

3.2.- Material y método

Las técnicas de electroforesis en almidón han sido descritas con detalle en numerosas publicaciones, existiendo incluso manuales de uso práctico (ver por ejemplo Pasteur et al. 1987; Murphy et al. 1990), por lo que en las páginas que siguen únicamente se comentan aspectos particulares del trabajo realizado.

La obtención de los datos enzimáticos se efectuó en tres etapas, tratando de maximizar rendimientos. En la primera etapa se analizaron 32 presuntos loci en 12 poblaciones (incluyendo tres poblaciones de *A. cisternasii*, una de *Alytes muletensis*, dos de *Alytes* sp. de las Sierras Béticas, una de *A. o. obstetricans* y cinco poblaciones seleccionadas geográficamente correspondientes al grupo *A. o. boscai*). En la segunda etapa se analizaron 36 presuntos loci en siete poblaciones, tratando de resolver los problemas concretos de agrupamiento que surgieron en el análisis anterior y por último en la tercera fase se estudiaron 16 loci para 12 poblaciones, con objeto de delimitar las distribuciones geográficas de los grupos observados en la primera fase y comprobar la fiabilidad de los resultados allí obtenidos desde un punto de vista geográfico. De forma adicional se estudiaron los patrones de algunos sistemas (Mdh, Ldh, Est y G3pdh) en otras poblaciones con objeto de precisar su variabilidad en amplias zonas geográficas.

Figura 4 . Mapa con las poblaciones utilizadas en cada fase del análisis electroforético.

3.2.1. - Poblaciones examinadas

La procedencia y número de ejemplares examinados electroforéticamente se presenta en la tabla II. En esta tabla se señalan, además de los ejemplares capturados personalmente o enviados vivos por diferentes colegas (ver agradecimientos), las muestras enviadas por el Dr. J. W. Arntzen que ya habían sido previamente procesadas y que por lo tanto además de poder ser re-analizadas se utilizaron como controles para la interpretación de los zimogramas. Para la captura de los ejemplares se contó con las correspondientes autorizaciones de las Comunidades Autónomas (ver agradecimientos). Asimismo pudieron ser estudiados ejemplares procedentes del zoo de Jersey de *Alytes muletensis* obtenidos por el Dr. J. W. Arntzen con las correspondientes autorizaciones.

Tabla II

TAXA	LOCALIDAD		NÚMERO DE INDIVIDUOS
A. Cisternasii	Villanueva de la Cañada	Madrid	2
	Cuba, Beja	Estremadura (Portugal)	5
	Vianan do Alentejo	Alentejo (Portugal)	9
	Alburquerque	Badajoz	5
	Aliseda	Cáceres	3
	Río Arevalillo	Ávila	2
	Aldeaquemada	Jaén	1
A. Muletensis	Mallorca	(Zoo de Jersey, MNCN)	6
A. Obstreticans	Cuenca del Rhur	(Alemania)	4
	Sierra de Alcaraz	Albacete	19
	Picos de Europa	Asturias - León	10
	Venta del Obispo	Ávila	4
	Barcelona	Barcelona	6

Berga	Barcelona	18
Benicassim - Caudiel	Castellón	8
Algar de Palancia	Valencia	5
Ciruelas	Guadalajara	8
Piedrafita	Huesca	5
La Coruña	La Coruña	9
Rascafría	Madrid	8
Sierra Tejeda	Málaga - Granada	9
Jublains	Mayenne (Francia)	5
Ituren - Irati	Navarra	11
Tuy - Bayona	Pontevedra	7
Vinuesa	Soria	3

3.2.2. - Recogida y preparación de las muestras

Los ejemplares se transportaron vivos al laboratorio. Una vez allí fueron inmediatamente sacrificados o bien se mantuvieron en cautividad. El tiempo de permanencia en cautividad varió desde unos días hasta casi un año, con un promedio de 2 meses.

En el momento de la extracción de los tejidos, los ejemplares eran sumergidos en una dilución anestésica (MS 222), o bien sometidos a la acción de vapores de éter, hasta su inmovilidad. Tras un lavado en agua se procedió a su disección ventral. La sangre fue extraída con la ayuda de pipetas Pasteur heparinizadas, depositada en un tubo Eppendorf y centrifugada (7000 g durante 5 minutos). El sobrenadante era trasladado a otro tubo. Durante el transcurso de la centrifugación se extraían el hígado, el corazón, el estómago y tejido muscular de las extremidades posteriores, que se guardaban en tubos Eppendorf acompañados por un volumen de tampón de homogeneizado (TRIS-EDTA) similar al volumen de la muestra en cuestión. Los tubos Eppendorf convenientemente rotulados eran almacenados en botellas con nitrógeno líquido (a una temperatura de -170°) o en arcones congeladores (de -70° ó -20°) según las necesidades de uso. El resto del animal, bien se congelaba para una utilización posterior de sus tejidos o bien se preparaba para análisis osteológicos.

