

# ADAPTACIONES A MEDIOS ACUÁTICOS HIPEROSMÓTICOS EN POBLACIONES DEL SAPO CORREDOR (*BUFO CALAMITA*) DE LAS LAGUNAS DEL SUR DE CÓRDOBA

**MIGUEL TEJEDO**

Dpto. Ecología Evolutiva

**IVAN GOMEZ-MESTRE**

Dpto. Ecología de Humedales.

Estación Biológica de Doñana, CSIC

Avda. Américo Vespucio s/n, Isla de la Cartuja

Sevilla 41092, España.

## RESUMEN

A pesar de la baja capacidad osmorreguladora de los anfibios, algunas especies cuentan con poblaciones que se reproducen en ambientes salinos. Nosotros hemos estudiado la adaptación a la salinidad en poblaciones del sapo corredor (*Bufo calamita*) que crían en lagunas salobres del suroeste español. Combinamos experimentos de campo y laboratorio para determinar la base hereditaria de la tolerancia a la salinidad, estudiar qué cambios fisiológicos se producen, en qué contexto genético-poblacional ha evolucionado esta adaptación, y cuál puede haber sido el origen de la diferenciación en la tolerancia entre poblaciones. Encontramos que la tolerancia a la salinidad es un carácter heredable y ha divergido por selección ya que las poblaciones de ambientes salinos toleran mejor la salinidad que las poblaciones de ambientes dulceacuícolas. El grado de diferenciación genética adaptativa entre poblaciones es muy superior al de diferenciación genética neutral, lo que sugiere una primacía de los procesos selectivos frente a los estocásticos. En condiciones de salinidad los renacuajos acumulan electrolitos, sin usar deshechos nitrogenados como osmolitos. La salinidad retrasa el desarrollo larvario, y parece interferir en los niveles de hormona tiroidea activa. Por último, la tolerancia a la salinidad larvaria no está asociada a la tolerancia a la desecación durante la fase juvenil terrestre de la especie, lo que sugiere una evolución independiente de estos caracteres.

## 1. ANTECEDENTES

Los anfibios poseen una alta permeabilidad tegumentaria y son generalmente incapaces de producir orina hiperosmótica con respecto al medio en que se encuentran. Esta circunstancia hace que sean pobres osmorreguladores y que resulten muy vulnerables al estrés osmótico. Por esta razón, la mayor parte de los anfibios se reproducen en ambientes de agua dulce, estando prácticamente ausentes en ambientes de agua salina. No obstante, unas pocas especies presentan poblaciones en estos ambientes estresantes, lo que sugiere que puedan haber experimentado fenómenos de adaptación local [1]. Bajo condiciones de estrés osmótico, por salinidad o desecación, los adultos de especies que presentan cierta tolerancia, retienen orina, acumulan electrolitos y aumentan la síntesis de urea, usando ésta como osmolito [2]. En cambio, durante la fase acuática, las larvas excretan mayoritariamente amonio, no siendo aún capaces de sintetizar urea como los adultos. Es posible, no obstante, que en aquellas especies en que las fases acuáticas se hayan adaptado a medios hiperosmóticos, la activación del ciclo de la urea se produzca antes de la metamorfosis.

El sapo corredor, *Bufo calamita*, es una de las pocas especies que cuentan con poblaciones en ambientes salinos. En la Península Ibérica esta especie se puede encontrar reproduciéndose en numerosos humedales de naturaleza salina. Nuestro estudio se centró en analizar la posible adaptación a la salinidad del agua en poblaciones del sapo corredor (*Bufo calamita*) que se reproducen en humedales salinos del sur de la provincia de Córdoba, integrados en las Reservas Naturales Lagunas del Sur de Córdoba.

