° y fue incapaz de distinguir áreas donde la probabilidad de ocurrencia difiriera entre el presente y el UMG; y el algoritmo GLM (logit) le otorgó mucho menor probabilidad a los extremos de la distribución de *R. spinulosa* y sugiere que todas las poblaciones conocidas en Chile, entre los 37°S hasta los 42°S, bajo el escenario bioclimático, deberían estar extintas (Figura 10).

De los algoritmos que entregaron resultados satisfactorios, el algoritmo Maximum Entropy fue más conservador que GARP, al asignar probabilidades de ocurrencia menores. Además el algoritmo GARP, en Argentina, entre los 26°S y 40°S y los 67°O y 58°O proyecta una distribución errática, que no se ajusta a los datos de distribución conocidos. Luego, al sur de los 47°S este mismo algoritmo tuvo un menor ajuste que Maximum Entropy prediciendo que *R.*

spinulosa podría alcanzar el extremo austral del continente, sin embargo no existen datos de presencia en esta región y tampoco concordaría con la distribución propuesta por Cei (1980); en esta misma región el algoritmo Maxent indica que todas las poblaciones argentinas al sur de los 42°S habrían sido colonizadas con posterioridad al UMG. Alrededor de los 25°S en Chile, ambos modelos muestran que las condiciones bioclimáticas habrían permitido que *R. spinulosa* alcanzara la costa durante el UMG, este resultado es sustentado por los modelos determinísticos “Two-Class Support Vector Machine”, “Maximum Entropy” y “Generalize Linear Model”. Además el algoritmo Maxent mostró que entre los 25° y 31°S sólo existirían condiciones adecuadas para la persistencia de poblaciones de *R. spinulosa* en el presente lo cual podría indicar que las condiciones bioclimáticas que limitan la persistencia de este anfibio han mejorado en la actualidad, pero éste aún no ha sido capaz de colonizar estas zonas (Figura 10).

Con respecto a las poblaciones más australes de Chile, “Maximum Entropy” muestra que estas serían “outliers” pero se encontrarían cercanas a áreas de estabilidad. Este resultado difiere con el resultado de GARP que muestra entre los 39° y 42°S que la probabilidad de encontrar poblaciones de *R. spinulosa* sería mayor en el presente que en el UMG, igual que los algoritmos determinísticos “Generalize Linear Model” y “Two-Class Support Vector Machine” entre los 41° y 42°S, lo que soporta la idea de que estas poblaciones podrían haber sido colonizadas posterior a la retirada de los hielos (Figura 10).

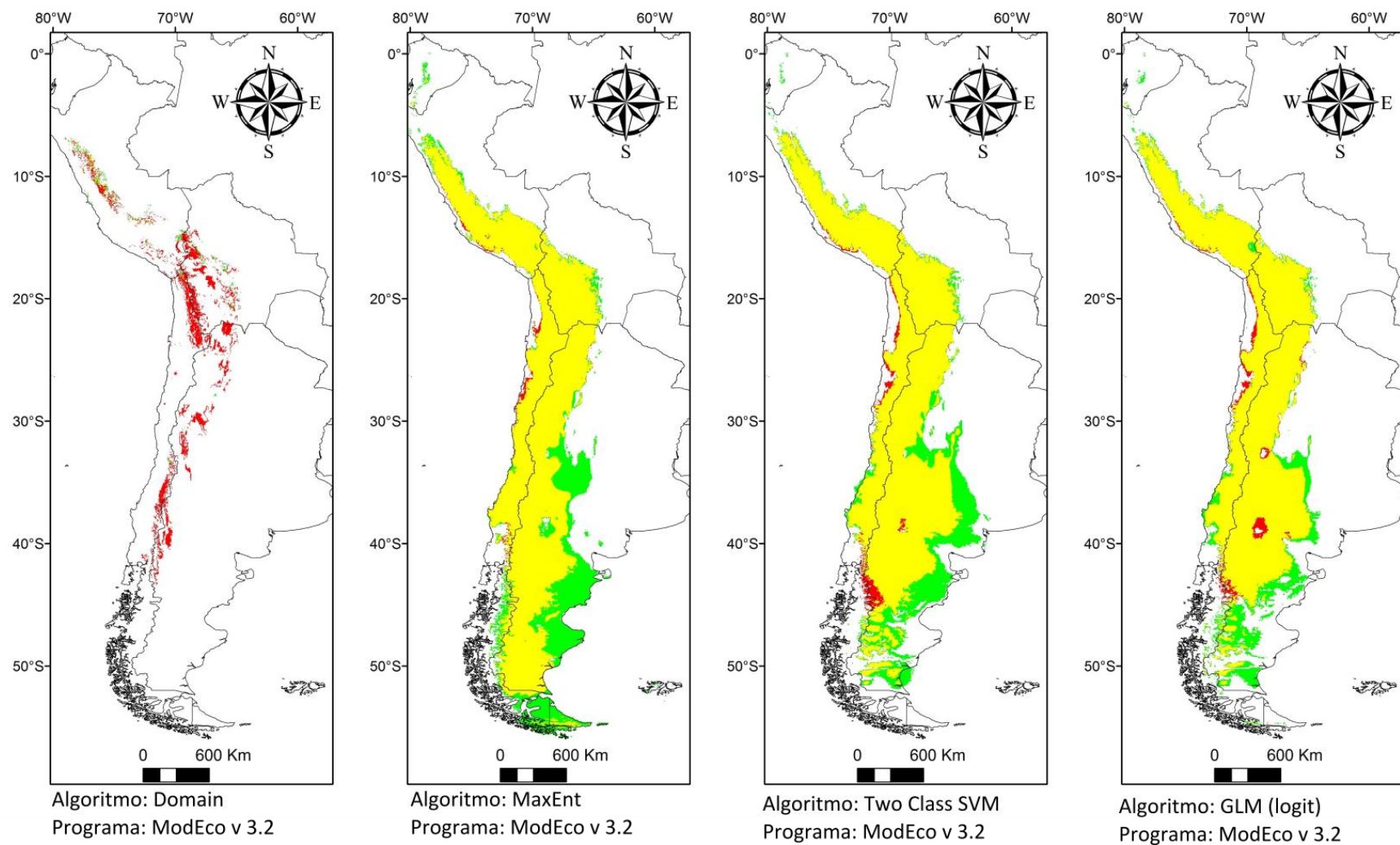


Figura 9. Modelos de distribución discretos a partir de variables biolímáticas seleccionados para *R.spinulosa*. ■ Área donde las condiciones bioclimáticas permitirían la presencia de *R. spinulosa* solamente en el presente. ■ Área donde las condiciones bioclimáticas permitirían la presencia de *R. spinulosa* solamente en el UMG. ■ Área donde las condiciones bioclimáticas permitirían la presencia de *R. spinulosa* en el presente y en el UMG, se consideran zonas de estabilidad bioclimática.