Los tejidos eran homogeneizados el día antes de su primera utilización. Tras la homogeneización se centrifugaban (11000 g, 25 minutos) y se extraía el volumen de sobrenadante que fuese a ser utilizado. El resto del centrifugado se guarda en botellas con nitrógeno líquido o en arcones congeladores.

3.2.3. - Preparación y revelado de los geles

Las electroforesis se realizaron en geles de almidón. Con motivo de homogeneizar los resultados, todos los geles se prepararon con almidón de fécula de patata hidrolizado (SIGMA).

El volumen de gel utilizado varió en función del tamaño de los moldes, en nuestro caso de 300 y 600 ml. El almidón hidrolizado (12 %) se diluye en el tampón adecuado para la migración de cada sistema enzimático. A continuación se calienta (en continua agitación) hasta que aumenta su viscosidad y entra en ebullición. En ese momento se somete a la acción de una bomba de vacío para extraer las burbujas de aire aprisionadas. Inmediatamente se vierte sobre el molde y se deja enfriar lentamente, conservándose hasta el momento de su utilización en una cámara refrigerada.

La aplicación de las muestras se efectuó mediante impregnación de fragmentos de papel Whatman nº3, de tamaño adecuado al gel. Los papeles se aplicaron, bien en un corte transversal del gel, bien mediante el uso de un peine específico. Las muestras se colocaron lo suficientemente separadas como para evitar contactos por difusión lateral, aunque tratando de optimizar el espacio disponible.

Los sistemas estudiados, los tampones utilizados y los tejidos en los que cada sistema mostró una adecuada

resolución se muestran en la tabla III.

Los procesos de coloración específica para cada sistema enzimático, que hemos utilizado sin apenas modificaciones, han sido descritos en Shaw & Prasad 1970; Brewer 1970; Ayala et al. 1972; Harris & Hopkinson 1976; Siciliano & Shaw 1976; Pasteur et al. 1987; Manchenko 1988; Murphy et al. 1990.

Tabla III.

Sistema enzimático	Símbolo	Nº ECC	Locus	Nº alelos	Tampón	Tejido
Aspartato aminotransferasa	Aat	EC 2.6.1.1	Aat - 1	4	LiOH, Tc8	H + C
			Aat - 2	2	LiOH, Tc8	H + C
Catalasa	Cat	EC 1.11.1.16.	Cat	1	LiOH	H + C
Creatín kinasa	Ck	EC 2.7.3.2.	Ck - 1	2	Tc 7	M
			Ck - 2	1	Tc 7	M
Dihidropoliámida deshidrogenasa	Ddh	EC 1.8.1.4.	Ddh - 1	5	Tc 8	H + C
			Ddh - 2	1	Tc 8	H + C
Esterasa	Est	EC 3.1.1.1	Est - 1	6	LiOH	H + C
			Est - 2	2	LiOH	H + C
Formaldehído deshidrogenasa	Fdh	EC 1.2.1.1	Fdh	3	Tc 8	H + C
Fosfatasa ácida	Acp	EC 3.1.3.2.	Acp - 1	2	Tc 6	M , H +C
			Acp - 2	4	Tc 6	M , H +C
Fosfoglucomutasa	Pgm	EC 5.4.2.2	Pgm - 1	2	Tc 6	H + C, M
			Pgm - 2	1	Tc 6	H + C, M
Fosfogluconato deshidrogenasa	Pgdh	EC 1.1.1.44.	Pgdh	3	Tc 8	H + C, M
Glicerol - 3- fosfato deshidrogenasa	G3pdh	EC 1.1.1.8.	G3pdh	3		H + C
Guanina desaminasa	Gda	EC 3.5.4.3.	Gda	1		
Glucosa - 6 -fosfato deshidrogenasa	G6pdh	EC 1.1.1.49.	G6pdh	1	Tc 8	H + C
Glucosa- 6 - fosfato isomerasa	Gpi	EC 5.3.1.9.	Gpi	2	Tc 6	H + C, M
Glutamato deshidrogenasa	Gtdh	EC 1.4.1.2	Gtdh	1		H + C
Isocitrato deshidrogenasa	Idh	EC 1.1.1.42	Idh - 1	4	Tc 8 , Tc 6	H + C, M
			Idh - 2	2	Tc 8 , Tc 6	H + C, M
Leucín aminopeptidasa	Lap	EC 3.4.11.-.	Lap	1	LiOH	H + C
L- Lactato deshidrogenasa	Ldh	EC 1.1.1.27.	Ldh - 1	4	Tc 7, Tc 6	H + C
			Ldh - 2	2	Tc 7, Tc 6	H + C
Malato deshidrogenasa	Mdh	EC 1.1.1.37.	Mdh	5	Tc 7	H + C
Malato deshidrogenasa NADP dependiente	Mdhp (Me)	EC 1.1.1.40.	Mdhp - 1	4	Tc8	H + C
			Mdhp -2	4	Tc8	H + C
Manosa - 6 -fosfato isomerasa	Mpi	EC 5.3.1.8.	Mpi - 1	5	Tc8	H + C
			Mpi - 2	2	Tc8	H + C
Peptidasa: Leucil-glicil-glicina	Pep Lgg	EC 3.4.-.-.	Lgg		LiOH	St

