

Efecto de la radiación solar en la diversidad genética de *Rana temporaria* de alta montaña pirenaica.

Laura Caamaño Chinchilla¹ y Antonio Palanca Soler¹

¹ Fundación Laboratorio de Anatomía Animal

Resumen

En el presente trabajo, realizado sobre el terreno en el Pirineo aragonés, se relaciona la diversidad genética con la radiación solar en ocho poblaciones de *Rana temporaria* situadas a diferentes altitudes y con diferentes insolaciones debidas a la diferente geomorfología de las distintas áreas estudiadas. Obtenemos una clara correlación entre heterozigosidad y radiación solar.

Palabras clave: anfibios, heterozigosidad, insolación, radiación UV.

INTRODUCCIÓN

La rana común es el anfibio más extendido en Europa y se distribuye desde el norte de España hasta el norte de Escandinavia y desde el nivel del mar hasta los 2500 m s. n. m. en los Alpes (Gasc et al. 1997; Teacher et al., 2009) y entre los 1580 m s. n. m. y los 2747 m s. n. m. de altitud en Pirineos, en el borde sur de su distribución (Miramontes-Sequeiros et al., 2018). Se enfrenta a diferentes limitaciones ambientales en su amplio rango de distribución y es por lo tanto propensa a la adaptación local (Miaud & Merila 2001; Laugen et al. 2003). La movilidad relativamente baja de los anfibios unido a la depresión endogámica dentro de las poblaciones es una amenaza potencial para su supervivencia que se ve agravada por el impacto de las actividades humanas (Beebee 2005) pero no de todas, ya que la diversidad del paisaje, tanto natural como provocada por una gestión estratégica del medio, tiene un gran impacto positivo en la abundancia de ranas comunes, y por lo tanto también en sus diversidad genética y estructura genética de la población (Johansson et al., 2005) pero no así la fragmentación del hábitat (Johansson et al., 2007), así, en *Rana cascadae* existe una fuerte caída de intercambios entre lugares separados más de 10 km en ambientes montanos. Estos ambientes promueven un aislamiento genético inusualmente fuerte entre las poblaciones de ranas (Monsen, et al., 2004). Este aislamiento contrarresta uno de los principales mecanismos de defensa de las poblaciones frente al cambio climático, que es la mezcla de poblaciones a lo largo de gradientes de temperatura (Muir et al, 2013).

Los lagos de alta montaña pirenaica, donde viven nuestras poblaciones de rana común, son ecosistemas jóvenes muy similares a otros lagos de montaña de todo el planeta y la mayoría de ellos se originaron durante la última glaciación debido a la acción del hielo sobre rocas duras (Catalan et al, 2006).

La rana común se estableció posglacialmente y tiene dos linajes en Europa: uno occidental, que ocupa las islas británicas y la costa atlántica europea y otro oriental, que ocupa desde noruega hasta la costa oriental mediterránea francesa. Estos linajes se superponen en la vertiente española de los Pirineos (nuestra área de estudio). Gran Bretaña está colonizada por linaje occidental, con un probable origen en un refugio ibérico (Teacher et al., 2009; Muir et al., 2013).

Los renacuajos en los lagos de alta montaña, junto con otros organismos, están expuestos durante su fase activa a altas dosis de radiación ultravioleta (UVR) (Sommaruga, 2001), debido al aumento de esta radiación con la altitud, especialmente la parte más dañina, UV-B (Sommaruga & Psenner, 1997). Se conoce como radiación ultravioleta atmosférica (UV) a la radiación proveniente del sol y del cielo en las longitudes de onda entre 0.3 y 0.4 μm . La fracción de UV dentro del espectro de radiación global solar oscila entre 0 y 6 % dependiendo de la calidad y el espesor de atmósfera que deba atravesar (Castro, 1986). Las bandas UV-B y UV-A constituyen el 1.33% y 5.90% respectivamente de la radiación que llega a las altas capas de la atmósfera (Khogali & Al-Bar, 1992).

Aunque los renacuajos viven bajo el agua, estos lagos son altamente transparentes a UVR a causa del bajo contenido de carbono orgánico disuelto en la mayor parte de los humedales alpinos (Morris et al., 1995), así en Pirineos la profundidad media de atenuación del 1% de UV-B es de 8 m (Zhang et al., 2007).

Todos los organismos acuáticos son muy sensibles a los altos niveles de UVR y los efectos nocivos producidos por esta longitud de onda corta del espectro solar incluyen, entre otros, el daño al material genético (ADN), el aumento de las tasas de mortalidad y la inhibición de las tasas de crecimiento (Häder et al. 1995; Sommaruga et al. 1996). Como respuesta al UV-B, los renacuajos de *Ambystoma* (anfibio anuro) presentan cambios de actividad y de color (García et al., 2009). Los renacuajos de *Rana cascadae* no eligen aguas más profundas ni se esconden debajo de hojas cuando son expuestos a altos niveles de UV-B (Bancroft, 2010).