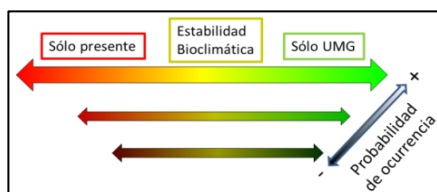
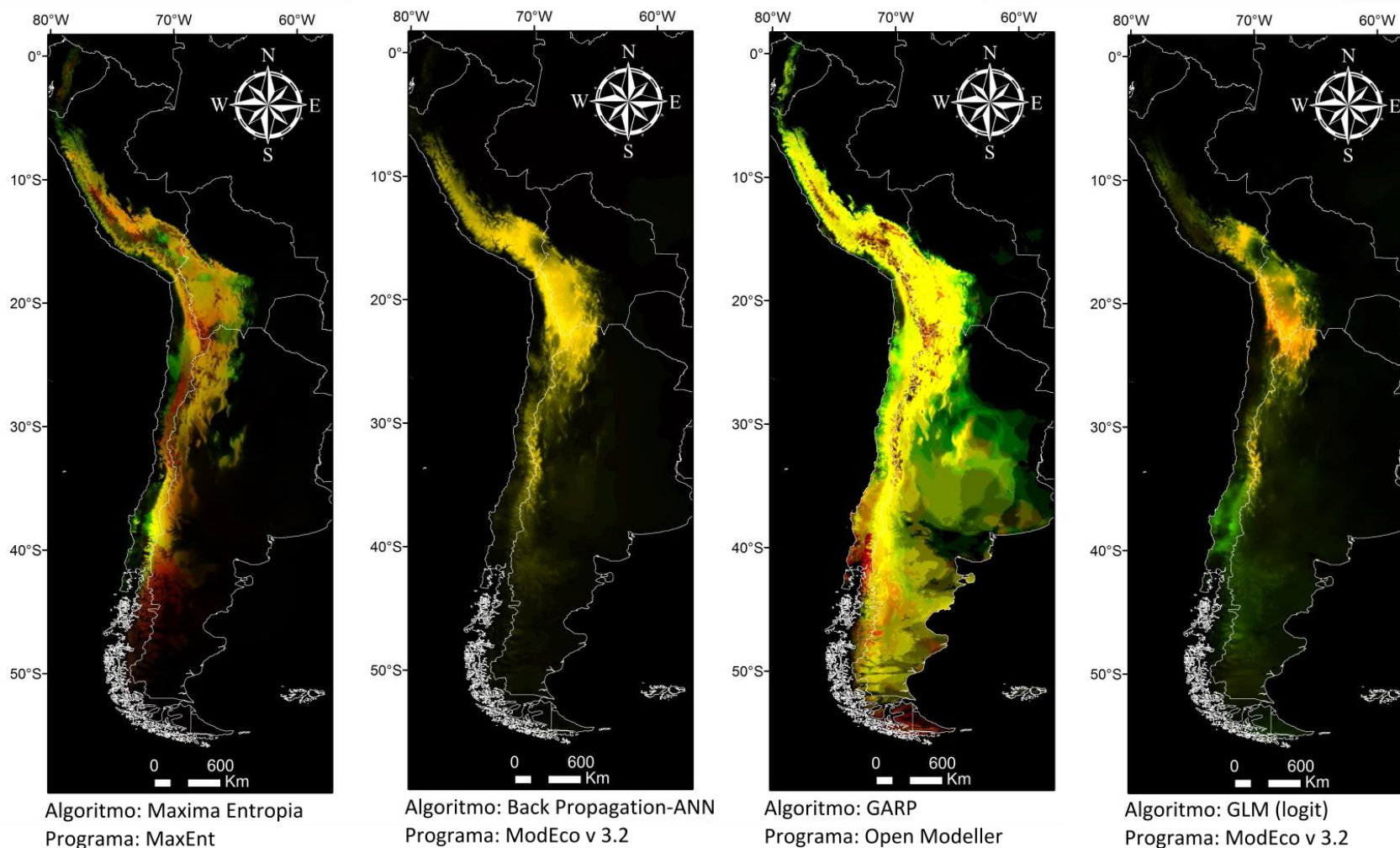


Figura 10. Modelos de distribución continuos a partir de variables bioclimáticas seleccionados para *R. spinulosa*. Arriba) Proyección de la distribución. Abajo) Interpretación de los datos. Píxeles rojos indican áreas donde las condiciones bioclimáticas permitirían la presencia de *R. spinulosa* solamente en el presente. Píxeles verdes indican áreas donde las condiciones bioclimáticas permitirían la presencia de *R. spinulosa* solamente en el UMG. Píxeles amarillos indican áreas donde las condiciones bioclimáticas permitirían la presencia de *R. spinulosa* en el presente y en el UMG. Colores más claros indican mayor probabilidad de ocurrencia; colores más oscuros indican menor probabilidad de ocurrencia. Negro indica probabilidad de presencia igual a cero.

5.-Objetivo específico 4: Evaluar la representatividad de la diversidad genealógica dentro de las áreas protegidas (SNASPE) y determinar aquellas localidades que aportarían mayor diversidad genealógica complementaria a la actualmente resguardada.

5.1.-Diversidad genealógica dentro de las áreas protegidas del SNASPE

En la Tabla 9 se pueden observar aquellas localidades utilizadas para el análisis filogenético a nivel intraespecífico que se encontraron dentro de las áreas protegidas o dentro del buffer de 10 Km. La diversidad filogenética total, se calculó como la suma de la longitud de todas ramas, excluyendo los outgroups, resultando un valor igual a 37,36. Utilizando el criterio estricto observamos que de la totalidad de esa diversidad, solamente 7,33 se encontró dentro de algún área protegida es decir un 19,6% y este valor disminuyó a un 18,5% cuando se consideraron solamente los Parque Nacionales, que son áreas que tienen como uno de sus objetivo prioritarios la conservación de la biodiversidad, a diferencia de las Reservas Nacionales y los Monumentos Naturales (Tabla 10). Al utilizar el criterio relajado el valor de protección dentro del sistema nacional de áreas protegidas subió a 16 lo que equivale a un 42,8%, mientras que al considerar solamente Parque Nacional el valor de protección subió a 27,4% (Tabla 11).

Tabla 9. Localidades de *R. spinulosa* utilizadas para los análisis de ADN, que se encuentran protegidas por el sistema nacional de áreas protegidas (SNASPE) y aquellas que se encuentran en las cercanías de estas áreas, dentro de un buffer de 10 Km.

Localidad	Nombre del área protegida	Tipo	Distancia a área protegida
Vioco	Lauca	Parque Nacional	9,5 Km
Colpa	Lauca	Parque Nacional	8 Km
Caquena	Lauca	Parque Nacional	7,5 Km
Pacollo	Lauca	Parque Nacional	2 Km
Lauca	Lauca	Parque Nacional	0 Km*
Putre	Lauca	Parque Nacional	3,2 Km
Parinacota	Lauca	Parque Nacional	0 Km*
Chungara	Lauca	Parque Nacional	0 Km*
Socoroma	Lauca	Parque Nacional	4,5 Km
Zapahuira	Lauca	Parque Nacional	8,8 Km
Chivatambo	Las Vicuñas	Reserva Nacional	0 Km*
Surire	Las Vicuñas	Reserva Nacional	0 Km*
Isluga	Volcan Isluga	Parque Nacional	0,5 Km
Katarpe	Los Flamencos	Reserva Nacional	8 Km
Vilama	Los Flamencos	Reserva Nacional	5,8 Km
Morales	El Morado	Reserva Nacional	1,9 Km
Chillan	Ñuble	Reserva Nacional	7,6 Km
Laja	Laguna Laja	Parque Nacional	0 Km*
Ensenada	Vicente Perez Rosales	Parque nacional	5,9 Km

*Localidades ubicadas en el interior de áreas protegidas del SNASPE

Tabla 10. Valor de la Diversidad filogenética intraespecífica (genealógica) resguardada considerando las localidades que se encuentran dentro de las áreas protegidas del SNASPE y las localidades dentro de los Parque Nacionales. Diversidad Filogenética=valor del índice de diversidad filogenética (Faith 1992); Porcentaje=porcentaje que representa el valor de la diversidad filogenética, de la diversidad total.

	Diversidad Filogenética	Porcentaje de protección (%)
Áreas protegidas del SNASPE	7,3	19,6
Solo Parques Nacionales	6,9	18,5
Total filogenia	37,36	100

Tabla 11. Valor de la Diversidad filogenética intraespecífica (genealógica) resguardada considerando las localidades que se encuentran dentro de las áreas protegidas del SNASPE y las localidades dentro de los Parque Nacionales; incluyendo aquellas localidades que se encuentran dentro de un área buffer de 10 km alrededor de esas áreas. Diversidad Filogenética=valor del índice de diversidad filogenética (Faith 1992); Porcentaje de protección= representa el valor de la diversidad filogenética protegida, de la diversidad total.

	Diversidad Filogenética	Porcentaje de protección (%)
Áreas protegidas del SNASPE	16	42,8
Solo Parques Nacionales	10,24	27,4
Total filogenia	37,36	100

5.2.- Diversidad filogenética complementaria

Para este análisis se consideraron los resultados de la diversidad genealógica bajo los cuatro criterios de clasificación descritos en la sección anterior (resultados 3.1); y se trabajó bajo el supuesto que las localidades restantes son posibles de proteger. La diversidad genealógica (diversidad filogenética complementaria) que aportaría cada localidad al ser incluida en el sistema de áreas protegidas fue calculada mediante el índice de diversidad filogenética de Faith (1992) con lo que fue posible realizar un “ranking” de prioridad de aquellas localidades prioritarias para la conservación de la diversidad intraespecífica de *R. spinulosa*.

El análisis de diversidad complementaria mostró, para tres de los cuatro criterios el mismo resultado, que Farellones es la población que aportaría con mayor diversidad filogenética si se protegiera. Una vez protegida esta población la segunda población que se debería considerar sería Quebrada de Jere. Estas dos poblaciones aportarían sustancialmente a la protección de la diversidad filogenética.