En este análisis de adaptación local, como en la mayoría de los casos, se desconoce aún la base genética molecular del carácter estudiado (tolerancia a la salinidad). Así, para determinar en qué medida la tolerancia a la salinidad presenta una base genética heredable que ha divergido por selección entre poblaciones, recurrimos a una combinación de experimentos ecológicos y genético-cuantitativos que nos permiten diseccionar la variación fenotípica observada en componentes causales, atribuibles, por una parte, a factores hereditarios, y por otra, a factores puramente ambientales. En los experimentos ecológicos, combinamos experimentos de trasplante recíproco (cría simultánea de individuos de poblaciones provenientes de distintos ambientes en cada uno de esos ambientes), con experimentos de ambiente común (cría en laboratorio de todas las poblaciones bajo condiciones controladas) que permiten controlar la variación ambiental y separar ésta de la variación genética.

En los experimentos genético-cuantitativos analizamos la variación fenotípica dentro de y entre familias para cada una de las poblaciones. Esto nos permite calcular estadísticamente qué fracción de la varianza en la tolerancia a la salinidad es heredable. Podemos, además, contrastar el grado

de diferenciación genética entre poblaciones en su tolerancia a la salinidad con el grado de divergencia genética neutral. Esta estima de divergencia neutral correspondería a genes que no se encuentran bajo selección y cuya variación entre poblaciones responde a fenómenos estocásticos ligados a la dinámica poblacional. El examen de variación genética neutral puede obtenerse, por ejemplo, mediante el análisis de la variación alélica para *loci* microsatélites. La comparación de variación genética cuantitativa (adaptativa) y neutral (microsatélites) nos da idea de la importancia relativa de la selección en la diferenciación del carácter entre poblaciones [3]. Si la diferenciación genética cuantitativa entre poblaciones es mayor que la diferenciación neutral, nos sugiere que la divergencia entre éstas se debe principalmente a la selección natural. En cambio, si el grado de diferenciación es similar para los dos tipos de variación genética, no podemos asegurar que la selección haya tenido un papel preponderante sobre los fenómenos estocásticos de deriva génica. Y en casos en los que la diferenciación neutral sea mayor que la cuantitativa, podemos pensar que el carácter se encuentra bajo selección estabilizadora que mantiene una similitud del carácter aún entre poblaciones aisladas y sometidas a deriva. Además, puesto que el flujo génico entre poblaciones tiende a amortiguar la diferenciación genética entre ellas, tener una estima del grado de diferenciación genética neutral y del flujo génico aporta un contexto histórico reciente en el que la adaptación pueda haber tenido lugar.

Una vez demostrado que el carácter estudiado es heredable, está bajo selección, varía entre poblaciones sometidas a distintos niveles del factor ambiental que selecciona para el carácter, y descrito el marco poblacional en que esta adaptación ha evolucionado, es importante considerar la cuestión del origen del carácter. Esto es así, especialmente, en el caso de organismos con ciclos de vida complejos, en los que un mismo genotipo se ve expuesto a muy distintas condiciones ambientales en las distintas fases vitales. En tal caso, si los caracteres expresados en distintas fases vitales (p.e. renacuajo, juvenil) estuvieran bajo un mismo control genético (genéticamente correlacionados), no serían libres de evolucionar independientemente. De este modo, la variación en la tolerancia a la salinidad en *B. calamita* puede haberse originado históricamente por dos vías principales: selección directa sobre mutaciones genéticas espontáneas que resultaban en una mayor tolerancia a la salinidad en el medio acuático larvario; o por selección indirecta por estar ligada a un carácter bajo selección, como la resistencia a la desecación durante la fase terrestre, la cual implica un estrés osmótico análogo al causado por la salinidad del agua. Esta segunda posibilidad vino sugerida por el hecho de que las poblaciones dulceacuícolas del suroeste español poseen una mayor tolerancia a la salinidad que incluso poblaciones costeras del Reino Unido que están expuestas a salinidad [4].

Además, los cuerpos de agua salina son relativamente escasos y dispersos a lo largo de la distribución de *B. calamita*, mientras que existe un gradiente descendente muy marcado de sequía estival de sur a norte que implicaría elevados niveles de desecación en las poblaciones del sur de España. En el caso de que la tolerancia a la salinidad fuera asociada a la tolerancia a la desecación, podríamos considerar la primera como una exaptación de la segunda (reconversión de un carácter para una función diferente de aquella para la que fue originalmente seleccionado) [5].