La duración de las exposiciones a UV-B varió de 3 a 15 min. Para las dosis más bajas y más altas, respectivamente. Niveles más altos de 2.460 Joule / m^2 (0,58794 Kcal/ m^2) durante 15 minutos ejercen una letalidad (> 30%) sobre los embriones de *Bufo arenarum* (anfibio anuro) a partir de las 24 horas post exposición (Herkovits, 2006).

Aunque es bien sabido que muchas especies de anfibios son difíciles de criar en cautiverio debido a una ausencia de UV-B y / o deficiencia de vitamina D3 en la dieta, los efectos perjudiciales de la exposición excesiva a UV-B es reconocido como un factor activo en la disminución de las poblaciones de anfibios (Antwis and Browne, 2009). No obstante los posibles impactos del cambio climático en áreas montañosas, considerando los complejos patrones topográficos, no muestran una respuesta común a las proyecciones de calentamiento global (Nogués-Bravo et al., 2007).

Weyrauch (2006), a fecha de hoy, ha estudiado la interacción entre la diversidad genética y la radiación UV-B en anuros, *Rana sylvatica*, pero esta investigación se realizó en un laboratorio. Observa que las poblaciones con baja diversidad genética experimentan mayor mortalidad de larvas cuando son expuestas a UV-B que las poblaciones con mayor diversidad genética.

MÉTODOS

Área de estudio

Recolectamos sesenta y un especímenes de *Rana temporaria* en ocho localidades del Alto Aragón (Pirineos, España) durante el verano de 1997 (**Fig. 1**): (1) between Oza and Aguas Tuertas, 42°51'N/0°40'W, 11 specimens; (2) Aguas Tuertas, 42°49'N/0°37'W, 8 specimens; (3) upper Canal Roya valley, 42°47'N/0°30'W, 8 specimens; (4) Pico de Anayet, 42°46'N/0°26'W, 3 specimens; (5) between Formigal and Portalet, 42°47'N/0°24'E, 2 specimens; (6) Respomuso, Circo de Piedrafita, 42°49' N/0°17'W, 8 specimens; (7) Ibones de la Facha, 42°48'N/0°15'W, 15 specimens; (8) Barranco Ordiso, Bujaruelo, 42°43'N/0°9'W, 6 specimens.

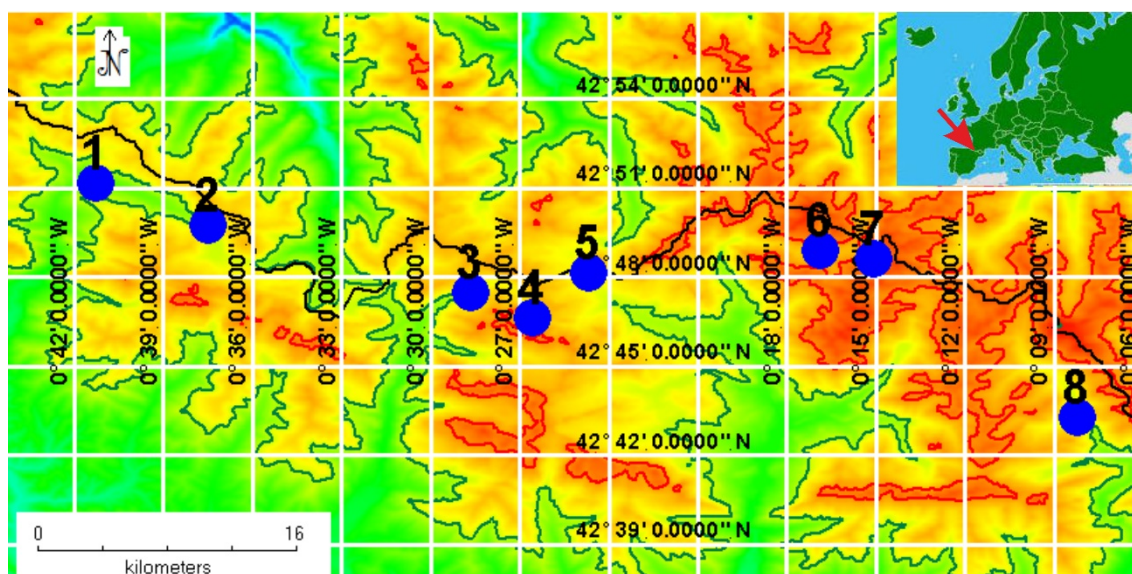


Figura 1.- Localidades del Alto Aragón (Pirineos, España) donde se Recolectaron sesenta y un especímenes de *Rana temporaria* durante el verano de 1997.

