

3.3.- Resultados

3.3.1.- Interpretación de los patrones electroforéticos

Los patrones electroforéticos obtenidos para cada uno de los 36 presuntos loci codificadores de los 24 sistemas enzimáticos analizados se describen someramente a continuación. En la denominación de cada sistema enzimático se ha seguido predominantemente a Murphy et al. (1990). Junto al nombre de cada sistema enzimático se indica el número correspondiente al catálogo de la Comisión de Nomenclatura Enzimática (EC). Como ya se indicó anteriormente se estudiaron 36 loci en las poblaciones de *A. cisternasii* de Madrid, en las de *Alytes* sp. de las Sierras Béticas de Málaga y Albacete, en las de *A. obstetricans* de Barcelona, Castellón, Navarra y Pontevedra; 32 loci además de las anteriores en las de *A. obstetricans* de Jublains (Francia) y Asturias, en las de *A. cisternasii* de Portugal y en la de *Alytes muletensis*; 16 en las de *A. obstetricans* de Huesca y Madrid; y adicionalmente se analizaron además amplias series de ejemplares para Ldh, Mdh, Est y G3pdh procedentes de diversas localidades.

Aspartato aminotransferasa (Aat) (EC 2.6.1.1.)

Dos loci presumiblemente codificadores de esta enzima localizados en extractos de hígado - corazón. La estructura de las moléculas resultantes es dimérica.

Aat-1: se detectaron 4 electromorfos, con frecuencias variables según las poblaciones. No se presenta ningún alelo marcador para las poblaciones estudiadas aunque si existe un alelo exclusivo de *A. cisternasii* (84.38 %) y otro únicamente compartido por *A. cisternasii* (15.62 %), *Alytes muletensis* (100 %) y *Alytes* sp. de las Sierras Béticas de Málaga (40 %). La población de Barcelona muestra un alelo exclusivo aunque en muy baja frecuencia (10 %).

Aat-2: se detectaron dos electromorfos fijados alternativamente en las poblaciones estudiadas. Uno compartido por *A. cisternasii* y las poblaciones de *Alytes* sp. de las Sierras Béticas de Málaga y Albacete y el otro por *Alytes muletensis* y las restantes poblaciones.

Catalasa (Cat) (EC 1.11.1.16.)

Un único locus monomórfico en las poblaciones analizadas, activo en extractos de hígado y corazón.

Creatín quinasa (Ck) (EC 2.7.3.2.)

En las poblaciones analizadas se muestran dos presuntos loci con actividad enzimática asignable a esta proteína, ambas en los extractos musculares. La estructura de ambas moléculas es dimérica.

Ck-1: presenta dos variantes alélicas una de ellas fijada en las poblaciones de *A. cisternasii* y *Alytes muletensis* y la otra en el resto de las poblaciones.

Ck-2: resultó monomórfico en todas las poblaciones estudiadas.

Esterasas (Est) (EC 3.1.1.1.)

Se analizaron dos loci presuntamente codificadores de estas proteínas, uno de ellos altamente polimórfico. Ambos se obtuvieron en el análisis conjunto de muestras de hígado y corazón, si bien en los análisis de estos tejidos por separado parecen localizarse en uno u otro respectivamente.

Est-1: muy polimórfico en algunas de las poblaciones estudiadas, con 6 variantes alélicas detectadas. En las poblaciones de Barcelona y Navarra se llegaron a encontrar tres variantes alélicas. Las poblaciones de *A. cisternasii*, *Alytes muletensis* y Barcelona presentaron alelos exclusivos.

Est-2: se detectaron dos electromorfos, aunque aquí uno de ellos es exclusivo de *A. cisternasii* y el otro compartido por las demás poblaciones.

Formaldehído deshidrogenasa (Fdh) (EC 1.2.1.1.)

Un único locus aparente, analizado en extractos de hígado-corazón. No se incluye en los análisis posteriores al no obtenerse resultados para *Alytes muletensis*.