## 2. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

Nuestros objetivos fueron a) examinar experimentalmente la hipótesis de adaptación local; b) determinar la heredabilidad del carácter; c) comparar los patrones de divergencia genética cuantitativa y neutral; d) estudiar los cambios fisiológicos inducidos por la salinidad; e) examinar la correlación entre tolerancia a la salinidad en la fase acuática y tolerancia a la sequía en la fase terrestre.

**2.1. Adaptación local.** Usamos experimentos de ambiente común para analizar la variación poblacional en la tolerancia embrionaria a la salinidad [6]. Para la fase larvaria (renacuajos) combinamos experimentos de ambiente común con trasplantes recíprocos. Comparamos la tolerancia de tres poblaciones de agua dulce (Doñana, Sierra Norte de Sevilla, Sierra Morena de Córdoba) con dos de agua salina (ambas dentro de las Lagunas del sur de Córdoba). Determinamos el rango de tolerancia embrionaria aplicando un gradiente de 0 a 12 g/L, a incrementos de 2 g/L, usando agua de las lagunas salinas. A continuación usamos concentraciones subletales para comparar la tolerancia entre poblaciones, criando embriones de cada una de ellas en tres concentraciones (0, 6, 8 g/L) y determinando la supervivencia y tamaño tras la eclosión.

Los experimentos de trasplante en campo consistieron en criar larvas de tres poblaciones dulceacuícolas y una salada en dos ambientes salados y en dos dulceacuícolas. En cada laguna, criamos renacuajos de cada población en distintos cercados, y a la vez dispusimos renacuajos individualizados de distintas familias por población en vasos de plástico tapados con malla. Criamos las larvas hasta la metamorfosis, registrando la supervivencia, el periodo larvario y el tamaño en metamorfosis. Realizamos también un experimento de ambiente común larvario manteniendo los renacuajos individualmente en tres concentraciones (0, 6, 8 g/L).

**2.2. Heredabilidad de la tolerancia a la salinidad.** Para estudiar la variación genético-cuantitativa de la tolerancia a la salinidad, hicimos una serie de cruzamientos entre individuos dentro de población para dos po-

blaciones (dulceacuícola y salina). Obtuvimos también una serie de cruces híbridos recíprocos entre las poblaciones. Usamos, para cada población, un diseño factorial incompleto en el que se seleccionaron aleatoriamente un grupo de machos y hembras. Cada macho se cruzaba con dos o tres hembras que a su vez se cruzaban con dos o tres machos del grupo. Criamos la descendencia obtenida de estos cruces tanto en condiciones de campo (transplante recíproco) como en laboratorio (ambiente común), manteniendo en todos los casos los renacuajos individualizados. Las estimas de los componentes de varianza se obtuvieron mediante análisis de máxima verosimilitud restringida (REML).

**2.3. Comparación de variación cuantitativa y neutral.** La diferenciación genética entre poblaciones en su tolerancia a la salinidad fue cuantificada calculando el parámetro  $Q_{ST}$ , que representa la proporción de varianza en la tolerancia que se debe a diferencias entre poblaciones, respecto del total:  $Q_{ST} = \sigma^2 / (\sigma^2 + 2\sigma_D^2)$ ; donde  $\sigma^2$  es la varianza debida a las diferencias entre poblaciones y  $\sigma_D^2$  es la varianza debida a las diferencias dentro de población.  $Q_{ST}$  es análogo a la estima  $F_{ST}$  de diferenciación poblacional en la composición alélica para una serie de *loci* determinados, y, por tanto, la comparación entre un tipo y otro de variación genética es directa. Para obtener la estima del grado de diferenciación genética neutral, analizamos la variación alélica en ocho *loci* microsatélites descritos para *B. calamita* [7]. Muestreamos 23-25 individuos por población y procedimos a la extracción de ADN, amplificación por PCR e identificación de alelos en cada *loci* para cada individuo [8].