El único criterio que difirió fue el más laxo, que incluye a las poblaciones dentro del buffer de 10 km de cualquier área protegida, para este análisis la primera elección fue Quebrada de Jere y

en segundo lugar Farellones. En las tablas 12 a 15, se señala la secuencia en que deberían incluirse dentro del sistema de protección aquellas localidades que no se encuentran protegidas para maximizar el aporte de diversidad filogenética resguardada, para cada uno de los criterios de clasificación de localidades. En las Figuras 11-14 se muestra en un filograma el aporte de las dos localidades, que actualmente no se encuentran protegidas, y que podrían aportar la mayor diversidad filogenética a la actualmente resguardada si se protegieran, Quebrada Jere y Farellones. Estos resultados debieran ser tomados con precaución pues el índice es dependiente del número de individuos muestreados por localidad.

Tabla 12. Diversidad filogenética complementaria a los Parques Nacionales. Secuencia en que deberían incluirse localidades dentro de los parques nacionales para maximizar la protección de la diversidad genética en éstos. D.F.=valor de la diversidad filogenética (Faith 1992); Aporte de localidad=valor en que aumenta la diversidad filogenética al incluir una nueva localidad; Porcentaje de protección= representa el valor de la diversidad filogenética protegida, de la diversidad total. DFP=Diversidad Filogenética protegida inicialmente; Far= Farellones; QJ=Quebrada de Jere; Fla=El Flaco; Til=tilomonte; Tat=Tatio; Queb=Quebe; VP= Vado Putana; Por= Portillo.

	D.F.	Aporte de localidad	Porcentaje de protección (%)
DFP	6,91		0,184957
DFP + Far	10,71	3,8	0,28667
DFP + Far + QJ	14,04	3,33	0,375803
DFP + Far + QJ + Fla	15,47	1,43	0,414079
DFP + Far + QJ + Fla + Til	16,59	1,12	0,444058
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat	17,69	1,1	0,473501
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat + Queb	18,61	0,92	0,498126
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat + Queb + VP	19,52	0,91	0,522484
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat + Queb + VP + Por	20,35	0,83	0,5447

Tabla 13. Diversidad filogenética complementaría a las áreas del SNASPE. Secuencia en que deberían incluirse localidades dentro de los parques nacionales para maximizar la protección de la diversidad genética en éstos. D.F.=valor de la diversidad filogenética (Faith 1992); Aporte de localidad=valor en que aumenta la diversidad filogenética al incluir una nueva localidad; Porcentaje de protección= representa el valor de la diversidad filogenética protegida, de la diversidad total. DFP=Diversidad Filogenética protegida inicialmente; Far= Farellones; QJ=Quebrada de Jere; Fla=El Flaco; Til=tilomonte; Tat=Tatio; Queb=Quebe; VP= Vado Putana; Por= Portillo.

	D.F	Aporte de localidad	Porcentaje de protección (%)
DFP	7,33		0,196199
DFP + Far	11,12	3,79	0,297645
DFP + Far + QJ	14,46	3,34	0,387045
DFP + Far + QJ + Fla	15,89	1,43	0,425321
DFP + Far + QJ + Fla + Til	17,01	1,12	0,4553
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat	18,1	1,09	0,484475
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat + Queb	19,02	0,92	0,509101
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat + Queb + VP	19,93	0,91	0,533458
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat + Queb + VP + Por	20,77	0,84	0,555942

Tabla 14. Diversidad filogenética complementaría a Parque nacionales y localidades dentro de un área buffer de 10 Km. Secuencia en que deberían incluirse localidades dentro de los parques nacionales para maximizar la protección de la diversidad genética en éstos. D.F.=valor de la diversidad filogenética (Faith 1992); Aporte de localidad=valor en que aumenta la diversidad filogenética al incluir una nueva localidad; Porcentaje de protección= representa el valor de la diversidad filogenética protegida, de la diversidad total. DFP=Diversidad Filogenética protegida inicialmente; Far= Farellones; QJ=Quebrada de Jere; Fla=El Flaco; Til=tilomonte; Tat=Tatio; Queb=Quebe; VP= Vado Putana; Por= Portillo.

	D.F.	Aporte de localidad	Porcentaje de protección (%)
DFP	10,24		0,27409
DFP + Far	14,04	3,8	0,375803
DFP + Far + QJ	17,37	3,33	0,464936
DFP + Far + QJ + Fla	18,8	1,43	0,503212
DFP + Far + QJ + Fla + Til	19,92	1,12	0,533191
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat	21,02	1,1	0,562634
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat + Queb	21,94	0,92	0,587259
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat + Queb + VP	22,85	0,91	0,611617
DFP + Far + QJ + Fla + Til + Tat + Queb + VP + Por	23,68	0,83	0,633833

Tabla 15. Diversidad filogenética complementaria a las áreas del SNASPE y localidades dentro de un área buffer de 10 Km. Secuencia en que deberían incluirse localidades dentro de los parques nacionales para maximizar la protección de la diversidad genética en éstos. D.F.=valor de la diversidad filogenética (Faith 1992); Aporte de localidad=valor en que aumenta la diversidad filogenética al incluir una nueva localidad; Porcentaje de protección= representa el valor de la diversidad filogenética protegida, de la diversidad total. DFP=Diversidad Filogenética protegida inicialmente; Far= Farellones; QJ=Quebrada de Jere; Fla=El Flaco; Til=tilomonte; Tat=Tatio; Queb=Quebe; VP= Vado Putana; Por= Portillo.

	D.F.	Aporte de localidad	Porcentaje de protección (%)
DFP	15,98		0,427730193
DFP + QJ	18,3	2,32	0,489828694
DFP + QJ + Far	20,27	1,97	0,542558887
DFP + QJ + Far + Fla	21,7	1,43	0,580835118
DFP + QJ + Far + Fla + Til	22,82	1,12	0,610813704
DFP + QJ + Far + Fla + Til + Tat	23,91	1,09	0,639989293
DFP + QJ + Far + Fla + Til + Tat + Queb	24,84	0,93	0,664882227
DFP + QJ + Far + Fla + Til + Tat + Queb + VP	25,74	0,9	0,688972163
DFP + QJ + Far + Fla + Til + Tat + Queb + VP + Por	26,58	0,84	0,711456103