Tres variantes alélicas, una al parecer exclusiva de *A. cisternasii* y el resto compartido por las demás poblaciones en frecuencias variables.

Fosfatasa ácida (Acp) (EC 3.1.3.2.)

Codificada por dos presuntos loci polimórficos. Las moléculas resultantes muestran una estructura dimérica. Los resultados se obtuvieron en extractos de músculo o de hígado.

Acp-1: dos electromorfos con frecuencias variables en las distintas poblaciones.

Acp-2: cuatro electromorfos detectados, uno de ellos fijado con carácter exclusivo en *Alytes muletensis* y las poblaciones de *Alytes* sp. de las Sierras Béticas de Granada y Albacete. Los otros tres muestran frecuencias variables en las distintas poblaciones, aunque Acp-2 c aparece exclusivamente en la población de Castellón, si bien en baja frecuencia.

Fosfoglucomutasa (Pgm) (EC 5.4.2.2.)

Dos presuntos loci codificadores de esta enzima de estructura monomérica. Los resultados se obtuvieron en extractos de hígado - corazón.

Pgm-1: dos variantes alélicas fijadas respectivamente en *A. cisternasii* y en el resto de las poblaciones. Como en los casos anteriormente citados resulta marcador para las poblaciones de *A. cisternasii*.

Pgm-2: no se detectó variabilidad en ninguna de las poblaciones.

Fosfogluconato deshidrogenasa (Pgdh) (EC 1.1.1.44.)

También denominada 6-Pgd. Aparentemente codificada por un único locus. La estructura de las moléculas enzimáticas, detectadas en los extractos de hígado - corazón, es dimérica.

Se han detectado tres variantes alélicas, dos de ellas únicamente presentes en las poblaciones de *Alytes* sp. de las Sierras Béticas de Granada, Albacete y en *Alytes muletensis*. En cuanto a la tercera se extiende en homocigosis por el resto de las poblaciones incluidas las de *A. cisternasii*, y en heterocigosis en un individuo de Granada. En la figura 5 se señala la distribución geográfica de las diferentes frecuencias alélicas obtenidas para este locus.

Figura 5. Mapa de la distribución geográfica de las diferentes frecuencias alélicas obtenidas para el sistema enzimático fosfogluconato deshidrogenasa (Pgdh). 1 = *Alytes cisternasii*; 2 = *Alytes muletensis*.

Glicerol - 3 - fosfato deshidrogenasa (G3pdh) (EC 1.1.1.8.)

Codificado aparentemente por un único locus polimórfico. Estructura enzimática dimérica. Resultados obtenidos en extractos de hígado - corazón.

Se detectaron tres electromorfos, uno de ellos exclusivo y marcador de la población de Barcelona y otro al parecer exclusivo de las poblaciones de *Alytes muletensis*, y en las de *Alytes* sp. de las Sierras Béticas. El tercero únicamente presente en las demás poblaciones.

Guanina desaminasa (Gda) (EC 3.5.4.3)

En las poblaciones analizadas se observó un único locus monomórfico.

Glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa (G6pdh) (EC 1.1.1.49.)

Codificada aparentemente por un único locus. No se han detectado variantes alélicas en las muestras de hígado-

corazón analizadas.

Glucosa - 6 - fosfato isomerasa (Gpi) (EC 5.3.1.9.)

Codificada aparentemente por un único locus. Las moléculas resultantes muestran una estructura dimérica y fueron detectadas en extractos de hígado - corazón y músculo.

Los dos electromorfos detectados son compartidos en distintas frecuencias por la mayor parte de las poblaciones, destacándose la existencia de frecuencias alternativas en las poblaciones de Barcelona y Castellón.

Glutamato deshidrogenasa (Gtdh) (EC 1.4.1.2.)

Aparentemente codificada por un único locus. En las muestras analizadas se muestra monomórfica. Actividad detectada en extractos de hígado-corazón.