**2.4. Respuesta fisiológica al estrés osmótico.** Estudiamos el efecto de la salinidad del agua en varios parámetros fisiológicos en los renacuajos de *B. calamita*. Mediante determinaciones bioquímicas analizamos la concentración osmótica interna y las variaciones en la concentración de electrolitos. Contrastamos la hipótesis de que los renacuajos pudieran haber acelerado la activación de la síntesis de urea para usarla como osmolito, examinando la abundancia relativa de deshechos nitrogenados. Atendimos también a variaciones en indicadores metabólicos básicos como cantidad de glucosa y proteínas totales. Debido al reducido tamaño de las larvas de *B. calamita*, realizamos estos análisis a partir de homogenizados del cuerpo entero de cada larva, con la pérdida de información fisiológica que ello conlleva. Por otro lado, estudiamos el efecto de la salinidad del agua sobre el control endocrino de la metamorfosis, analizando la concentración relativa de hormona tiroidea (hormona que controla la tasa de desarrollo en anuros y cuya elevación desencadena la metamorfosis). Determinamos los niveles de tiroxina (T4, precursor) y tri-iodotironina (T3, forma activa) en estadios pre- y post-metamórficos de individuos sometidos a distintas concentraciones salinas.

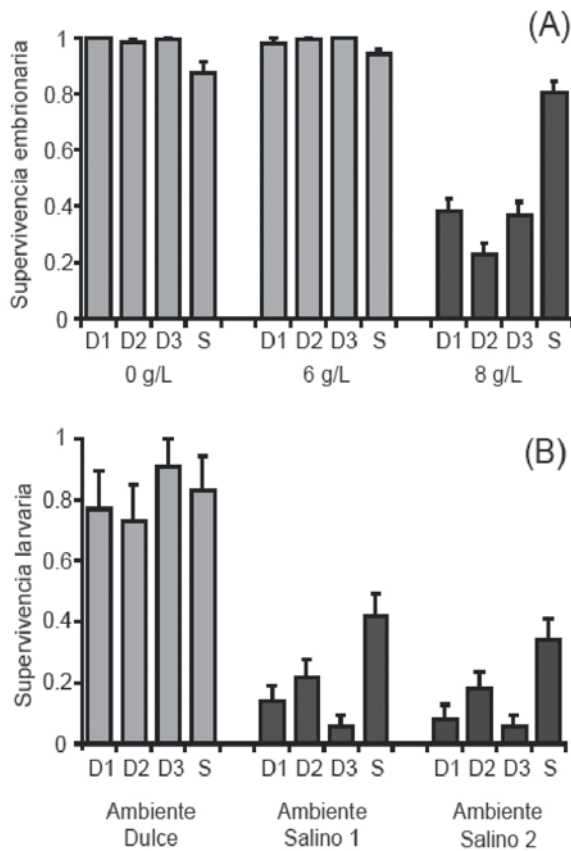
Todos estos análisis se llevaron a cabo en el departamento de Bioquímica del Hospital de Valme, Sevilla. Las determinaciones bioquímicas se obtuvieron usando distintas técnicas implementadas en un autoanalizador mientras que las determinaciones hormonales se obtuvieron mediante inmunoensayo por electroquemoluminiscencia (ECLIA) [9].

**2.5. Relación entre tolerancia a la salinidad y tolerancia a la desecación.** Para testar la idea de asociación entre tolerancia a la salinidad durante la fase acuática y tolerancia a la desecación durante la fase terrestre, colectamos larvas de tres poblaciones, dos de origen dulceacuícola y una de origen salino, y criamos a todas las larvas en condiciones dulceacuícolas, y por tanto sin estrés osmótico. La supervivencia larvaria fue muy alta, y los juveniles que iban metamorfoseando fueron transferidos individualmente a cajitas de plástico de 0.5 L con un sustrato inerte que nos permitió tener un alto grado de control sobre su potencial hídrico (vermiculita). Así, establecimos dos tratamientos, húmedo y seco, en los que criamos a los sapillos de las distintas poblaciones durante cinco semanas. A lo largo de ese periodo fuimos determinando la supervivencia y la tasa de crecimiento de cada uno de ellos, así como observaciones comportamentales y pruebas de eficacia de captura de presas [5]:

### 3. RESULTADOS

Los resultados de los trasplantes en campo y de los experimentos de ambiente común fueron consistentes en demostrar que la salinidad impone un estrés considerable a las larvas de *B. calamita*, reduciendo su probabilidad de supervivencia, alargando su periodo larvario (con lo que incurren en riesgo de desecación de la charca), y reduciendo su tamaño en metamorfosis. Todas las poblaciones estudiadas parecían compartir un umbral de tolerancia embrionaria semejante (10 g/L) por encima del cual ningún embrión fue capaz de sobrevivir.