Electroforesis

24 loci fueron estudiados por medio de electroforesis de alozimas. Los métodos se especifican ampliamente en nuestra publicación (Veith et al, 2002) y se adjunta copia en **anexo 1**.

La diversidad genética de las poblaciones consideradas la medimos a través de la heterocigosidad esperada (H_e) y el polimorfismo (P).

La heterocigosidad esperada para una población es un índice de cuantificación que representa la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población y cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los loci (Hoelzel, 1998; Sosa et al., 2002). Nei (1987) asegura que el promedio de heterocigosidad o diversidad genética es el método de medición más adecuado de la variación genética.

El polimorfismo o la proporción de loci polimórficos (P) es una medida del número de loci variable en una población y se calcula dividiendo el número de loci polimórficos de ésta entre el número total de loci analizados (Sosa et al., 2002). Es necesario el uso de un criterio arbitrario a fin de precisar el polimorfismo de un locus de acuerdo a su frecuencia alélica; ya que, cuando se aumenta en número de individuos muestreados en una población, la probabilidad de encontrar un nuevo alelo también aumenta. Este criterio lo fijamos en un 95% (siendo la frecuencia del alelo más común menor o igual que 0,95).

Insolación

Si se considera cualquier superficie horizontal en el límite de la atmósfera, la irradiación I dependerá del valor de la constante solar (J), de la latitud (L), de la declinación del sol (D), del ángulo horario con respecto al sol (H), de la distancia media del sol a la tierra en el momento que se considere (R): $I = J [(\sin L \cdot \sin D) + (\cos L \cdot \cos D \cdot \cos H)] \cdot (R/r)^2$.

Suponiendo que no existiera atmósfera, la energía incidente por cm² a lo largo de un año sobre una superficie terrestre comprendida entre dos latitudes próximas dependería de las sucesivas posiciones relativas del sol respecto al área considerada. Este cálculo debe ser corregido al considerar las pendientes del terreno y el efecto pantalla que una pendiente puede hacer sobre otra en un momento determinado. No se ha tenido en cuenta la absorción del vapor de agua y nubes. No obstante los posibles errores en el cálculo absoluto de las Kcal/cm² por año, quedarían subsanados al considerar un área de estudio relativamente reducida y con altitudes no muy diferentes y considerar los valores como comparativos entre distintas localidades (Palanca et al., 1978).

Las tablas empleadas para este cálculo son las publicadas por Morgen (1957), para el paralelo 50 N y un extracto de las mismas las adjuntamos en el **anexo 2**.

En cada localidad muestreada (**Figura 1**) se trazaron dos perfiles mediante el software GlobalMapper GIS application (Company: DroneMapper), un perfil de N a S y otro de W a E. Mediante el software GeoGebra International GeoGebra Institute, Austria) se calcularon los ángulos del perfil con mayor pendiente en el punto de muestreo y su exposición (**Figura 2**). Consultando las tablas del **anexo 2** se calculó la insolación teórica de cada punto muestreado.

Proceso de datos

Utilizando el software SPSS (IBM corporation) se procesaron los datos obtenidos calculando las regresiones lineales posibles entre insolación y la diversidad genética de las poblaciones estimada mediante la heterocigosidad observada (H_o), esperada (H_e) y el polimorfismo (P). Se calculó el modelo y las estimaciones de los parámetros.

RESULTADOS

Obtenemos la **Tabla 1** donde se indica para cada localidad estudiada, la altitud, la Heterocigosidad observada (H_o), la heterocigosidad esperada (H_e), la proporción de loci polimórficos considerando la frecuencia del alelo más común menor o igual que 0,95 (P95), el ángulo de la exposición máxima de la pendiente y, en su caso, el sector liberado del efecto pantalla de las pendientes próximas (**Figura 2**) y finalmente la radiación solar teórica expresada en Kcal/cm² por año.

Los modelos de predicción de la diversidad genética a partir de la insolación teórica y las estimaciones de los parámetros se presentan en la **Tabla 2**. El gráfico de la regresión lineal correspondiente a la mejor predicción que es la de la heterocigosidad esperada se expone en la **Figura 3**.

Tabla 1. Variables de las localidades muestreadas: Altitud, Heterocigosidad observada (H_o), Heterocigosidad esperada (H_e), Proporción de loci polimórficos menor o igual al 95 % (P95), exposición de las pendientes y radiación solar teórica.