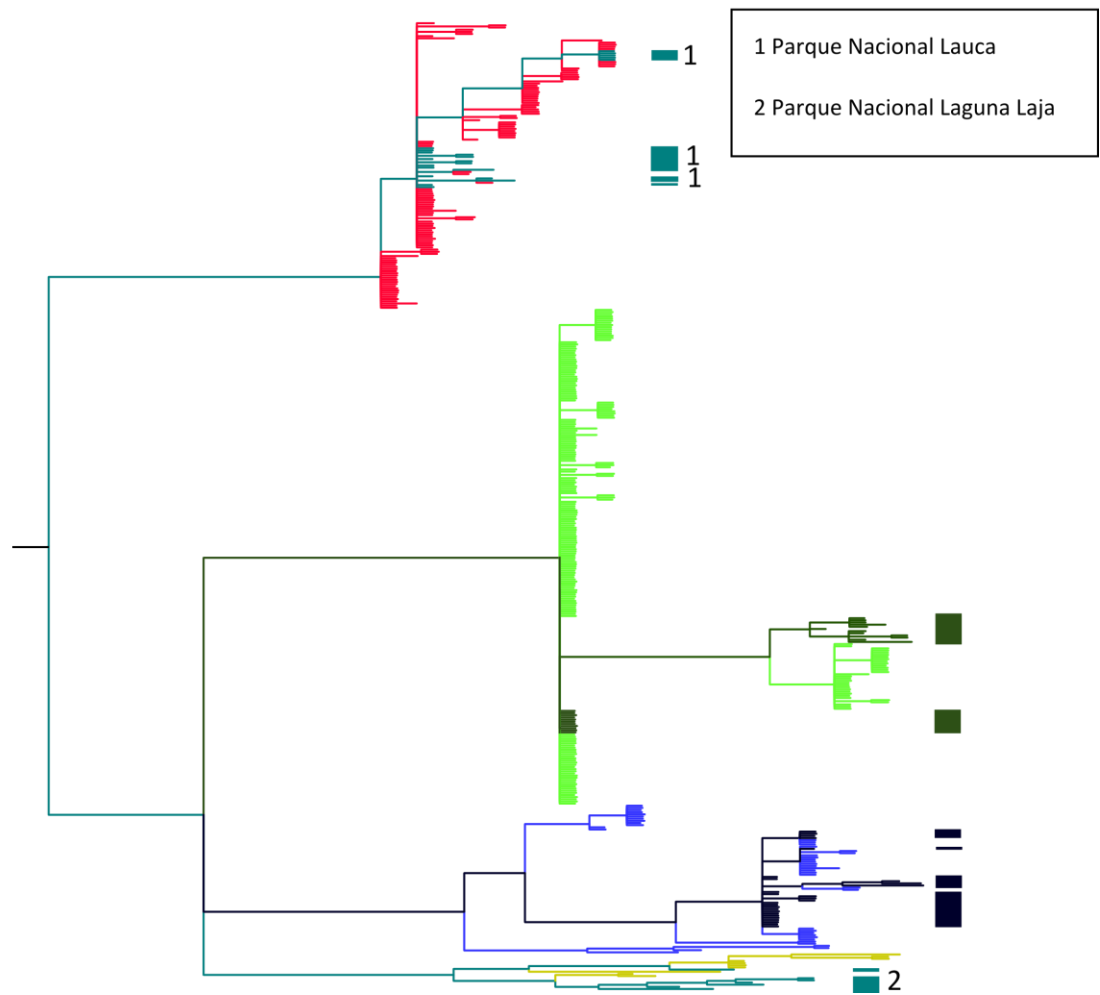


Figura 11. Diversidad complementaria a los Parque Nacionales; criterio estricto. Filograma del árbol bayesiano, muestra la diversidad total de *R.spinulosa* en Chile. ■ Diversidad filogenética protegida en los parques nacionales. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 1. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 2. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 3. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 4. ■ Diversidad filogenética aportada por la localidad de Farellones. ■ Diversidad filogenética aportada por Quebrada de Jere. Los números señalan que áreas protegidas del SNASPE se encuentran implicadas en la protección de la diversidad filogenética.

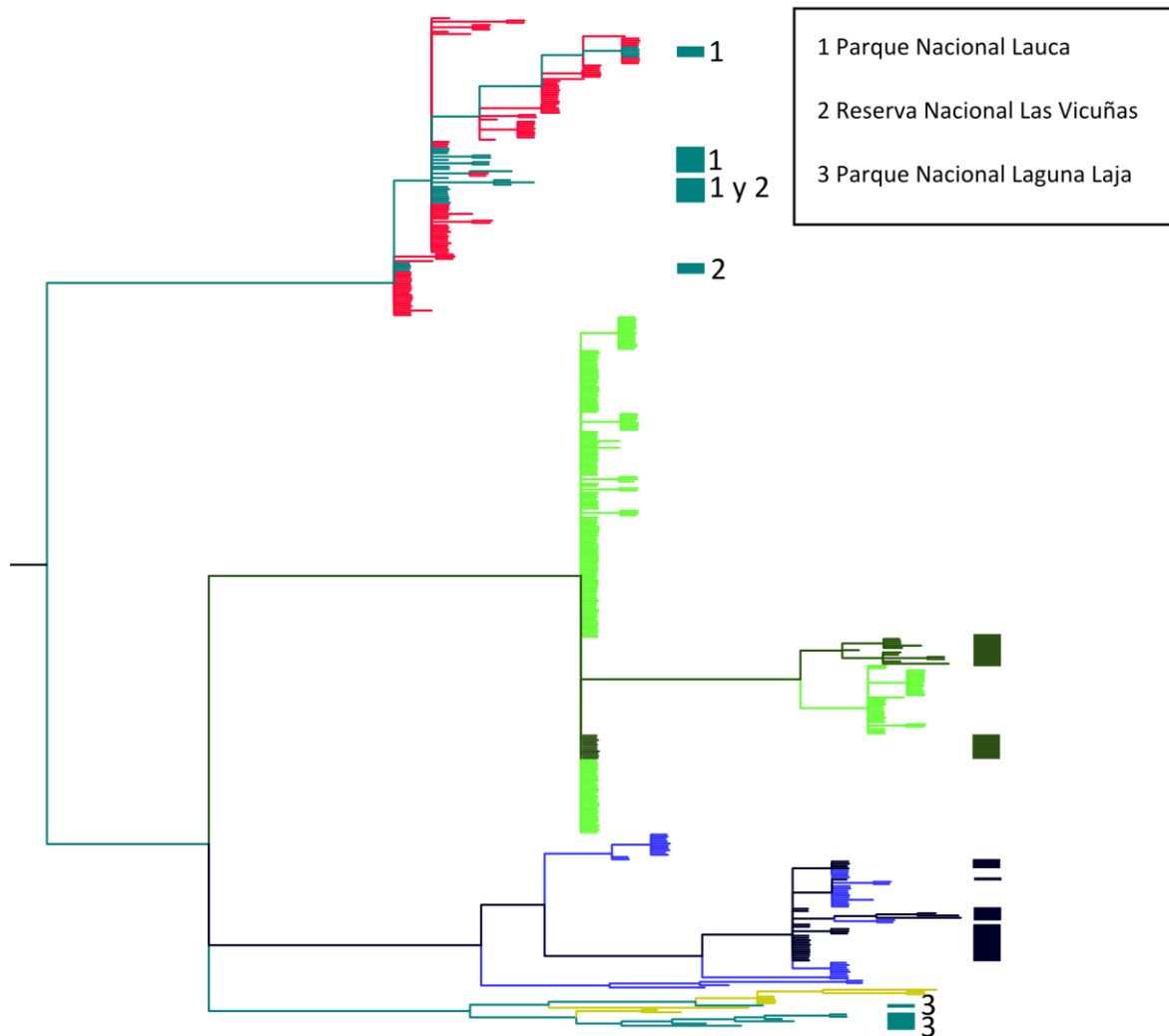


Figura 12. Diversidad complementaria a las áreas protegidas SNASPE; criterio estricto. Filograma del árbol bayesiano, muestra la diversidad total de *R. spinulosa* en Chile. ■ Diversidad filogenética protegida en las Áreas Protegidas del SNASPE. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 1. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 2. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 3. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 4. ■ Diversidad filogenética aportada por la localidad de Farellones. ■ Diversidad filogenética aportada por Quebrada de Jere. Los números señalan que áreas protegidas del SNASPE se encuentran implicadas en la protección de la diversidad filogenética.

