



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Reevaluación de la riqueza y límites geográficos de
las especies del grupo roseus (Alsodidae,
Eupsophus) en su distribución norte (36°-38°S)

Seminario de título presentado a la Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas para optar el título de Biólogo

Sebastián Ignacio Haeger Yáñez

Concepción, Abril de 2023

Este seminario ha sido desarrollado en el Laboratorio de Herpetología, Biodiversidad y Ecología Molecular del Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción

Profesor Guía

Dr. Claudio Correa Quezada

Profesores evaluadores

Dr. Juan Carlos Ortiz

Dr. Luis Parra Jiménez

Profesor Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, Abril de 2023

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi profesor guía, Dr. Claudio Luis Correa Quezada por su apoyo y paciencia en todo este proceso por todos sus comentarios y sugerencias. Al laboratorio de Sistemática y Conservación de Herpetozoos, guiado por el Dr. Juan Carlos Ortiz.

A un gran amigo Felipe Durán Garcés, por su ayuda y su constante apoyo, tus comentarios, revisiones y las conversaciones permitieron de igual manera verme en esta última etapa.

Y especialmente a mi madre Elsa Yáñez Gajardo, a mi padre Norberto Haeger Martínez y hermana Javiera Haeger Yáñez, quienes me han brindado el apoyo desde el primer día en que comencé todo este proceso universitario.

INDICE

1.	RESUMEN	7
2.	ABSTRACT	8
3.	INTRODUCCIÓN	9
3.1.	Área de estudio	9
3.2.	Grupo roseus	9
3.3.	Planteamiento del problema	11
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1.	Muestreo	14
4.2.	Análisis moleculares.....	14
4.3.	Análisis de estructura genética.....	15
5.	RESULTADOS	16
5.1.	Muestreo geográfico	16
5.2.	Análisis moleculares y filogenia.....	17
5.3.	Red de haplotipos	17
5.4.	Geneland.....	19
5.5.	Análisis de varianza molecular	20
5.6.	Aislamiento por distancia	20
6.	DISCUSIÓN	21
6.1.	Implicancia taxonómica	21
6.2.	Límites geográficos	23
6.3.	Efecto de las localidades intermedias	24
6.4.	Implicancias para la conservación	25
7.	CONCLUSIONES	26
8.	REFERENCIAS.....	27

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1: Comparación de las metodologías de muestreo.	32
Tabla 2: Identificador de cada localidad muestreada.	32
Tabla 3: Resultados de los índices genéticos por localidad.	33
Tabla 4: Resultados AMOVA	34
Figura 1: Ubicación geográfica de las localidades muestreadas	35
Figura 2: Árbol consenso.	37
Figura 3: Red de haplotipos.	38
Figura 4: Resultado del análisis realizado en Geneland.	39
Figura 5: Modelos de aislamiento por distancia.	40

1. RESUMEN

La taxonomía de los anfibios de Chile ha experimentado múltiples cambios y reordenamientos en el tiempo, poniendo en duda si los estudios para su determinación taxonómica y su delimitación geográfica han caracterizado correctamente su diversidad.

En la actualidad existe una controversia respecto a la diversidad del género *Eupsophus*, en donde se revalidaron especies con altos niveles de variación y una escasa diferenciación genética.

La presente investigación tiene como objetivo poner a prueba los límites geográficos y genéticos entre cuatro especies del grupo roseus con problemas de conservación, y que conforman el extremo norte de la distribución del género (36-38°), (*E. roseus*, *E. septentrionalis*, *E. contulmoensis* y *E. nahuelbutensis*), que son válidas de acuerdo con la última hipótesis propuesta por Suárez-Villota *et al* 2018.

Los análisis mostraron para la filogenia dos clados con un bajo sustento, pero con una clara segregación entre el norte y sur. Por otra parte la red de haplotipos generada mostró el efecto que tiene incluir localidades intermedias disminuyendo las distancias en los grupos definidos.

Por otra parte, se observa una baja estructuración de las especies nominales muestreadas en todo el rango latitudinal obtenida por los resultados de Geneland y AMOVA.

Se concluye que no existe congruencia mediante los análisis a partir de un marcador de ADN mitocondrial evaluando la taxonomía actual del grupo roseus en su distribución norte.

2. ABSTRACT

The taxonomy of the amphibians of Chile has undergone multiple changes and rearrangements over time, calling into question whether the studies for their taxonomic determination and geographic delimitation have correctly characterized their diversity.