Sample locality	Altitud m. s. l.	Heterozygosity		P95	Exposition of slopes	Solar Radiation (Kcal/cm ² year)
		H_o	H_e			
1	1.286	0.113	0.132	0.333	15.13° N	94
2	1.604	0.112	0.115	0.292	10.12° N	105
3	1.634	0.072	0.086	0.250	15.96° S	149
4	2.226	0.069	0.091	0.167	0°	122
5	1.822	0.042	0.056	0.083	20.38° S	156
6	2.132	0.068	0.092	0.250	0°	122
7	2.412	0.129	0.145	0.375	14.92° E; sector SE-NNE	40
8	1.608	0.087	0.092	0.292	0°	122

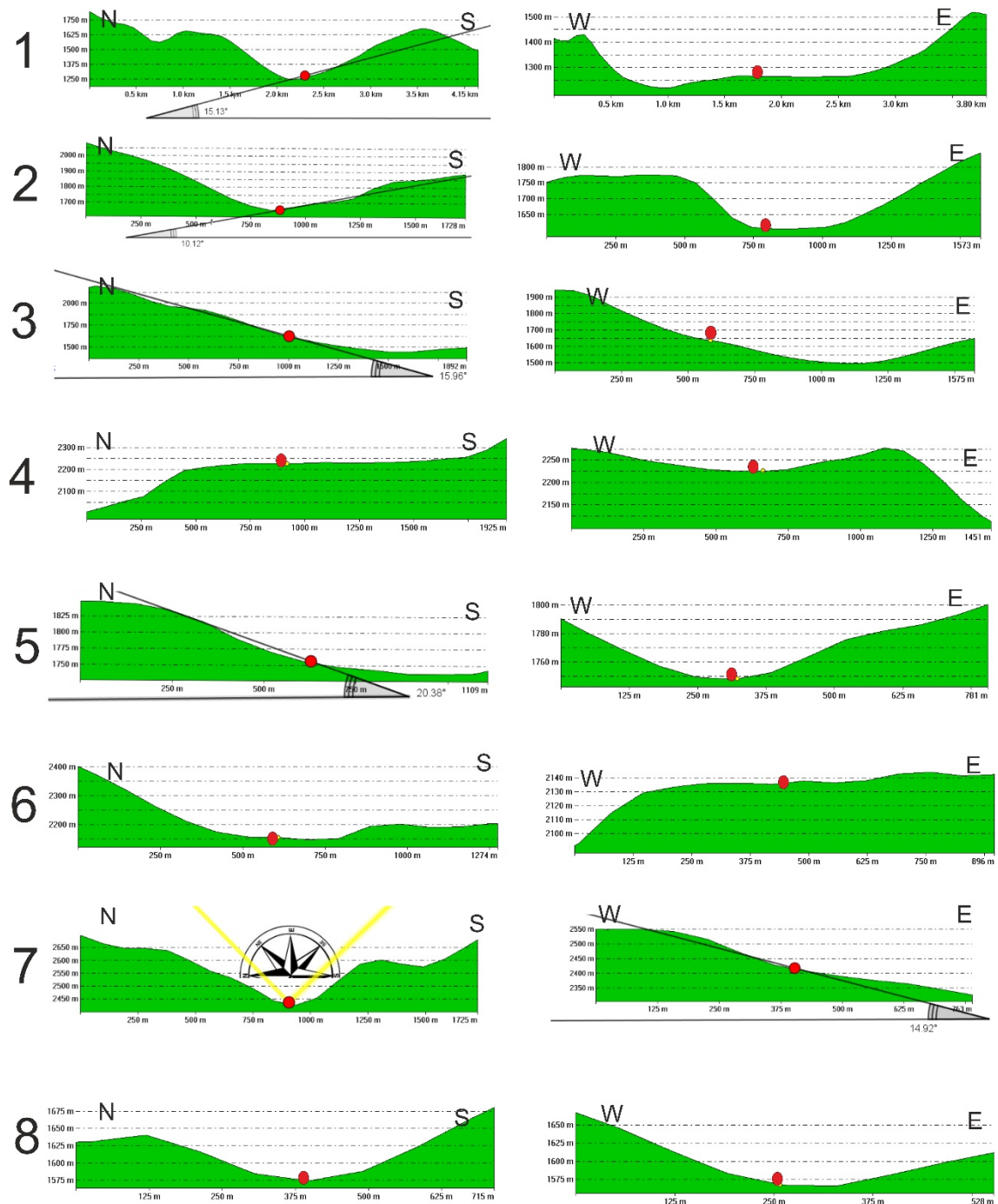


Figura 2.- Ángulos del perfil con mayor pendiente y su exposición en cada uno de los ocho puntos de muestreo, para el cálculo de la insolación teórica.