Isocitrato deshidrogenasa (Idh) (EC 1.1.1.42)

Dos presuntos loci codificadores de esta proteína. La actividad de sus moléculas, de estructura aparentemente dimérica, ha sido observada en extractos de hígado - corazón.

Idh-1: cuatro productos alélicos, presentes en distintas frecuencias, uno de ellos exclusivo de las poblaciones de *A. cisternasii*. El resto compartido por varias poblaciones, incluyendo *A. cisternasii*. En la figura 6 se señala de distribución geográfica de las diferentes frecuencias alélicas obtenidas para este locus.

Figura 6. *Mapa de la distribución geográfica de las diferentes frecuencias alélicas obtenidas para el sistema enzimático isocitrato deshidrogenasa (Idh). 1 = Alytes cisternasii, 2 = Alytes muletensis.*

Idh-2: dos electromorfos detectados, uno de ellos extendido por todas las poblaciones y el otro aparece con baja frecuencia (25 %) en la población de Granada.

Leucín aminopeptidasa (Lap) (EC 3.4.11.-.)

Un único locus codificador de esta enzima. En los extractos de hígado - corazón no se han observado variantes alélicas en ninguna de las poblaciones analizadas.

Peptidasas: Leucil glicil glicina (Lgg) (EC 3.4.-.-.)

Un único locus codificador de este enzima. No se han detectado individuos heterocigóticos entre las tres variantes alélicas detectadas en los extractos de estómago.

Una de los alelomorfos es exclusivo y marcador de las poblaciones de *A. cisternasii*, y otro de las de Pontevedra.

L- Lactato deshidrogenasa (Ldh) (EC 1.1.1.27.)

Dos posibles loci codificadores de esta enzima. Las isoenzimas resultantes se mostraron activas en los extractos de hígado y corazón, apareciendo su actividad dominante de forma alternativa en cada uno de estos tejidos. La estructura de las moléculas es tetramérica.

Ldh-1: Cuatro electromorfos, dos de ellos exclusivos y con carácter diagnóstico para *A. cisternasii*. De los otros dos uno está ampliamente extendido por todas las demás poblaciones y el otro ha aparecido de forma puntual, en heterocigosis, en la población de Avila.

Ldh-2: Dos variantes alélicas, una de ellas exclusiva y marcadora para *A. cisternasii*.

Malato deshidrogenasa (Mdh) (EC 1.1.1.37.)

A diferencia de lo descrito en publicaciones anteriores (Arntzen & Szymura 1984) en nuestros extractos únicamente se pudo detectar el resultado de la actividad de un único locus, presumiblemente correspondiente al designado como Mdh-2 por estos autores. La estructura de la molécula resultante es aparentemente dimérica.

De los cinco electromorfos detectados, dos de ellos son exclusivos y de carácter diagnóstico para *A. cisternasii*. El resto aparece en distintas frecuencias en determinadas poblaciones, destacándose la presencia de uno de los electromorfos compartido por las poblaciones de Barcelona, Huesca y Guadalajara. En la figura 7 se indica la distribución geográfica de las frecuencias de las diferentes variantes alélicas.

Figura 7. Mapa de la distribución geográfica de las diferentes frecuencias alélicas obtenidas para el sistema enzimático malato deshidrogenasa (*Mdh*). 1 = *Alytes cisternasii*, 2 = *Alytes muletensis*.

Malato deshidrogenasa NADP dependiente (*Mdhp*) (EC 1.1.1.40.)

Codificada aparentemente por dos loci polimórficos. Su estructura molecular es tetramérica. Habitualmente conocida por ME. Los resultados se obtuvieron en extractos de hígado - corazón.

Mdhp-1: desde el punto de vista de su utilización como marcador genético resulta de especial interés al presentar 4 electromorfos exclusivos y fijados respectivamente en las poblaciones de *A. cisternasii*, *A. muletensis*, *Alytes* sp. de las Sierras Béticas y en el resto de las poblaciones.