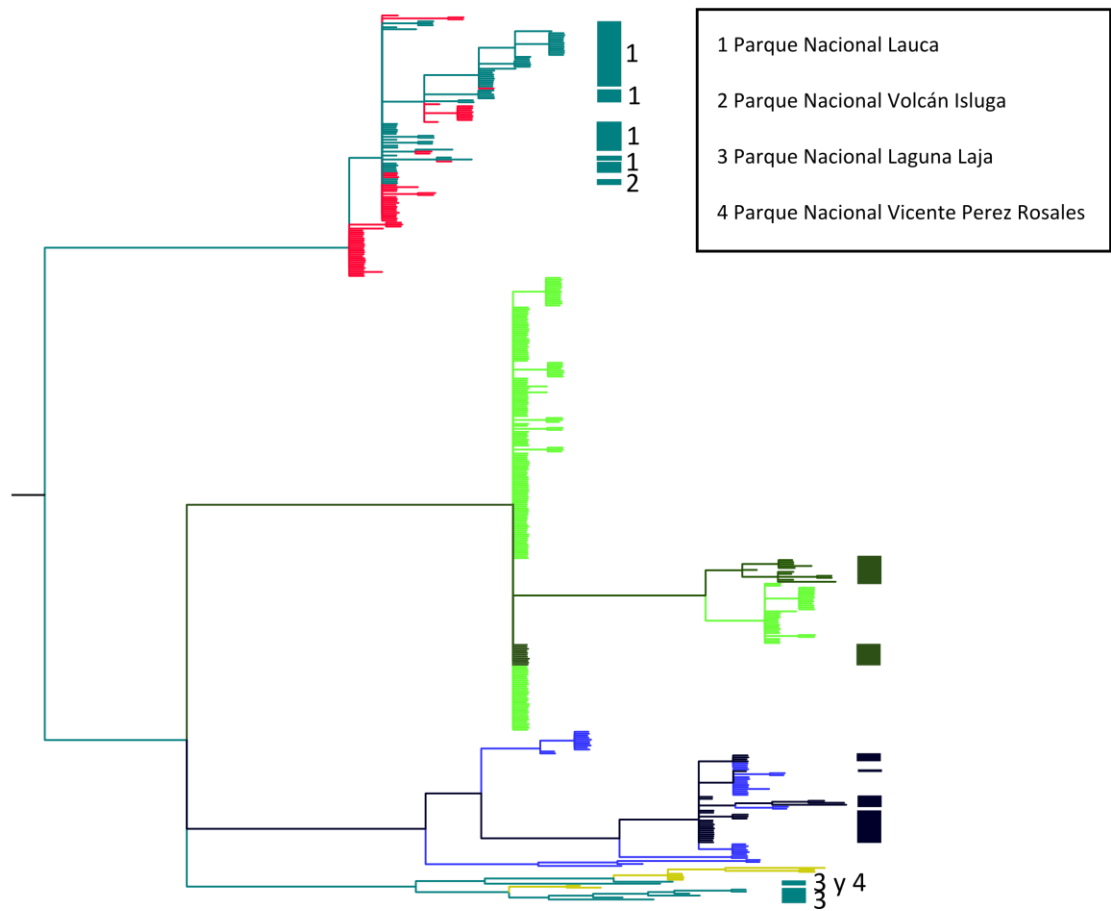


Figura 13. Diversidad complementaria a los parques nacionales; criterio laxo, que incluye como protegidas a las localidades dentro de un buffer de 10 Km. Filograma del árbol bayesiano, muestra la diversidad total de *R. spinulosa* en Chile. ■ Diversidad filogenética protegida en los Parques Nacionales del SNASPE. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 1. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 2. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 3. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 4. ■ Diversidad filogenética aportada por la localidad de Farellones. ■ Diversidad filogenética aportada por Quebrada de Jere. Los números señalan que áreas protegidas del SNASPE se encuentran implicadas en la protección de la diversidad filogenética.

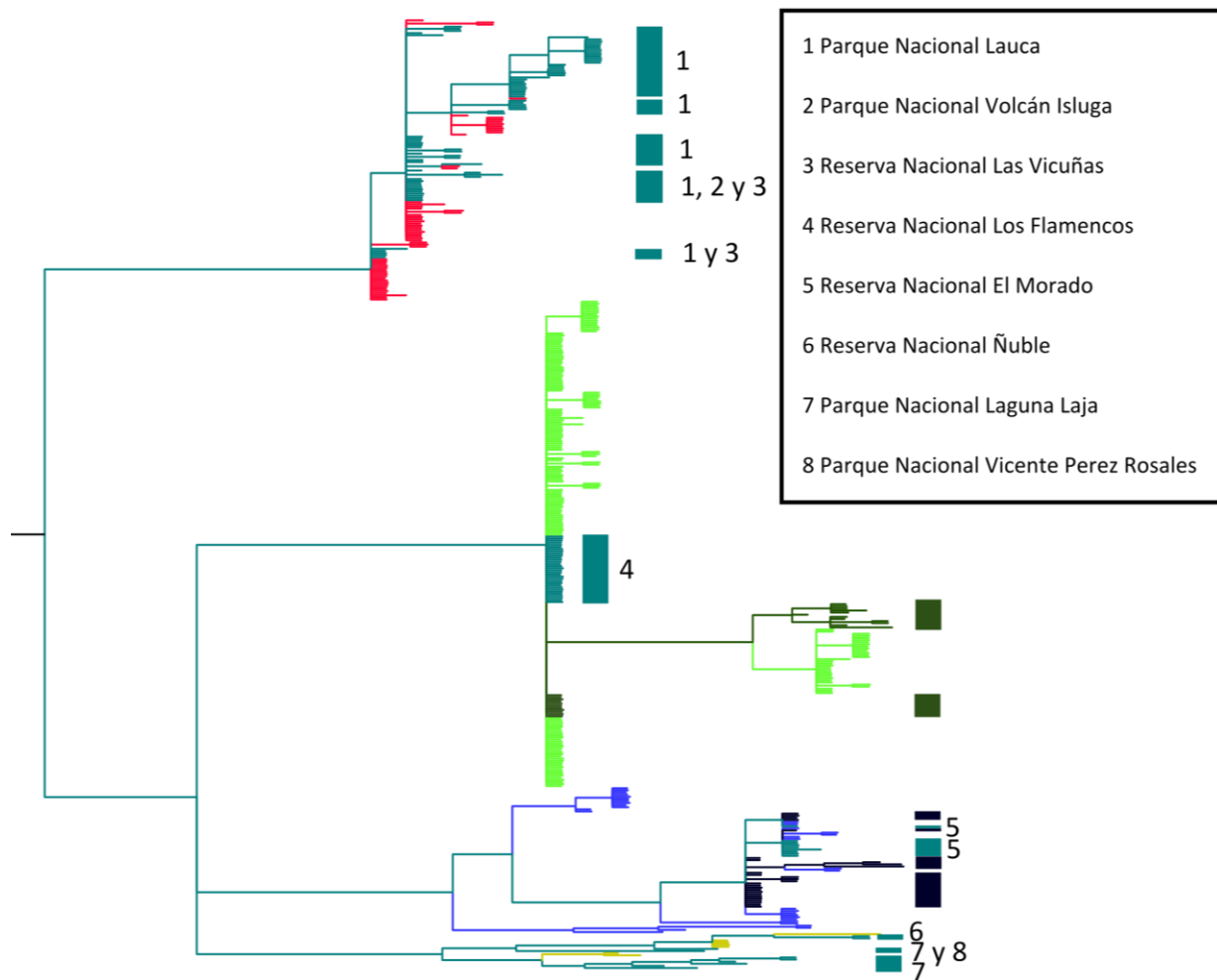


Figura 14. Diversidad complementaria a las áreas protegidas SNASPE; criterio laxo, que incluye como protegidas a las localidades dentro de un buffer de 10 Km. Filograma del árbol bayesiano, muestra la diversidad total de *R. spinulosa* en Chile. ■ Diversidad filogenética protegida en las Áreas Protegidas del SNASPE. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 1. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 2. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 3. ■ Diversidad filogenética no protegida del linaje 4. ■ Diversidad filogenética aportada por la localidad de Farellones. ■ Diversidad filogenética aportada por Quebrada de Jere. Los números señalan que áreas protegidas del SNASPE se encuentran implicadas en la protección de la diversidad filogenética.

Discusión

Los resultados muestran 4 linajes principales bien soportados cuyas poblaciones se encuentran agrupadas latitudinalmente. El primer linaje correspondería a las poblaciones que se encuentran entre Umaqui (69°23'O; 17°44'S) y el Salar de Alconcha (68°29'O; 21°35'S). El segundo linaje incluiría a todas las poblaciones entre Carcote (68°19'O; 21°16'S) y Tilomonte (68°06'O; 23°47'S). El tercer linaje incluye a todas las poblaciones entre Portillo (70°10'O; 32°52'S) y El Flaco (70°27'O; 34°57'S), y el cuarto linaje a las poblaciones conocidas al sur de Lircay (70°59'O; 35°34'S). Este análisis mostró la presencia de subclados dentro de los grupos 2 y 3.

Los linajes principales se encontrarían asociados a la presencia de barreras geográficas que habrían mantenido estos clados separados en Chile y habrían contribuido a la diferenciación genética. La primera de estas barreras, que separaría al linaje 1 del 2 sería un cordón montañoso que separa el Salar de Carcote del Salar de Alconcha el cual incluye al cerro Tres Moños, al volcán Aucanquilcha y al complejo de volcanes bolivianos Olca-Cardón.

La separación del linaje 2 y 3 se podría deber a la presencia de la diagonal árida (23°S-29°S) que pasa por el sur del salar de Atacama entre los 25°S y 27°S en dirección sur-oriente. Esta diagonal corresponde a un área geográfica hiperárida que se habría establecido producto del fortalecimiento de la Corriente del Perú (Corriente de Humboldt) en el Océano Pacífico y el levantamiento de la Cordillera de Los Andes lo cual habría generado un efecto de sombra de lluvia a las masas atmosféricas provenientes del este (Hinojosa & Villagrán 1997; Villagrán & Hinojosa 2005). El establecimiento de la Diagonal Árida habría afectado a la evolución y distribución de la flora y vegetación del Cono Sur de Sudamérica (Villagrán & Hinojosa 2005), dificultando la expansión norte-sur de la flora a lo largo del cordón andino causando bajos niveles de similitud florística entre la flora andina de la Puna y la flora andina mediterránea (Villagrán *et al.* 1998; Villagrán & Hinojosa 2005). Esta área, que se considera el núcleo del desierto de Átacama, habría mantenido su condición de aridez durante el Pleistoceno/Holoceno, no habiendo sido afectada por los cambios de humedad (Kull *et al.* 2002). La hipótesis que esta diagonal podría actuar como barrera geográfica para *R. spinulosa* se encuentra parcialmente sustentada por el resultado de cuatro algoritmos utilizados para modelar la distribución: "Domain", "Back Propagation-ANN", "Máxima Entropía" y "Generalized Linear Model (logit)"; además la distribución conocida para la especie también respaldaría la influencia de la diagonal

árida como una barrera importante, ya que ésta se interrumpe a los 23°S en Chile (Tilomonte) y a los 27°S en Argentina ajustándose al trazado de la diagonal árida. La especie vuelve a aparecer por el lado argentino a los 29°S, latitud que coincide con la mayor extensión de la diagonal árida a fines del UMG.