Piruvato kinasa	Pk	EC 2.7.1.40.	Pk	3	Tc 7	M
Sorbitol deshidrogenasa	Sdh	EC 1.1.1.14.	Sdh - 1	3	Tc 8	H + C
			Sdh - 2	3	Tc 8	H + C
Superóxido dismutasa	Sod	EC 1.15.1.1.	Sod - 1	3	Tc 8	H + C, M
			Sod - 2	1	Tc 8	H + C, M

Los patrones de bandas eran inmediatamente interpretados tras el revelado en los sistemas con coloraciones especialmente lábiles o que sufren rápidas transformaciones (Cat, Pk, Gpi por ejemplo) o bien se fijaban para su re-examen posterior.

3.2.4. - Interpretación de los patrones electroforéticos

Para una adecuada interpretación de los patrones observados es conveniente poseer alguna idea previa de la estructura molecular de cada sistema. En nuestro caso se obtuvieron datos previos de la estructura y composición en subunidades de cada sistema en obras generales (Harris & Hopkinson 1976; Pasteur et al. 1987; Murphy et al 1990) y en estudios específicos relativos a anfibios, especialmente al género *Alytes* (Arntzen & Szymura 1984; Rosa et al. 1990).

La designación de los loci y de los electromorfos (supuestas variaciones alélicas) se efectuó en orden alfabético comenzando por los de migración más anódica, de acuerdo con los trabajos previos de Arntzen & Szymura (1984) y las recomendaciones de Pasteur et al. (1987).

En todos los sistemas examinados se usaron controles internos, bien por repetición de muestras control a lo largo del gel, bien por inclusión de poblaciones ya analizadas. Adicionalmente se utilizaron como controles externos los extractos analizados previamente por Arntzen (datos no publicados), con excepción de los sistemas Fdh, Ddh y Gda.

3.2.5. - Análisis de los datos

El método de análisis seguido puede desglosarse en las siguientes etapas:

3.2.5.1. - Estimación de parámetros de variabilidad genética.

Los parámetros analizados son el número medio de alelos por locus (A) y la tasa de polimorfismo (P), que corresponde al porcentaje de loci polimórficos en cada población.

3.2.6. - Estimación del grado de diferenciación alcanzado entre poblaciones.

La transformación de los datos de frecuencias alélicas o genotípicas en distancias genéticas ha sido ampliamente utilizada, habiéndose propuesto numerosos métodos (ver por ejemplo Wright 1978). Sin embargo no todas estas transformaciones resultan igualmente apropiadas. Para estimar el grado de diferenciación alcanzado entre poblaciones utilizaremos únicamente la distancia de Nei (1972 1978), por ser la habitualmente empleada en la bibliografía y permitir por lo tanto efectuar comparaciones con otros grupos. En la metodología del capítulo quinto, se discute el uso de diversas distancias genéticas en los análisis filogenéticos, por lo que aquí únicamente se hacen algunos comentarios sobre la distancia de Nei

Distancia de Nei (DN): propuesta en dos versiones una, denominada estándar, para muestras amplias y otra modificada para tamaños reducidos de muestra (Nei 1972; 1978).

Esta distancia trata de medir el número de sustituciones por locus ocurrida tras la divergencia entre dos poblaciones. Esta aproximación sólo es válida si la tasa de sustitución génica por locus es uniforme para todos los loci y en todos los grupos, un supuesto que, como indica Hillis (1984), puede considerarse poco realista. Este mismo autor propone una modificación, de forma que en realidad está computando la media aritmética del conjunto de los loci analizados independientemente

3.2.7. - Análisis de agrupamiento de las poblaciones.

Las datos de distancias obtenidos en el apartado anterior pueden ser tratados mediante métodos de agrupamiento, que tratan de aproximarse al conocimiento de las relaciones entre las poblaciones estudiadas basándose en su grado de similitud. Es decir los agrupamientos son de tipo fenético y se basan únicamente en el grado de similitud o de divergencia entre poblaciones

Puesto que no podemos aceptar inicialmente como cierta una tasa constante de evolución en los sistemas enzimáticos estudiados ni en los organismos analizados, y que la evaluación de las metodologías efectuadas por diversos investigadores (Swofford 1981; Nei & Chesser 1983; Fiala & Sokal 1985) no resultan coincidentes, si bien todos ellos destacan la necesidad de emplear un número elevado de loci (mayor de 20), se prefirió la utilización de los métodos UPGMA aplicado a la distancia de Nei (1978). Los análisis se efectuaron mediante el uso del programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander 1981).