Sin embargo, a pesar de que el agua salina fue perjudicial para todas las poblaciones, aquellas de origen salino mostraron una mayor supervivencia, tanto embrionaria (en el rango 0-9 g/L) como larvaria, que las poblaciones de origen dulceacuícola (Fig. 1). Las poblaciones de origen salino tendieron también a una menor duración del periodo larvario tanto en los trasplantes como en ambiente común controlado [6]. En los ambientes dulceacuícolas, por el contrario, no existieron diferencias entre poblaciones en supervivencia o variables de metamorfosis. Este resultado (interacción 'población x ambiente') es el primer indicio de que la tolerancia a la salinidad tiene una base genética y se encuentra bajo selección, y, por tanto, demuestra que las poblaciones en los distintos ambientes han divergido en su capacidad de tolerancia.



**Figura 1. Supervivencia diferencial entre poblaciones.** La tolerancia a la salinidad es más alta en poblaciones expuestas a estrés osmótico que en poblaciones dulceacuícolas. Las letras bajo cada barra indican las distintas poblaciones, tres dulceacuícolas (D1-D3) y una salina (S). (A) Una concentración de 8 g/L en el ambiente común redujo la supervivencia embrionaria, pero el impacto fue menor para la población salina. (B) El transplante en campo mostró cómo en las lagunas saladas la supervivencia larvaria era menor, si bien el efecto para la población salina era más leve.

Usando la supervivencia diferencial entre familias como estimador del grado de tolerancia a la salinidad, detectamos componentes significativos de varianza genética aditiva ( $V_A$ ) durante la fase embrionaria, así como efectos maternos ( $V_M$ ) que fueron tanto más marcados cuanto mayor era la salinidad. El análisis de los híbridos recíprocos (macho 'dulceacuícola' x hembra 'salina' y viceversa) fue concordante con el efecto materno detectado. Aunque su tolerancia a la salinidad resultó intermedia entre las poblaciones parentales, los embriones híbridos tendieron a asemejarse claramente a la población de origen materno (i.e., los híbridos  $\sigma^{\text{DULCEACUÍCOLA}} \times \text{SALINA}$  mostraron una tolerancia más próxima a la población salina y los  $\sigma^{\text{SALINA}} \times \text{DULCEACUÍCOLA}$  más próxima a la población dulceacuícola). La variación genético-cuantitativa en tolerancia a la salinidad fue mucho menos acusada en la fase larvaria que en la embrionaria, y los efectos no-aditivos y maternos se vieron consecuentemente reducidos. Igualmente, encontramos que

los híbridos mostraron una respuesta más elevada que las poblaciones parentales en las tasas de desarrollo y crecimiento larvario, lo que sugiere la existencia de *heterosis* o vigor híbrido. Todos estos resultados demuestran que la tolerancia a la salinidad tiene una base heredable y que las poblaciones de *B. calamita* de las lagunas salinas del sur de Córdoba se encuentran localmente adaptadas y diferenciadas con respecto a las poblaciones de agua dulce estudiadas.