En la cuenca del río Mataquito, ubicada entre 34°5'S y 37°3' S (DGA 2004), no existen registros de *R. spinulosa*, y la presencia del ensamble volcánico constituido por los volcanes Petorea, Planchon y Azufre nos hace pensar que podría constituir una barrera geográfica entre los linajes 3 y 4. Esta agrupación volcánica tiene su centro a los 35°15'S 70°30'O. El más grande y antiguo de este grupo es el volcán Azufre que habría comenzado a formarse debido a actividad volcánica durante el plio-pleistoceno (0,55 Ma) (Hildreth *et al.* 1988; Tormey *et al.* 1989). Este quiebre filogeográfico coincidiría con los resultados de Sérsic *et al.* (2011) , quienes encontraron dos quiebres, a los 35°S y 37,5°S. El mismo autor señala que estos dos serían compartidos por plantas y animales; y su presencia podría atribuirse a la orogénesis de los Andes (mioceno-plioceno) y los procesos tectónicos asociados.

El análisis filogeográfico utilizando el programa Geneland permitió agrupar las localidades en 6 unidades poblacionales distintas. El primer y último de estos grupos se correspondieron con los linajes 1 y 4 del análisis filogenético. Mientras que los linajes 2 y 3 se encontraron subdivididos en dos unidades poblacionales respectivamente. Dentro del linaje 2, las poblaciones de Tilomonte y Peine fueron asignadas como una unidad poblacional independiente del resto de las localidades que conforman este linaje. Este resultado sugiere que estas poblaciones quedaron aisladas hasta alcanzar un alto grado de divergencia. Tilomonte se ubica al sur del salar de Atacama y no existe evidencia de individuos que compartan haplotipos con las localidades del linaje principal, es posible que para esta localidad el salar de Atacama actúe como un barrera geográfica que había permitido la diferenciación de *R. spinulosa*. En Peine, Socaire y Quebrada Jere se encontraron individuos pertenecientes a ambos haplogrupos, esto se ajustaría a un patrón de contacto secundario. Existe evidencia que sugiere que en el salar de Atacama, entre los 22°S y 24°S, ocurrieron dos fases húmedas posterior a la retirada de los hielos; la primera se encontraría datada entre finales de la era glacial y principios de Holoceno (15,4 – 9 Ka) y habría originado la mayor parte de los recursos hídricos en esta región (Grosjean *et al.* 1995; Rech *et al.* 2002); y la segunda se dataría a mediados del holoceno, entre 8 y 3 Ka, ambos periodos habrían terminado abruptamente y habrían sido reemplazados por periodos de hiperaridez (Rech *et al.* 2002). Durante estos periodos húmedos, las diferentes

poblaciones de *R.spinulosa* podrían haberse conectado y el patrón genético actual sería consecuencia de esto.

Dentro del linaje 3 (que comprende las localidades entre la región de Valparaíso y O'Higgins) Farellones, El Yeso, Lagunillas, Morales y El Teniente formaron una unidad poblacional distinta a Portillo y El Flaco, el análisis filogenético sugiere que este grupo sería un linaje más reciente que habría derivado a partir de poblaciones como el Flaco y Portillo. Farellones, El Yeso, Lagunillas, Morales y El Teniente pertenecen a la cuenca del río Maipo y podrían mantenerse conectadas entre sí a través de valles transversales de la cordillera andina por ejemplo el Cajón del Río Olivares y el valle del Río San José. Por el norte, este grupo se encontraría aislado de Portillo, que pertenece a la cuenca del río Aconcagua, por la cadena montañosa que separa a ambas cuencas y que está formada por los glaciares Olivares y Juncal Sur, entre otros. Por el sur no existe una barrera clara que separe este grupo de la localidad de El Flaco, aunque lo más parsimonioso es pensar que el grupo de cerros que separa las cuencas de río Rapel y del río Maipo (cerros Los Lunes, Durazno, Del Valle y Catedral) constituirían una barrera efectiva. Nuestros datos no nos permitieron evaluar la relación existente entre las localidades de El Flaco y Portillo. Extender el área de estudio hacia las poblaciones argentinas y utilizar otros marcadores genéticos podría entregar un panorama más claro sobre la relación filogeográfica entre estas dos poblaciones.

El linaje más austral mostró la mayor diversidad genética a pesar de tener la menor cantidad de individuos muestreados y localidades prospectadas; especialmente la localidad del Laja donde se encontraron haplotipos muy diferenciados entre sí. Este patrón de alta diversidad podría ser consecuencia de las glaciaciones y se ajustaría al modelo de múltiples refugios. Durante el Último Máximo Glacial las poblaciones podrían haber encontrado refugio en múltiples áreas, sin conectividad entre ellas, donde se podrían haber diferenciado. Es necesario señalar que este mismo patrón podría ser consecuencia de la intensa actividad volcánica que también podría haber actuado como barrera; o una mezcla de ambos procesos. En estos refugios cada población habría pasado por un proceso de diversificación y posteriormente, con el retroceso de los hielos *R.spinulosa* habría recolonizado las áreas donde se encuentra hoy. Esta inferencia debe ser tomada con precaución debido a la deficiencia de muestras genéticas para las localidades del grupo 6 y este escenario podría cambiar con un muestreo más intensivo en las poblaciones desde Lircay al sur.

Gran parte de las poblaciones de *Rhinella spinulosa* se encontraron en áreas bioclimáticamente estables. De las localidades evaluadas a nivel genético, solamente Lluta y Azapa del linaje norte; y Ensenada del linaje más austral podrían verse afectadas por el UMG. Lluta y Azapa son dos localidades cercanas entre sí que se encuentran alrededor de los 18°S a menos de 1000 m.s.n.m, los modelos de distribución sugieren que ambas localidades no presentan las condiciones climáticas para la existencia de *R. spinulosa* por lo tanto su presencia en estas localidades podría deberse a la migración de individuos a través de los valles de Lluta y Azapa desde poblaciones “fuentes”, ubicadas a mayor altura. De todas maneras es necesario evaluar si existen condiciones microclimáticas y/o ecológicas que permitieran la persistencia de *R. spinulosa* en estas localidades. Para Ensenada, la localidad más austral de este estudio, los modelos sugieren que las condiciones bioclimáticas sólo serían adecuadas para la persistencia de *R. spinulosa* en el presente. Por lo tanto sería una población establecida posterior a la retirada de los hielos.

Rhinella spinulosa mostró ser una especie de anfibio con una alta diversidad genética en Chile, la cual se encontró asociada a la abrupta geografía de Chile y a la extensa distribución que presenta *R. spinulosa* en nuestro país. Este trabajo permitió evaluar cuantitativamente la protección de las áreas protegidas sobre la diversidad de esta especie, lamentablemente los resultados muestran que solamente una fracción de la diversidad total se encuentra protegida. Tres de los cuatro criterios que utilizamos para evaluar la protección de esta diversidad, mostraron que los linajes 2 (Carcote-Tilomonte) y 3 (Portillo-El Flaco) se encuentra totalmente desprotegidos. Los análisis de diversidad complementaria muestran que la solución óptima para aumentar la protección de la diversidad no representada en las áreas protegidas sería incluir las poblaciones de Farellones y Quebrada de Jere dentro del Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas. Con esto se aseguraría que al menos todos los linajes principales se encontrarán protegidos. Si bien esta especie no se encuentra amenazada, es plausible que otras especies con una distribución similar pudiesen presentar problemas de conservación a nivel de especie o intraespecífico (linajes, variedades, razas). Algunas de estas especies podrían presentar una estructuración de la diversidad genética similar a *R. spinulosa*, asociada a las mismas barreras geográficas. Por ejemplo estudios recientes en el género de anfibios *Telmatobius* sugieren un quiebre geográfico de los linajes que se corresponde perfectamente con el quiebre entre los linaje 1 y 2 de *R. spinulosa* (68°23'O; 21°S).