Currently, there is a controversy regarding the diversity of the genus *Eupsophus*, where species with high levels of variation and little genetic differentiation have been revalidated.

The present research aims to test the geographic and genetic boundaries between four species of the roseus group with conservation problems, and that conform the northern end of the distribution of the genus (36-38°), (*E. roseus*, *E. septentrionalis*, *E. contulmoensis* and *E. nahuelbutensis*), which are valid according to the last hypothesis proposed by Suárez-Villota et al 2018.

The analyses showed for the phylogeny two clades with low sustenance, but with a clear segregation between north and south. On the other hand the generated haplotype network showed the effect of including intermediate localities decreasing the distances in the defined groups.

On the other hand, a low structuring of the nominal species sampled throughout the latitudinal range obtained by the Geneland and AMOVA results was observed.

It is concluded that there is no congruence by means of the analyses from a mitochondrial DNA marker evaluating the current taxonomy of the roseus group in its northern distribution.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Área de estudio

El bosque templado en Chile se extiende entre los 37 y 55° S aproximadamente. El valor biológico de estos ecosistemas reside en su número inusualmente alto de especies endémicas (Smith-Ramírez 2004), por lo que esta ecorregión es considerada como un hotspot de biodiversidad (Kallin *et al* 2006). Su particularidad no sólo se limita a las plantas, ya que se ha registrado que más del 60% de los anfibios y reptiles, el 20% de los peces de agua dulce y mamíferos y el 30% de las aves son endémicos de los bosques templados del sur (Tecklin *et al* 2010). Además, este ecosistema está conformado por un conjunto único de especies muy antiguas que representan elementos de origen gondwánico, mezcladas con linajes neotropicales de origen más reciente (Nahuelhual *et al* 2007, Segovia *et al* 2015). Entre los elementos faunísticos de este ecosistema se encuentra al género *Eupsophus*, un linaje de anfibios cuya distribución se restringe a las zonas boscosas entre los 35°30' y 49°25'S aproximadamente (Blotto *et al* 2013), habitando principalmente el suelo del bosque (Correa & Durán 2019). Debido a la estrecha asociación de estos anfibios a los ambientes boscosos, la diversificación y distribución geográfica de este género están íntimamente ligadas a la historia biogeográfica de los bosques templados (Suárez-Villota *et al* 2018).

3.2 El grupo roseus

El género *Eupsophus* se distribuye principalmente en el sur de Chile (35°30' – 49°25'S) y marginalmente en Argentina, pero la mayoría de las especies puede encontrarse en la Cordillera de la Costa de Chile entre 36° y 40°S (Correa *et al* 2017, Correa & Durán 2019). Actualmente, el género se compone de diez especies descritas (Suárez-Villota *et al* 2018), repartidas en dos grupos: el grupo roseus con ocho especies y el vertebralis con dos. Al igual que el género, el grupo roseus tiene el mismo rango de distribución y la mayoría de sus especies se distribuyen entre los 36° y 40°S en la zona costera.

Recientemente, se ha producido una controversia en la taxonomía del género *Eupsophus*, relacionada con el número de especies descritas en el grupo roseus

(Correa *et al* 2017, Suárez-Villota *et al* 2018). Parte de la discusión, se debe a los altos niveles de variación de los caracteres externos que se han utilizado para describir y diagnosticar a las especies, lo cual dificulta la identificación de campo de estas (Holzapfel 2007, Castro 2015, Correa *et al* 2017, Correa & Durán 2019). Otro aspecto tiene que ver con las distribuciones geográficas, que muestran un alto grado de solapamiento entre las especies del grupo *roseus* (Correa & Durán 2019, Correa 2019), si se acepta la taxonomía actual (Suárez-Villota *et al* 2018).

Desde el punto de vista taxonómico, el debate comenzó cuando Correa *et al* (2017) presentaron una nueva propuesta para el género *Eupsophus*, en la cual propusieron la sinonimia de tres especies (*E. contulmoensis*, *E. nahuelbutensis* y *E. septentrionalis*) con *E. roseus* y una (*E. altor*) con *E. migueli*, reduciendo de diez a seis el número de especies para el género. Correa *et al* (2017) también consideraron información no molecular para sustentar esas sinonimias y revisaron los rangos de distribución históricos de todas las especies, encontrando un alto grado de solapamiento.