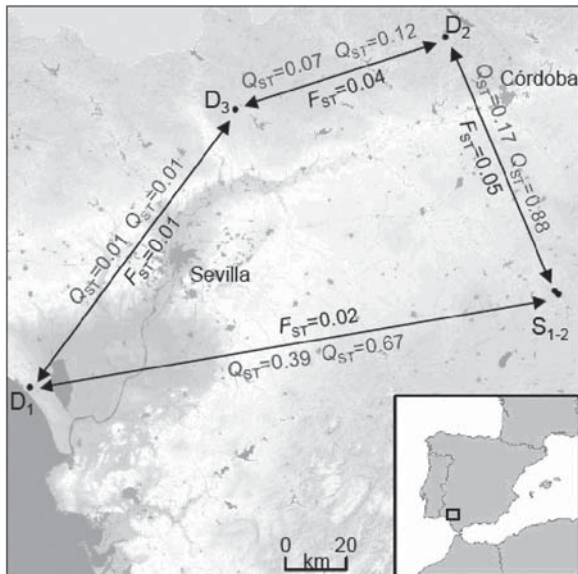
Algunos modelos de adaptación a ambientes heterogéneos predicen que la adaptación a unos factores ambientales puede conllevar una pérdida de eficacia biológica frente a otros factores distintos, lo que se ha visto confirmado empíricamente en numerosos sistemas. Por tanto, la adaptación a ambientes salinos podría llevar aparejada una disminución de la eficacia en condiciones de agua dulce, es decir, un efecto pleiotrópico antagonista. En nuestro sistema no pareció darse el caso, y si bien en algún experimento pareció que las poblaciones salinas pudieran tener una supervivencia ligeramente menor en agua dulce que las poblaciones dulceacuícolas, tal efecto no fue estadísticamente significativo ni consistente entre experimentos, por lo que no tenemos razones para pensar que se de una pleiotropía antagonista.

La diferenciación neutral entre poblaciones resultó ser minúscula (apenas un 4% del total), a pesar de que las poblaciones muestran una clara divergencia genética en su tolerancia a la salinidad. Calculamos los  $Q_{ST}$  en tres condiciones crecientes de salinidad diferentes, mostrando valores notablemente mayores que los valores de  $F_{ST}$  (Fig. 2), lo cual refuerza la idea de la divergencia adaptativa entre poblaciones. El grado de divergencia genética entre poblaciones de origen dulceacuícola y salino en la tolerancia a la salinidad aumentó a medida que aumentamos la concentración salina, sugiriendo que las diferencias genéticas en la tolerancia se expresan con mayor claridad en las condiciones de mayor estrés osmótico (Fig. 2) [8]. De forma congruente con esta observación, el grado de diferenciación genética en tolerancia a la salinidad fue mayor entre pares de poblaciones dulceacuícola y salina, diferenciación que se acentuó a medida que aumentaba la salinidad del agua.

Todo ello indica que la adaptación a ambientes salinos en estas poblaciones ha ocurrido bien bajo una presión de selección intensa y a pesar de flujo génico con poblaciones dulceacuícolas; o bien en un intervalo de tiempo demasiado breve como para que se produjera una segregación de alelos neutrales entre poblaciones. Las cubetas de las lagunas salinas estudiadas se hallan sobre sedimentos cuaternarios datados en unos 5.000 años. Si asumimos que *B. calamita* pudiera haber colonizado estas lagunas desde su formación y que hayan criado exitosamente en ellas desde entonces, podemos afirmar que la adaptación local a la salinidad en estas poblaciones ha evo-

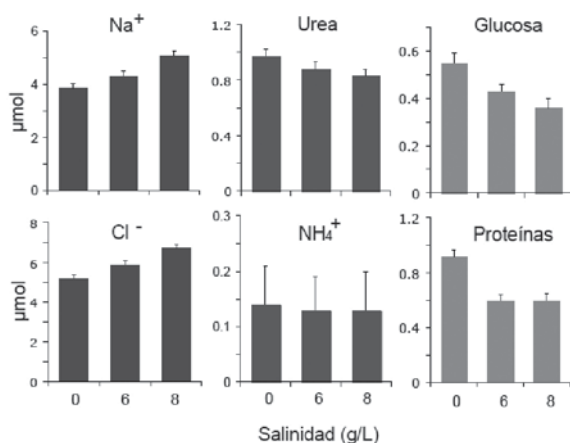


lucionado en menos de 2000 generaciones. El número real de generaciones tiene por fuerza que ser netamente inferior ya que en registros durante los últimos 15 años hemos comprobado que las lagunas se secan en ocasiones antes de que las larvas de *B. calamita* pudieran metamorfosear, o alcanzan salinidades que rebasan los límites de tolerancia de la especie.