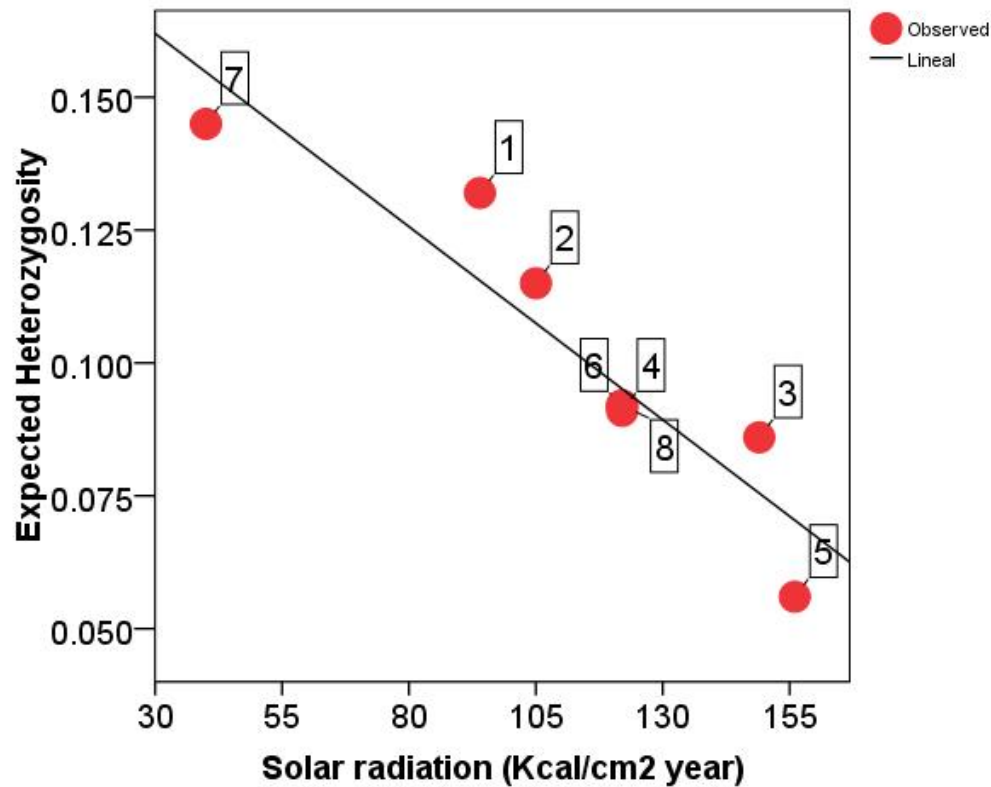


Figura 3.-Gráfico de la regresión lineal correspondiente a la heterocigosidad esperada en función de la radiación solar.

Tabla 2. Correlación lineal entre: Heterocigosidad esperada (He), Heterocigosidad observada (Ho), Polimorfismo del alelo más común menor o igual al 95 % (P95) y la radiación solar.

Variable dependiente	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros	
	Ecuación lineal						
	R cuadrado	F	gl1	gl2	Sig.	Constante	b1
He	0.861	37.189	1	6	0.001	0.184	-0.001
Ho	0.786	22.088	1	6	0.003	0.168	-0.001
P95	0.626	10.047	1	6	0.019	0.487	-0.002

*La variable independiente es Kcal/cm2 year

DISCUSION

La *Rana Temporaria* en los pirineos, borde sur de su distribución se enfrenta a diferentes limitaciones ambientales en su amplio rango de distribución y es por lo tanto propensa a la adaptación local. La movilidad relativamente baja de estos anfibios unido a la depresión endogámica dentro de las poblaciones es una amenaza potencial para su supervivencia. A todo ello se une la fuerte radiación UV de alta montaña que es aproximadamente el 6% de la radiación solar y especialmente la UV-B, la mas dañina, que es del 1.3%. Correlacionando la heterozigosidad con la radiación (figura 3) vemos que en los lugares de muestreo con mayor exposición a la radiación las poblaciones de ranas disminuyen alarmantemente su heterozigosidad. Esta baja diversidad genética se observa en las ranas que viven en localidades (3, 4, 6, 8, y 5) que están muy expuestas a la insolación, independientemente de su altitud (figura 1). En efecto, en altitudes superiores a 2.100 m. (4, 6, 7 y 8) la localidad 7, Ibones de la Facha, mantiene una gran diversidad porque sus lagos donde viven las ranas están protegidos de la radiación por el efecto pantalla de los grandes picos circundantes (figura 2). El resto de ibones de altitud está en un plano altamente insolado. Las ranas pirenaicas tienen mayor biodiversidad en los fondos de valle menos insolados. Estas interesantes conclusiones pueden advertirnos del posible desastre que se avecina con el cambio climático, ya que la *Rana temporaria* del pirineo, que está en su limite sur de su distribución europea, no habita altitudes menores de 1500 m donde quedaría aislada del resto de ranas europeas ya que las montañas que las separan de Europa tiene grandes altitudes y generalmente los ibones por los que podrían migrar están excesivamente insolados. Igualmente a bajas altitudes el tiempo atmosférico excesivamente caluroso tiende a ir reduciendo las superficies de agua donde se pueden reproducir.