Posteriormente, Suárez-Villota *et al* (2018) refutaron la propuesta anterior, utilizando una serie de análisis de delimitación de especies multilocus, revalidando el ordenamiento taxonómico anterior del año 2017. Finalmente, Correa & Durán (2019) realizaron una revisión histórica del género, con un énfasis en los estudios taxonómicos y sistemáticos, donde indicaron que el principal problema con la última propuesta taxonómica del género (Suárez-Villota *et al* 2018) es que solo consideró las localidades tipo para varias especies del grupo *roseus*. Asimismo, Correa & Durán (2019) revisaron detalladamente toda la información no molecular, la cual permite cuestionar la actual propuesta taxonómica.

La controversia taxonómica en el género *Eupsophus* no solo se relaciona con la riqueza de especies y sus distribuciones geográficas, sino que también tiene consecuencias para la conservación de las especies del grupo *roseus*. En efecto, las cuatro especies sinonimizadas con *E. roseus* por Correa *et al* (2017) están categorizadas En Peligro por la RCE (ver detalles en Correa 2019), principalmente por sus reducidas distribuciones geográficas. Además, *E. roseus* se considera

Vulnerable, por lo que establecer qué poblaciones pertenecen a esta especie y su rango de distribución es importante para evaluar su estado de conservación. El problema taxonómico derivado de la controversia es más acentuado en la zona norte del grupo *roseus* (36°-38°S), ya que en esa zona habría cuatro (*E. contulmoensis*, *E. nahuelbutensis*, *E. roseus* y *E. septentrionalis*) o solo una especie (*E. roseus*) dependiendo del esquema taxonómico aceptado (Correa *et al* 2017 o Suárez-Villota *et al* 2018).

3.3 Planteamiento del problema

El foco de esta investigación son las poblaciones que conforman la distribución norte del grupo *roseus* (36°-38°S), que se han asignado a cuatro especies: *E. contulmoensis*, *E. nahuelbutensis*, *E. roseus* y *E. septentrionalis*. Para poner a prueba el actual ordenamiento taxonómico de estas poblaciones y definir los límites geográficos entre ellas en ese rango latitudinal, se obtendrá información mediante un marcador de ADN mitocondrial (ADNmt) de varias localidades que abarcan la distribución de las cuatro especies y nuevas localidades no descritas. El ADNmt se ha utilizado para estudios filogenéticos y de genética poblacional, debido a que es haploide, se hereda uniparentalmente en la mayoría de los animales (Toews & Brelsford 2012) y presenta tasas de sustitución relativamente altas, por lo que ha sido particularmente útil para análisis a nivel de género y de especie (Avice 2004). Además, sus altos niveles de variación posibilitan inferir relaciones genealógicas y evolutivas entre y dentro de las poblaciones, permitiendo definir grupos genéticos (Rubinoff & Holland 2005).

Las cuatro especies que conforman actualmente el extremo norte de la distribución del grupo *roseus* (*E. contulmoensis*, *E. nahuelbutensis*, *E. roseus* y *E. septentrionalis*), que fueron revalidadas recientemente por Suárez-Villota *et al* (2018), además según indican estos autores corresponden a linajes recíprocamente monofiléticos. No obstante, Suárez-Villota *et al* (2018) incluyeron sólo especímenes de las localidades tipo de *E. contulmoensis*, *E. nahuelbutensis* y *E. septentrionalis*, y no consideraron poblaciones intermedias, por lo que actualmente se desconocen

los límites geográficos entre ellas. Entre las localidades intermedias se encuentran poblaciones de la zona del Gran Concepción, asignadas históricamente a *E. roseus* (por ejemplo, Ortiz *et al* 1990), cuyo estatus taxonómico actual es incierto siguiendo el esquema propuesto por Suárez-Villota *et al* (2018).

En síntesis, la importancia de esta investigación radica en que se evaluará si la información genética que se puede obtener con el ADNmt es congruente con el ordenamiento taxonómico propuesto por Suárez-Villota *et al* (2018) para las poblaciones que conforman la distribución norte del grupo *roseus*, que según estos autores corresponden a cuatro especies, todas las cuales se encuentran en alguna categoría de amenaza.

Hipótesis

En la zona norte de la distribución del grupo *roseus* (~36-38°S) hay cuatro linajes mitocondriales correspondientes a las cuatro especies nominales descritas en esa zona.