Mdhp-2: cuatro variantes alélicas detectadas con frecuencias variables en las distintas poblaciones. En las poblaciones de *A. cisternasii* se encuentran tres de los electromorfos, faltando únicamente uno exclusivo de *Alytes muletensis*, que puede considerarse diagnóstico para esta especie. En la figura 8 se señala de distribución geográfica de las diferentes frecuencias alélicas obtenidas para este locus.

Figura 8. Mapa de la distribución geográfica de las diferentes frecuencias alélicas obtenidas para el sistema enzimático malato deshidrogenasa NADP dependiente (*Mdhp*). 1 = *Alytes cisternasii*; 2 = *Alytes muletensis*.

Manosa - 6 - fosfato isomerasa (*Mpi*) (EC 5.3.1.8.)

Dos loci polimórficos presumiblemente correspondientes a esta enzima, detectados en extractos conjuntos de hígado y corazón. La estructura de las moléculas correspondientes a ambos loci es aparentemente monomérica.

Mpi-1: Se detectaron 5 electromorfos, todos ellos presentes en más de una población sin que puedan ser considerados marcadores en ningún caso. Sin embargo la distribución de sus frecuencias resulta de especial interés y complicación. En la figura 9 se señala la distribución geográfica de las diferentes frecuencias alélicas obtenidas para este locus.

Figura 9. Mapa de la distribución geográfica de las diferentes frecuencias alélicas obtenidas para el sistema enzimático manosa 6 fosfato isomerasa (*Mpi*). 1 = *Alytes cisternasii*; 2 = *Alytes muletensis*.

Mpi-2: Dos variantes alélicas, una de ellas presente en todas las poblaciones y la otra exclusiva de *Alytes muletensis* (70 %).

Dihidropoliámidá deshidrogenasa (*Ddh*) (EC 1.8.1.4.)

Codificada aparentemente por dos loci. No se incluye en los análisis posteriores al no obtenerse resultados para *Alytes muletensis*.

Ddh-1: presenta cinco electromorfos en las poblaciones estudiadas, uno de ellos al parecer con carácter diagnóstico para las poblaciones de *A. cisternasii* y otro para la de Barcelona.

Ddh-2: monomórfico en las poblaciones estudiadas.

Piruvato kinasa (*Pk*) (EC 2.7.1.40.)

Un único locus presumiblemente codificador de esta enzima. La estructura de la molécula es aparentemente tetramérica. Actividad observada en extractos musculares.

De los tres electromorfos detectados uno de ellos es exclusivo de las poblaciones de *Alytes muletensis*, Granada y Albacete.

Sorbitol deshidrogenasa (Sdh) (EC 1.1.1.14.)

Dos loci aparentemente codificadores de esta enzima, localizados en extractos de hígado - corazón.

Sdh-1: tres alelomorfos presentes en distintas frecuencias en varias de las poblaciones, estando los tres presentes en *A. cisternasii*.

Sdh-2: también tres electromorfos, dos de ellos presentes en *A. cisternasii* (uno exclusivo de esta especie) y el tercero presente únicamente en la población de Granada en baja frecuencia (20 %).

Superóxido dismutasa (Sod) (EC 1.15.1.1.)

Presumiblemente codificada por dos loci. La estructura de las moléculas resultantes es dimérica (en el caso de la de actividad citosólica) y tetramérica (en la de actividad mitocondrial).

Sod-1: tres variantes alélicas, una de ellas exclusiva de las poblaciones de *A. o. obstetricans* (de Francia y Alemania) y otra de las de *A. cisternasii*, pudiendo ser consideradas ambas como marcadores.

Sod-2: monomórfico en todas las poblaciones.

3.3.2.- Estimación de parámetros de variabilidad genética

El grado de polimorfismo en los diferentes loci examinados es muy variable, tanto a nivel general, como al efectuar comparaciones entre poblaciones. Así se han registrado desde loci monomórficos para todas las poblaciones (por ejemplo G6pdh, Cat, Gda, Lap), hasta loci con seis variantes alélicas para el conjunto de las poblaciones (Est-1).