REFERENCIAS

- Antwis R.E., Browne R.K. 2009. Ultraviolet radiation and Vitamin D3 in amphibian health, behaviour, diet and conservation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 154, 184–190.
- Beebee, T. J. 2005. Conservation genetics of amphibians. *Heredity* 95:423–427.
- Catalan J., Camarero L., Felip M., Pla S., Ventura M., Buchaca T., Bartumeus F., Guillermo de Mendoza G., Miró A., Casamayor E. O., Medina-Sánchez J.M., Bacardit M., Altuna M., Bartrons M., Díaz de Quijano D. 2006. High mountain lakes: extreme habitats and witnesses of environmental changes. *Limnetica*, 25(1-2): 551-584.
- Edenhamn, P., Hoggren, M. and Carlson, A. 2000. Genetic diversity and fitness in peripheral and central populations of the European tree frog *Hyla arborea*.- *Heredity* 133: 115-122.
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC, 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Mol Ecol* 17: 1170–1188.
- Escobedo-Bretado, J., González M., Reynoso-Cuevas, L., Alarcón-Herrera M. 2017. Cuantificación de la incidencia de radiación ultravioleta (UV-A, UV-B) en Durango, México. *Revista de Energías Renovables* 1 (2), 23-30.

- Ficetola, G.F. and Bonini A. 2011. Conserving adaptive genetic diversity in dynamic landscapes. *Molecular Ecology*, 20, 1569–1571.
- Frankham R, 1995. Inbreeding and extinction: island populations. *Conserv. Biol.* 12: 665-675.
- Garcia T.S., Paoletti D.J, and Blaustein A.R. 2009. Correlated trait responses to multiple selection pressures in larval amphibians reveal conflict avoidance strategies. *Freshwater Biology*, 54, 1066–1077.
- Gasc, J. P., et al., editors. 1997. Atlas of amphibians and reptiles in Europe. Societas Europaea Herpetologica and Museum National D'Histoire Naturelle (IEGB/SPN), Paris.
- Häder DP, Worrest RC, Kumar HD, Smith RC (1995) Effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Ambio* 24:174–180.
- Herkovits J., D'Eramo J. L., and Fridman O. 2006. The Effect of UV-B Radiation on *Bufo arenarum* Embryos Survival and Superoxide Dismutase Activity. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 3(1), 43-47.
- Hoelzel, A.R. 1998. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Second Edition. IRL Press at Oxford University Press. New York, USA. 445p.
- Hoffmann A., Plotner J., Pruvost N.B.M., Christiansen D.G., Rothlisberger S., Choleva L., Mikulicek P., Cogalniceanu D., Sas-Kovacs I., Shabanov D., Morozov-Leonov S., and Heinz-Ulrich R., 2015. Genetic diversity and distribution patterns of diploid and polyploid hybrid water frog populations (*Pelophylax esculentus* complex) across Europe. *Molecular Ecology*, 24, 4371–4391.
- Johansson M., Primmer C.G.R., Sahlsten J., and Merila J. 2005. The influence of landscape structure on occurrence, abundance and genetic diversity of the common frog, *Rana temporaria*. *Global Change Biology*, 11, 1664–1679.
- Johansson M., Primmer C.G.R. and Merila J. 2007. Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology*, 16, 2693–2700.
- Khogali, A., & Al-Bar, O. F. (1992). A study of solar ultraviolet radiation at Makkah solar station. *Solar Energy*, 48(2), 79–87.
- Laugen, A. T., A. Laurila, K. Rasanen, and J. Merila. 2003. Latitudinal countergradient variation in the common frog (*Rana temporaria*) development rates-evidence for local adaptation. *Journal of Evolutionary Biology* 16:996–1005.
- Mckee A.M., Maerz J.C., Smith L.L. and Glenn T.C. 2017. Habitat predictors of genetic diversity for two sympatric wetland-breeding amphibian species. *Ecology and Evolution*, 7:6271–6283.
- Miaud, C., R. Guy'étant, and J. Elmberg. 1999. Variations in life-history traits in the common frog *Rana temporaria* (Amphibia: Anura): a literature review and new data from the French Alps. *Journal of Zoology* 249:61–73.
- Miramontes-Sequeiros, L. C., Palanca-Castán, N. and A. Palanca-Soler, 2018a. Effect of fish stocking on alpine populations of European common frog (*Rana temporaria*) in the Pyrénées National Park. *Herpetological Journal*, 28(1): 43-49.