**Figura 2. Diferencias entre variación genética cuantitativa y neutral.** La diferenciación genética cuantitativa entre poblaciones fue mayor que la neutral ( $Q_{ST} \gg F_{ST}$ ). Además, las diferencias cuantitativas fueron tanto mayores cuanto mayor fue la salinidad en que se midieron (azul, 0 g/L; rojo, 8 g/L), y fueron también mayores entre pares de poblaciones dulce-salada, que entre poblaciones dulces.

Los renacuajos de *B. calamita* sufren una ralentización en el desarrollo y en el crecimiento cuando se ven sometidos a estrés salino. Aunque existen niveles detectables de urea y por tanto su síntesis está activa durante la fase larvaria de *B. calamita*, no existieron diferencias entre tratamientos salinos en su concentración, indicando que no es utilizado como osmolito (Fig. 3). Por el contrario, los renacuajos parecen osmoregular hasta un cierto punto (~ 90 mOsm), a partir del cual comienzan a acumular electrolitos pasivamente (Fig. 3), incapaces de elevar su la presión osmótica interna por encima de la ambiental. Los renacuajos parecen pagar un coste metabólico por el hecho de estar sometidos a estrés osmótico, como parece señalar el que los niveles de glucosa y proteínas totales fueran significativamente menores en agua salina [9].



**Figura 3. La salinidad provoca alteraciones en la fisiología larvaria.** Los renacuajos sufrieron un incremento significativo en la concentración de electrolitos (sodio y cloro), con el incremento en la salinidad. Aún siendo capaces de sintetizar urea, no la usaron como osmolito (no hubo diferencias entre tratamientos), a pesar de que sí lo hacen durante la fase terrestre. La salinidad causó una reducción significativa en los niveles de glucosa y proteínas totales.

La concentración de hormona tiroidea controla la tasa de desarrollo en anuros. Su concentración va lentamente en aumento durante los estadios iniciales de desarrollo larvario y luego aumenta rápidamente alcanzando un pico durante la metamorfosis. Observamos que, para un mismo estadio de desarrollo, el nivel de la forma precursora de la hormona (T4) era significativamente más alto a mayor salinidad, mientras que la concentración de la forma activa (T3) era significativamente más bajo [9]. Esta aparente disminución en la concentración de T3 explica en parte el retraso en la metamorfosis de renacuajos criados en agua salina, pero no está claro el motivo por el que esta hormona pueda tener niveles más bajos en estas circunstancias. Algunas hormonas involucradas en el mantenimiento del balance hídrico y la retención iónica pueden tener efectos antagónicos con la hormona tiroidea, como en el caso de la prolactina. Por el momento esto es sólo una hipótesis que requiere verificación experimental.

Los efectos de la desecación en el medio terrestre tuvieron el mismo impacto en las poblaciones de ambientes acuáticos dulceacuícolas que en la de origen acuático salino, poniendo de relieve que ésta no gozaba de mayor tolerancia. Este falta de concordancia entre tolerancia larvaria a la salinidad en el medio acuático y la tolerancia de los juveniles a la desecación en el medio terrestre resta credibilidad a la idea de exaptación y favorece la noción de que la tolerancia a la salinidad haya evolucionado por selección directa sobre variaciones genéticas que se hayan podido extender a poblaciones vecinas incluso de agua dulce, máxime cuando el carácter no parece estar contra-seleccionado en ambientes dulceacuícolas. Las diferencias entre el suroeste español y las poblaciones inglesas van en paralelo a una disminución generalizada de la variación genética (aparentemente tanto

de la adaptativa como de la neutral) debido a los fenómenos de refugio y posterior expansión postglaciares [10].