Un porcentaje elevado de las frecuencias genotípicas observadas no se ajustan a las esperadas según la ley de Hardy-Weinberg, como podía suponerse dado el reducido tamaño de muestra y por lo tanto el reducido tamaño efectivo genotípico esperado. En cualquier caso la estrategia reproductiva del género *Alytes* y su autoecología, localizados en colonias aisladas en ambientes favorables con muy pocas posibilidades de flujo entre colonias, permitía pensar a priori en el incumplimiento de varios de los supuestos iniciales relativos a dicha ley.

El examen de las frecuencias alélicas permite apreciar la existencia de alelos diagnósticos para muchas de las poblaciones examinadas. En la tabla IV se muestran los resultados de estas comparaciones, destacándose algunos resultados como la existencia de al menos 6 loci diagnósticos de las poblaciones de las Sierras Béticas (Málaga y Albacete) respecto al resto de las poblaciones de *A. obstetricans* y otros 6 respecto a *Alytes muletensis*.

Tabla IV

	A.c.	A.m.	AB	GR	BR	CS	FR	NA	AS	PO
<i>A. Cisternasii</i>	--									
<i>A. Muletensis</i>	18	--								
Albacete	17	7	--							
Málaga - Granada	15	6	0	--						
Barcelona	18	11	9	8	--					
Castellón	16	10	8	7	4	--				
Jublains	14	10	7	6	5	3	--			
Navarra	16	11	8	7	3	1	1	--		
Asturias	14	11	8	7	2	3	1	1	--	
Pontevedra	15	12	9	8	4	3	2	2	2	--

La utilidad de estos alelos marcadores es manifiesta, tanto en el análisis de las zonas de contacto entre poblaciones como en la asignación de los individuos a un taxon concreto, especialmente en aquellos casos en los que la

morfología no presenta caracteres apropiados suficientes (Ayala & Powell 1972).

El número medio de alelos por locus varía desde 1.06 en las poblaciones de Asturias y Navarra, hasta 1.42 en *Alytes cisternasii*.

3.3.3.- Estimación de la diferenciación genética poblacional

Para la estimación de la diferenciación genética poblacional se transformaron los datos de las frecuencias alélicas obtenidas en distancias genéticas. Como ya se comentó anteriormente la distancia seleccionada fue la distancia modificada de Nei (1978) DN, siguiendo a Hayasi et al. (1992) ya que muestra propiedades matemáticas particulares y además ha sido ampliamente utilizada en la literatura, por lo que los resultados aquí obtenidos pueden ser comparados con los obtenidos por otros autores. En el análisis efectuado para 16 loci se utilizó la distancia estándar de Nei (1972) dado el bajo número de loci examinados (Pasteur 1985).

Los resultados obtenidos para el análisis de 32 loci se muestran en la tabla V. En la matriz presentada se señalan las distancias de Nei modificada (1978) y los comentarios que siguen se basan en dicha distancia. En cualquier caso el examen de la distancias de Rogers (1972) DR incluyendo la modificación propuesta por Wright (1978), o las de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) muestran resultados similares.

Tabla V

población	AcMD	AcBJ	AcAL	Am	GR	AB	BR	CS	FR	NA	AS	PO
AcMD	****	0.15	0.17	0.80	0.74	0.74	0.72	0.68	0.70	0.69	0.71	0.67
AcBJ	0.02	****	0.14	0.78	0.74	0.75	0.71	0.68	0.71	0.69	0.74	0.67
AcAL	0.02	0.01	****	0.77	0.73	0.73	0.70	0.67	0.68	0.69	0.68	0.67
Am	1.08	1.04	1.02	****	0.48	0.53	0.60	0.60	0.61	0.59	0.59	0.61
GR	0.84	0.88	0.83	0.28	****	0.13	0.49	0.51	0.53	0.52	0.52	0.52
AB	0.83	0.88	0.82	0.34	0.01	****	0.48	0.51	0.54	0.52	0.52	0.52
BR	0.78	0.77	0.75	0.48	0.29	0.28	****	0.33	0.44	0.37	0.38	0.38
CS	0.65	0.66	0.65	0.46	0.32	0.30	0.11	****	0.39	0.29	0.34	0.29
FR	0.71	0.76	0.66	0.49	0.35	0.36	0.22	0.17	****	0.28	0.23	0.35
NA	0.67	0.70	0.69	0.44	0.33	0.33	0.15	0.08	0.08	****	0.18	0.22
AS	0.73	0.75	0.66	0.44	0.33	0.33	0.16	0.12	0.05	0.03	****	0.28
PO	0.62	0.65	0.64	0.50	0.34	0.32	0.16	0.09	0.14	0.05	0.08	****