- Mnsen K.J., Blouin M.S. 2004. Extreme isolation by distance in a montane frog *Rana cascadae*. *Conservation Genetics* 5: 827–835, 2004.
- Morgen, A. 1957. Die Besonnung und ihre Verminderung durch Horizontbegrenzung. *Veroffentl. Meteorol. Hydrol. Dienstes D.D.R.* 12,; 1-16.
- Morris, D. P., H. Zagarese, C. E. Williamsom, E. G. Balseiro, B. R. Hargreaves, B. Modenutti, R. Moeller & C. Queima- Linos. 1995. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 1381-1391.
- Muir A.P., Thomas R., Biek R. and Mable B.K. 2013. Using genetic variation to infer associations with climate in the common frog, *Rana temporaria*. *Molecular Ecology*, 22, 3737–3751.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA. 512p.
- Nogués-Bravo D., Araújo M.B., Erread M.P., Martínez-Ricad J.P. 2007. Exposure of global mountain systems to climate warming during the 21st Century. *Global Environmental Change*, 17 (3-4), 420-228.
- Palanca S.A., Ascaso C., Marqués, F. and Jordana, R. 1978. Interacción entre la radiación y los ciclos biológicos de coleópteros minadores de resinosas en el Valle de Roncal (Navarra). VI Simposio de Bioclimatología. Madrid.
- Searle C.L., Belden L.K., Bancroft B.A., Han B.A., Biga L.M., Blaustein A.R. 2010. Experimental examination of the effects of ultraviolet-B radiation in combination with other stressors on frog larvae. *Oecologia*, 162:237–245, DOI 10.1007/s00442-009-1440-8.
- Sommaruga R, Oberleiter A, Psenner R (1996) Effect of UV radiation on the bacterivory of a heterotrophic nanoflagellate. *Appl Environ Microbiol* 62:4395–4400.
- Sommaruga, R. 2001. The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *J. Photochem. Photobiol.*, 62: 35-42.
- Sommaruga, R., & R. Psenner. 1997. Ultraviolet radiation in a high mountain lake of the Austrian Alps: Air and underwater measurements. *Photochem. Photobiol.*, 65:957-963.
- Sosa, P.; Batista, F.; González, M.A. y N. Bouza 2002 *La Conservación Genética de las Especies Amenazadas en: Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas:*
- Teacher, A. G. F., Garner, T. W. J. and R. A., Nichols, 2009. European phylogeography of the common frog (*Rana temporaria*): routes of postglacial colonization into the British Isles, and evidence for an Irish glacial refugium. *Heredity*, 102: 490–496.
- Veith M., Vences M., Vieites D.R., Nieto-Roman S., Palanca A. 2002. Genetic differentiation and population structure within Spanish common frogs (*Rana temporaria* complex; Ranidae, Amphibia). *Folia Zool.* 51(4): 307–318.
- Weyrauch S. L. and Grubb JR. 2006. Effects of the Interaction between Genetic Diversity and UV-B Radiation on Wood Frog Fitness. *Conservation Biology*, 20 (3), 802-810.
- Zhang Y.L., Zhang, E.L., Liu M.L., Wang X., Qin B.Q. 2007. Variation of chromophoric dissolved organic matter and possible attenuation depth of ultraviolet radiation in Yunnan Plateau lakes. *Limnology* 8:311–319 , DOI 10.1007/s10201-007-0219-z.

ANEXO 1

Michael VEITH, Miguel VENCES, David R. VIEITES, Sandra NIETO-ROMAN and Antonio PALANCA. 2002. Genetic differentiation and population structure within Spanish common frogs (*Rana temporaria* complex; Ranidae, Amphibia) *Folia Zool.* – 51(4): 307–318 .

Methods

Pieces of muscle and liver were homogenised in Pgm buffer (H e b e r t & B e a t o n 1993). Electrophoresis was run on cellulose acetate (CA) plates from Helena Diagnostics, Texas. We used four different buffer systems for separation of allozymes (Table): Phosphate buffer, pH 7.2 (PP 7.2); tris-maleic buffer, pH 7.0 (TM 7.0); tris-citric buffer, pH 7.2 (TC 7.2); tris-glycine buffer, pH 8.5 (TG 8.5). Twenty enzyme systems provided data on 24 presumptive gene loci (Table). Allozyme loci and alleles were numbered according to their electrophoretic mobility, either anodal or cathodal, with the fastest being 1 or a, respectively.