Bibliografía

- Angulo A, De la Riva I, Córdova-Santa Gadea J *et al.* (2010) *Rhinella spinulosa*. *IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2.*
- Armesto J, Villagrán C, Donoso C (1994) La historia del bosque templado chileno. , **3**, 66–72.
- Azpilicueta MM, Marchelli P, Gallo L (2009) Marchelli. *Tree Genetics & Genomes*, **5**, 561–571.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl a (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, **16**, 37–48.
- Barker GM (2002) Phylogenetic diversity: a quantitative framework for measurement of priority and achievement in biodiversity conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **76**, 165–194.
- Beebee TJ (1996) *Ecology and Conservation of Amphibians*. Chapman & Hall, London.
- Beebee TJC (2005) Conservation genetics of amphibians. *Heredity*, **95**, 423–427.
- Bernatchez L, Wilson C (1998) Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular ecology*, **7**, 431–452.
- Canestrelli D, Aloise G, Cecchetti S, Nascetti G (2010) Birth of a hotspot of intraspecific genetic diversity: notes from the underground. *Molecular ecology*, **19**, 5432–51.
- Cei JM (1980) *Amphibians of Argentina* (B Baccetti, I Fazzari, V Mazzi, *et al.*, Eds.). Italian Journal of Zoology.
- Correa C, Pastenes L, Sallaberry M, Veloso A, Méndez M (2010) Phylogeography of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) in northern Chile. *Amphibia-Reptilia*, **31**, 85–96.
- Davis MB, Shaw RG (2001) Range shifts and adaptive responses to Quaternary climate change. *Science (New York, N. Y.)*, **292**, 673–9.
- Diagnostico y Clasificación de los cuerpos de agua según objetivos de calidad, Cuenca rio mataquito (2004) , 1–75.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution*, **22**, 1185–92.
- Drummond AJ, Suchard M a, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, **29**, 1969–73.
- Elith J, Phillips SJ, Hastie T *et al.* (2011) A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions*, **17**, 43–57.

- Engler R, Guisan A, Rechsteiner L (2004) An improved approach for predicting the distribution of rare and endangered species from occurrence and pseudo-absence data. *Journal of Applied Ecology*, **41**, 263–274.
- ESRI (2010) ArcGIS 10.
- Estoup A, Wilson IJ, Sullivan C, Cornuet JM, Moritz C (2001) Inferring population history from microsatellite and enzyme data in serially introduced cane toads, *Bufo marinus*. *Genetics*, **159**, 1671–87.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, **1**, 47–50.
- Faith DP (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, **61**, 1–10.
- Faith DP, Reid CA, Hunter J (2004) Integrating Phylogenetic Diversity, Complementarity, and Endemism for Conservation Assessment. *Conservation Biology*, **18**, 225–261.
- Fuentes-Hurtado M, Marín JC, González-Acuña D *et al.* (2011) Molecular divergence between insular and continental Pudu deer (*Pudu puda*) populations in the Chilean Patagonia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **46**, 23–33.
- Gallardo CE, Hernández HJ, Diniz-Filho AJ, Palma RE, Mendez MA (2011) Relationship between the genetic structure of the Andean toad *Rhinella spinulosa* (Anura : Bufonidae) and the northern Chile landscape (21 ° - 24 ° S). *Revista Chilena de Historia Natural*, **84**, 391–406.
- Gaston K (2010) Biodiversity. In: *Conservation Biology for All* (eds Sodhi NS, Ehrlich PR), pp. 27–42. Oxford University Press.
- Gaston K, Spicer J (2004) *Biodiversity: an introduction*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Geneland development group (2012) *Population genetic and morphometric data analysis using R and the Geneland program*.
- Grosjean M, Geyh M, Messerli B, Schotterer U (1995) Late-glacial and early Holocene lake sediments, ground-water formation and climate in the Atacama Altiplano 22–24°S. *Journal of Paleolimnology*, **14**, 241–252.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 712–715.
- Guillot G, Santos F, Estoup A (2008) Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **24**, 1406–7.
- Guo Q, Liu Y (2010) ModEco : Integrated Software for Species Distribution Analysis and Modeling.

- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Henning W (1968) *Elementos de una sistemática filogenética*. Eudeba, Buenos Aires.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages , and their role , in divergence and speciation. , 247–276.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–13.
- Hewitt GM, Ibrahim KM (2001) Inferring glacial refugia and historical migrations with molecular phylogenies. In: *Integrating Ecology and Evolution in a Spatial Context* (eds Antonovics SJ, Antonovics J), pp. 271–294. Blackwells, Oxford.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965–1978.
- Hildreth W, Grunder A, Drake R (1988) The Loma Seca Tuff and The Calabozos Caldera: A major ash flow and caldera complex in the southern Andes of central Chile. *Geological Society of America Bulletin*, **95**, 45–54.
- Hinojosa F, Villagrán C (1997) Historia de los bosques del sur de Sudamérica: Antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural*, **70**, 225–239.
- Ho SYW, Shapiro B (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular ecology resources*, **11**, 423–34.
- Hollin JT, Schilling DH (1981) Late Wisconsin – Weichselian mountain glaciers and small ice caps. In: *The last great ice sheets* , pp. 176–206. Wiley, New York.
- Holsinger KE (2008) Analysis of mismatch distributions. 1–7.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, **17**, 754–755.
- Jowett T (1986) Preparation of nucleic acids. In: *Drosophila: A Practical Approach* (ed Roberts D), pp. 275–286. IRL Press, Oxford.
- Kembel S (2010) An introduction to the picante package Installing picante Data formats in picante. , 1–16.
- Kull C, Grosjean M, Veit H (2002) Modeling modern and late pleistocene glacio-climatological conditions in the north chilean andes (29–30 ° s). *Climate Change*, **52**, 359–381.
- Lobo JM, Jiménez-Valverde A, Real R (2008) AUC: a misleading measure of the performance of predictive distribution models. *Global Ecology and Biogeography*, **17**, 145–151.

- Marchelli P, Gallo L (2006) Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conservation Genetics*, **7**, 591–603.
- Marin JC, Spotorno AE, Gonzalez BA *et al.* (2008) Mitochondrial DNA variation and systematics of the Guanaco (*Lama Guanicoe*, Artiodactyla: Camelidae). *Journal of Mammalogy*. *Journal of Mammalogy*, **89**, 269–281.
- McNeely JA, Miller KR, Reid W V, Mittermeier RA, Werner TB (1990) Conserving the World's Biological Diversity. In: *Greening the World Economy*. , pp. 1–193. IUCN.
- Monsen KJ, Blouin MS (2003) Genetic structure in a montane ranid frog: restricted gene flow and nuclear-mitochondrial discordance. *Molecular Ecology*, **12**, 3275–3286.
- Nuñez JJ, Wood NK, Rabanal FE, Fontanella FM, Sites JW (2011) Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, **58**, 343–52.
- Peña C (2011) Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, **18**, 265–267.
- Petit J, Aguinalalde I, Beaulieu J De *et al.* (2003) Glacial Refugia : Hotspots but Not. , **300**, 1563–1565.
- Phillips S, Anderson R, Schapire R (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**, 231–259.
- Phillips SJ, Avenue P, Park F (2004) A Maximum Entropy Approach to Species Distribution Modeling. , 655–662.
- Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with Maxent : new extensions and a comprehensive evaluation. , 161–175.
- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, **25**, 1253–6.
- Purvis a, Hector a (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature*, **405**, 212–9.
- R Development Core Team (2008) R: A language and enviroment for statistical computing.
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4.
- Rech JA, Quade J, Betancourt JL (2002) Late Quaternary paleohydrology of the central Atacama Desert. *Geological Society of America Bulletin*, 334–348.
- Reid W (1998) Biodiversity hotspots. *Trends in Ecology & Evolution*, **275-280**, 275–280.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574.