Las distancias obtenidas varían desde un valor máximo de DN = 1.076 entre la población de *A. cisternasii* de Madrid y la población de *Alytes muletensis*, hasta un valor mínimo de DN = 0.012 entre las poblaciones de Sierra Tejada y Alcaraz.

Las distancias a nivel específico se sitúan entre el valor máximo antes indicado hasta un valor mínimo de DN = 0.278 alcanzado entre *Alytes muletensis* y la población de *Alytes sp.* de las Sierras Béticas de Sierra Tejada.

3.3.4.- Análisis de agrupamiento

Para el análisis de agrupamiento se han utilizado las distancias de Nei y de Rogers; las aplicación de ambas se justifica en función de las distintas propiedades que presenta cada una de ellas. El agrupamiento se ha realizado mediante la aplicación del método UPGMA (Sneath & Sokal 1973).

Los resultados de la aplicación del método UPGMA se muestran en la figura 10 (resultados correspondientes al análisis de 32 loci). El índice de correlación cofenética de cada dendrograma es muy elevado (superior a 0.95 en todos los casos).

Figura 10. Resultado del análisis de agrupamiento UPGMA, basado en las distancias de Nei modificadas (1978), para 32 loci.

De acuerdo con los resultados obtenidos las poblaciones estudiadas se reúnen en dos grupos iniciales que divergen en el punto correspondiente a una $DN = 0.767$, constituidos por las poblaciones de *A. cisternasii* y las de *A. obstetricans* más *Alytes muletensis* y *Alytes* sp. de las Sierras Béticas, respectivamente. La gran divergencia de *A. cisternasii* respecto a las demás especies del género se pone de manifiesto en todos los casos.

El segundo grupo se escinde a su vez en el punto correspondiente a una $DN = 0.373$, agrupándose por un lado la mayor parte de las poblaciones de *A. obstetricans* y por otro la población de *Alytes muletensis* junto con las poblaciones de *Alytes* sp. de las Sierras Béticas de Sierra Tejeda y Alcaraz.

Los cuatro agrupamientos terminales con una distancia mínima intergrupala $DN > 0.3$, son:

- a) Grupo *A. cisternasii* con una distancia de unión al grupo más próximo $DN = 0.767$. Dentro del grupo es destacable la similitud genética entre las poblaciones que lo integran, con distancias inferiores a $DN < 0.023$.
- b) Grupo *A. obstetricans* con una distancia de unión al grupo más próximo $DN = 0.373$. Al contrario que el grupo anterior la heterogeneidad entre poblaciones es muy elevada existiendo variaciones comprendidas entre $DN = 0.032$ y $DN = 0.221$. Este grupo requerirá un detenido examen posterior.
- c) Grupo *Alytes muletensis* con una distancia de unión al grupo más próximo $DN = 0.307$. Al no haberse examinado nada más que una población, no podemos extraer otras consideraciones.
- d) Grupo Sierras Béticas (Tejeda y Alcaraz) con una distancia de unión al grupo más próximo de $DN = 0.307$. Su afinidad con el grupo *Alytes muletensis* es mayor que con cualquier otro grupo. La similitud genética entre las dos poblaciones examinadas dentro de este grupo es elevada ($DN = 0.012$), alcanzando valores similares a los que presentan las poblaciones del grupo *A. cisternasii*.