Allele frequencies and population genetic variability estimates (mean heterozygosity, average number of polymorphic loci and average number of alleles) were calculated for all samples using G-STAT (S i g i s m u n d 1997). We tested for syntopic occurrence of different taxa by calculating deviations of observed genotype frequencies from ideal Hardy- Weinberg proportions χ^2 -Test; rare alleles were pooled to avoid expected genotype frequencies below 1.0; G-STAT). Subsequently, we corrected within populations for multiple tests across polymorphic loci (sequential Bonferroni correction as outlined by R i c e ,1989). Inbreeding parameters according to W r i g h t ' s (1951) F-statistics were calculated with G-STAT for ingroup samples with $n \geq 4$ by the procedure described in W e i r & C o c k e r h a m (1984). Variances of these estimators were obtained by jackknifing populations. Inbreeding estimates deviating ± 1.96 standard deviation (SD) from zero were regarded as significant.

Table. Enzyme systems, enzyme commission (E.C.) number, buffer systems and tissues used in electrophoresis.

enzyme system	loci	buffer system	tissue
aspartate aminotransferase	aat1, aat2	PP 7.2	muscle
adenosyl-homocysteine hydrolase	ahh	PP 7.2	liver
arginine phosphokinase	apk	PP 7.2	liver
creatine kinase	ck	TC 8.2	liver
fumarate hydratase	fum	TC 8.2	muscle
glucose dehydrogenase	gldh	TM 7.0	liver
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gapd	TM 7.0	muscle
glucose-phosphate isomerase	gpi	TG 8.5	muscle
isocitrate dehydrogenase	idh1, idh2	TM 7.0	liver
lactate dehydrogenase	ldh1, ldh2	PP 7.2	muscle
NAD-dependent malate dehydrogenase	mdh	TM 7.0	liver
NADP-dependent malate dehydrogenase (malic enzyme)	me	TM 7.0	liver
mannose-phosphate isomerase	mpi	TM 7.0	muscle
dipeptidase with alanine-leucine as substrate	pepA	TC 8.2	liver

tripeptidase with glycine-leucine-leucine as substrate	pepB	PP 7.2	liver
dipeptidase with phenylalanine-proline as substrate	pepD1, pepD2	TC 8.2	liver
6-phosphogluconate dehydrogenase	6pgd	TM 7.0	liver
phosphoglucomutase	pgm	TC 8.2	muscle
pyruvate kinase	pk	TM 7.0	liver
threhalase	tre	PP 7.2	liver

HEBERT, P. D. N. & BEATON, M. J., 1993: Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Helena Laboratories, Beaumont.

RICE, W. R., 1989: Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223–225.

SIGISMUND, H. R., 1997: GSTAT, version 3. München.

WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C., 1984: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.

WRIGHT, S., 1951: The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics*, 1: 323–354.

ANEXO 2

Morgen, A. 1957. Die Besonnung und ihre Verminderung durch Horizontbegrenzung.

Veröffentl. Meteorol. Hydrol. Dienstes D.D.R. 12,; 1-16.

Solar radiation expected Kcal/cm2 year

		Slope			
		0º	10º	20º	30º
Exposition of slopes	limited to the sector				
S		122	142	156	164
	S-SE (S-SW)	32	40	46	50
	SE-E (SW-W)	25	28	29	30
	E-NE(W-NW)	4	3	2.5	2
SE (SW)		122	136	146	150
	S_SW (S-SE)	32	37	38	38
	SW-W (SE-E)	25	22	18	14
	W-NW (E-NE)	4	2.5	1	0.1
	S-SE (S-SW)	32	39	48	50
	SE-E (SW-W)	25	30	35	41
	E-NE(W-NW)	4	5.5	6.5	7
		122	124	122	118
E (W)	S- SW (S-SE)	32	29	26	22
	SW-W (SE-E)	25	19	11	6
	W-NW (E-NE)	4	2	1	0.5
	S-SE (S-SW)	32	37	39	40
	SE-E (SW-W)	25	31	36	41
	E-NE(W-NW)	4	6	8	10
		122	111	95	79
NE (NW)	S-SE (S-SW)	32	80	26	20
	SE-E (SW-W)	25	27	28	28
	E-NE(W-NW)	4	6	7.5	9
	S-SW (S-SE)	32	27	21	14
	SW-W (SE-E)	25	19	12	6
	W-NW (E-NE)	4	2.5	0	0
		122	105	83	62
N	S-SE (S-SW)	32	27	19	12
	SE-E (SW-W)	25	22	18	14
	E-NE(W-NW)	4	4	4.8	4.5