- Segovia R, Pérez MF, Hinojosa LF (2012) Genetic evidence for glacial refugia of the temperate tree *Eucryphia cordifolia* (Cunoniaceae) in southern South America. *American journal of botany*, **99**, 121–129.
- Sérsic AN, Cosacov A, Cocucci A a. *et al.* (2011) Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**, 475–494.
- Shafer AB a, Côté SD, Coltman DW (2011) Hot spots of genetic diversity descended from multiple Pleistocene refugia in an alpine ungulate. *Evolution; international journal of organic evolution*, **65**, 125–38.
- Shaffer HB, Fellers GM, Voss SR, Oliver JC, Pauly GB (2004) Species boundaries, phylogeography and conservation genetics of the red-legged frog (*Rana aurora/draytonii*) complex. *Molecular ecology*, **13**, 2667–77.
- Solbrig O (1976) The Origin and floristic affinities of the South American temperate desert and semidesert. In: *Evolution of Desert Biota* (ed Goodall DW), pp. 7–49. University Texas Press, Austin.
- Souza Muñoz ME, Giovanni R, Siqueira MF *et al.* (2009) openModeller: a generic approach to species' potential distribution modelling. *Geoinformatica*, **15**, 111–135.
- Taberlet P, Cheddadi R (2002) Ecology. Quaternary refugia and persistence of biodiversity. *Science (New York, N.Y.)*, **297**, 2009–10.
- Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876–4882.
- Tormey D, Frey F, López L (1989) Geologic history of the active Azufre-Planchon-Peteroa volcanic center (35° 15'S, Southern Andes), with implications for the development of compositional gaps. *Asociación Geológica Argentina*, **XLIV**, 420–430.
- Vera-Escalona I, D'Elía G, Gouin N *et al.* (2012) Lizards on ice: evidence for multiple refugia in *Liolaemus pictus* (Liolaemidae) during the last glacial maximum in the Southern Andean beech forests. *PloS one*, **7**, e48358.
- Vianna J a, Medina-Vogel G, Chehébar C *et al.* (2011) Phylogeography of the Patagonian otter *Lontra provocax*: adaptive divergence to marine habitat or signature of southern glacial refugia? *BMC evolutionary biology*, **11**, 53.
- Victoriano PF, Ortiz JC, Benavides E, Adams BJ, Sites JW (2008) Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from the central-southern Andean range. *Molecular ecology*, **17**, 2397–416.
- Villagrán C (1991) Historia de los bosques templados del sur de Chile durante el Tardiglacial y Postglacial. *Revista Chilena de Historia Natural*, **64**, 447–460.

- Villagrán C (2001) Un modelo de la historia de la vegetación de la Cordillera de La Costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Revista Chilena de Historia Natural*, **74**, 793–803.
- Villagrán C, Hinojosa LF (2005) ESQUEMA BIOGEOGRÁFICO DE CHILE. In: *Regionalización Biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines* (eds Llorente Bousquets J, Morrone JJ), pp. 551–577. Jiménez Editores, México.
- Villagrán C, Le-Quesne C, Aravena JC, Jimenez H, Hinojosa LF (1998) El rol de los cambios de clima del Cuaternario en la distribución actual de la vegetación de Chile central-sur. *Bamberger Geographische Schriften*, **15**, 227–242.
- Warren DL, Glor RE, Turelli M (2010) ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*, **01**, 607–611.
- Zeisset I, Beebee TJC (2008) Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, **101**, 109–19.

Anexo 1. Valor de correlación (r) entre las distintas variables bioclimáticas disponibles en WORLDCLIM (<http://www.worldclim.org/>). Bio 1: Temperatura anual promedio; Bio 2: Rango diurno promedio; Bio 3: Isotermalidad; Bio 4: Estacionalidad de la temperatura; Bio 5: Temperatura máxima del mes más cálido; Bio 6: Temperatura mínima del mes más frío; Bio 7: Rango anual de temperatura; Bio 8: Temperatura promedio del trimestre más húmedo; Bio 9: Temperatura promedio del trimestre más seco; Bio 10: Temperatura promedio del trimestre más cálido; Bio 11: Temperatura promedio del trimestre más frío; Bio 12: Precipitación anual; Bio 13: Precipitación del mes más húmedo; Bio 14: Precipitación del mes más seco; Bio 15: Estacionalidad de la precipitación; Bio 16: Precipitación del trimestre más húmedo; Bio 17: Precipitación del trimestre más seco; Bio 18: Precipitación del trimestre más cálido; Bio 19: Precipitación del trimestre más frío.

	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Bio 5	Bio 6	Bio 7	Bio 8	Bio 9	Bio 10	Bio 11	Bio 12	Bio 13	Bio 14	Bio 15	Bio 16	Bio 17	Bio 18	Bio 19
Bio 1	0,872	0,957	0,449	0,98	0,932	0,78	0,992	0,988	0,992	0,988	0,865	0,902	0,551	0,804	0,899	0,589	0,796	0,661
Bio 2	-	0,925	0,736	0,944	0,642	0,971	0,883	0,836	0,913	0,801	0,696	0,74	0,428	0,882	0,736	0,459	0,723	0,469
Bio 3	-	-	0,496	0,963	0,845	0,827	0,944	0,952	0,958	0,933	0,862	0,892	0,588	0,846	0,888	0,623	0,803	0,672
Bio 4	-	-	-	0,61	0,13	0,873	0,489	0,386	0,56	0,307	0,251	0,252	0,225	0,516	0,246	0,233	0,368	0,129
Bio 5	-	-	-	-	0,845	0,888	0,979	0,957	0,996	0,939	0,822	0,858	0,526	0,839	0,854	0,563	0,781	0,612
Bio 6	-	-	-	-	-	0,503	0,905	0,946	0,884	0,972	0,864	0,892	0,56	0,632	0,89	0,598	0,719	0,72
Bio 7	-	-	-	-	-	-	0,802	0,731	0,848	0,68	0,583	0,618	0,368	0,811	0,613	0,394	0,642	0,369
Bio 8	-	-	-	-	-	-	-	0,962	0,989	0,972	0,841	0,877	0,536	0,808	0,873	0,573	0,802	0,621
Bio 9	-	-	-	-	-	-	-	-	0,972	0,986	0,877	0,913	0,56	0,782	0,911	0,599	0,77	0,699
Bio 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,96	0,839	0,873	0,545	0,817	0,869	0,581	0,789	0,635
Bio 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,88	0,918	0,55	0,765	0,916	0,589	0,783	0,685
Bio 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,971	0,792	0,58	0,975	0,828	0,878	0,843
Bio 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,65	0,696	0,998	0,691	0,837	0,808
Bio 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,189	0,657	0,994	0,749	0,716
Bio 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,686	0,222	0,569	0,388
Bio 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,697	0,841	0,811
Bio 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,773	0,748
Bio 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,582

Anexo 2. Variables bioclimáticas utilizadas para los modelos de distribución. La columna Colinealidad muestra aquellas variables que se encontraron correlacionas ($r > 0,95$) con la variable de la columna Código. La columna Modelos muestra si la variable en cuestión fue, o no, utilizada en la ejecución de los modelos bioclimáticos.

Código	Variable	Colinealidad ($r > 0,95$)	Modelos
Bio 1	Temperatura anual promedio	Bio 3, Bio 5, Bio 8, Bio 9, Bio 10, Bio 11	Si
Bio 2	Rango diurno promedio	Bio 7	Si
Bio 3	Isotermalidad	Bio 1, Bio 5, Bio 9, Bio 10	No
Bio 4	Estacionalidad de la emperatura		Si
Bio 5	Temperatura máxima del mes más cálido	Bio 1, Bio 3, Bio 8, Bio 9, Bio 10	NO
Bio 6	Temperatura mínima del mes más frío	Bio 11	Si
Bio 7	Rango anual de temperatura	Bio 2,	No
Bio 8	Temperatura promedio del trimestre más húmedo	Bio 1, Bio 5,	No
Bio 9	Temperatura promedio del trimestre más seco	Bio 1, Bio 3, Bio 5, bio 8	No
Bio 10	Temperatura promedio del trimestre más cálido	Bio 1, Bio 3, Bio 5, Bio 8	No
Bio 11	Temperatura promedio del trimestre más frío	Bio 1, Bio 6, Bio 8	No
Bio 12	Precipitación anual	Bio 13, Bio 16	Si
Bio 13	Precipitación del mes más húmedo	Bio 12, Bio 16	No
Bio 14	Precipitación del mes más seco	Bio 17	Si
Bio 15	Estacionalidad de la precipitación		Si
Bio 16	Precipitación del trimestre más húmedo	Bio 12, Bio 13	No
Bio 17	Precipitación del trimestre más seco	Bio 14	No
Bio 18	Precipitación del trimestre más cálido		Si
Bio 19	Precipitación del trimestre más frío		Si