#### 4. CONCLUSIONES

(1) El estrés osmótico causa una alta mortalidad embrionaria y larvaria, así como una ralentización de la tasa de desarrollo asociada a una disminución en los niveles de hormona tiroidea (T3). (2) Las poblaciones de *Bufo calamita* que ocupan ambientes salinos presentan en dichos ambientes una ventaja adaptativa clara con respecto a poblaciones de ambientes dulceacuícolas. En los ambientes dulceacuícolas no encontramos diferencias entre poblaciones de distinto origen ecológico, lo cual sugiere una ausencia de costes de la adaptación. (3) La adaptación local a la salinidad en estas poblaciones tiene una base genética aditiva, aunque también intervienen efectos maternos y de dominancia (heterosis). (4) El análisis de microsatélites mostró que las poblaciones tolerantes a la salinidad no se encuentran aisladas sino que experimentan un flujo genético moderado con poblaciones origen dulceacuícola. Igualmente, la comparación entre variación genética cuantitativa y neutral mostró que la divergencia entre poblaciones de origen salino y dulceacuícola en tolerancia al estrés osmótico es netamente superior a la esperable por fenómenos estocásticos de deriva, por lo que podemos afirmar que la divergencia en tolerancia obedece a la acción de la selección natural. (5) La falta de asociación entre tolerancia a la salinidad en las fases acuáticas de la especie, y la tolerancia a la desecación terrestre de la fase juvenil no apoya la idea de una selección correlativa indirecta de la tolerancia a la salinidad del agua.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer la colaboración de R. Reques, F. Recio, E. Ramayo, J. Estepa, B. Moreno, J. Corral, a la administración de las Reservas Naturales Lagunas del Sur de Córdoba. Esta investigación fue financiada por la beca AP97 05421411 a IGM y los proyectos PB96-0861, CGL2004-01872/BOS, CGL2005-02931/BOS a MT, del Ministerio de Educación y Ciencia.

#### 6. REFERENCIAS

1. Boutilier, R.G., D.F. Stiffler, y D.P. Toews. 1992 *Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians*. En *Environmental physiology of the amphibians*, M.E. Feder y W.W. Burggren, Editores. University of Chicago Press: Chicago. p. 81-124.

2. Balinsky, J.B. 1981. *Adaptation of nitrogen metabolism to hypertonic environment in Amphibia*. J. Exp. Zool. **215**: 335-350.
3. Merila, J. y P. Crnokrak. 2001. *Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits*. J. Evol. Biol. **14**: 892-903.
4. Beebee, T.J.C. 1985. *Salt tolerances of natterjack toad (Bufo calamita) eggs and larvae from coastal and inland populations in Britain*. Herpetological Journal **1**: 14-16.
5. Gomez-Mestre, I. y M. Tejedo. 2005. *Adaptation or exaptation? An experimental test of hypotheses on the origin of salinity tolerance in Bufo calamita*. J. Evol. Biol. 2005. **18**: 847-55.
6. Gomez-Mestre, I. y M. Tejedo. 2003. *Local adaptation of an anuran amphibian to osmotically stressful environments*. Evolution **57**: 1889-1899.
7. Rowe, G., T.J.C. Beebee, y T. Burke. 1997. *PCR primers for polymorphic microsatellite loci in the anuran amphibian Bufo calamita*. Mol. Ecol. **6**: 401-402.
8. Gomez-Mestre, I. y M. Tejedo. 2004. *Contrasting patterns of quantitative and neutral genetic variation in locally adapted populations of the natterjack toad, Bufo calamita*. Evolution **58**: 2343-2352.
9. Gomez-Mestre, I., E. Ramayo, J. Estepa, y M. Tejedo. 2004. *Developmental alterations and osmoregulatory physiology of a larval anuran under osmotic stress*. Physiol. Biochem. Zool. **77**: 267-274.
10. Beebee, T.J.C. y G. Rowe. 2000. *Microsatellite analysis of natterjack toad Bufo calamita Laurenti populations: consequences of dispersal from a Pleistocene refugium*. Biol. J. Linn. Soc. **69**: 367-381.

## 7. LECTURAS RECOMENDADAS

1. Rose, M.R. y G. V. Lauder (Eds.). 1996. *Adaptation*. Academic Press, San Diego. 575 p.
2. Feder, M.E. y W.W. Burggren (Eds.). 1992. *Environmental physiology of the amphibians*. Chicago University Press, Chicago. 646 p.