Predicción 1: Los linajes más divergentes de una filogenia mitocondrial de las poblaciones de la zona norte del grupo *roseus* corresponderá a las cuatro especies nominales descritas.

Predicción 2: Los cuatro linajes mitocondriales tendrán distribuciones ordenadas de norte a sur, de acuerdo con la distribución geográfica aceptada para las cuatro especies descritas de *Eupsophus* entre los 36 y 38°S.

Objetivos

Objetivo general

A) Evaluar la congruencia entre la divergencia mitocondrial y la taxonomía aceptada para las poblaciones de *Eupsophus* de la distribución norte del grupo *roseus*.

Objetivos específicos

- 1) Obtener una hipótesis filogenética de las poblaciones que conforman la distribución norte del grupo *roseus* con secuencias mitocondriales.
- 2) Estimar el grado de estructura genética entre esas poblaciones.
- 3) Establecer los límites geográficos de las agrupaciones genéticas que conforman esas poblaciones.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Muestreo

El área de estudio constituye el rango norte de la distribución del grupo *roseus* en Chile (36°-38°S), donde se ha descrito la presencia de cuatro especies nominales: *E. septentrionalis*, *E. roseus*, *E. contulmoensis* y *E. nahuelbutensis*. Se muestreó un total de quince localidades de la zona costera, ubicadas dentro de una franja orientada de norte a sur, que incluye parte (*E. roseus*) o la totalidad (*E. septentrionalis*, *E. contulmoensis* y *E. nahuelbutensis*) de las distribuciones geográficas de esas especies (Figura 1) con su respectiva tabla georreferenciada (Tabla 1).

Se obtuvieron muestras de mucosa bucal de entre 5 a 15 individuos por localidad, idealmente adultos, utilizando tómulas Copan 516CS01. Inmediatamente después de tomar las muestras, las tómulas fueron secadas con gel de sílice, siguiendo el protocolo de Gallardo *et al* (2012). Luego los ejemplares fueron liberados en el mismo sitio de captura.

4.2. Análisis moleculares

El ADN de mucosa bucal fue extraído con el kit Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System. Se amplificó por PCR un fragmento de la región control mitocondrial con los partidores ControlP-H y ControlJ2-L (Goebel *et al* 1999). La mezcla para la reacción de PCR consistió en 3mM de MgCl₂, 0,117 mM de cada dNTP, 0,117 μM de cada partidor, 1 U de Taq Polimerasa y 1μL de ADN total. El perfil térmico se inició con la desnaturalización de 94 °C por 1 minuto, seguido por 41 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 40 segundos, 50 segundos de alineamiento a 56 °C y 1 minuto de extensión a 72 °C, finalizando con 10 minutos de extensión a 72 °C.

Las secuencias de ADN de cada individuo fueron editadas usando el programa

BioEdit v7.1.3 (Hall 1999) y el alineamiento múltiple de las secuencias editadas fue realizado con el programa MUSCLE (Edgar 2004). El grado de saturación de las secuencias fue evaluado con la prueba de Xia, utilizando el programa DAMBE v5 (Xia & Xie 2001).

Las relaciones filogenéticas entre los especímenes de *Eupsophus* se estimaron mediante una inferencia bayesiana (BI) con el método Markov Chain Monte Carlo (MCMC), realizado con el programa MrBayes v3.2.1 (Ronquist *et al* 2012). El árbol filogenético fue enraizado utilizando como grupo externo un haplotipo de *Eupsophus migueli*, grupo hermano de *Eupsophus roseus*.

El análisis bayesiano se realizó con 2×10^7 iteraciones y tomando muestras cada 1000 generaciones. Posteriormente, se descartó el 25% de los árboles como burn-in y se visualizó y editó el árbol de consenso con el programa FigTree v1.3.1 (Figura 2).

Las relaciones genealógicas de los haplotipos fueron estimadas utilizando el algoritmo Median-Joining network (Bandel *et al* 1999), con el programa Network v.5 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>), se construyó la red de haplotipos con el total de localidades para evaluar si se mantienen los haplogrupos al incluir localidades intermedias.

Por último, para visualizar las relaciones de todas las especies/localidades se obtendrá una red de haplotipos con el programa PopArt (Leigh & Bryant 2015).

4.3. Análisis de estructura genética

Para definir la estructura poblacional se utilizó el programa Geneland v3.2.3, un paquete estadístico de R (Ihaka & Genleman 1996), el cual, a través de inferencia bayesiana y utilizando datos georreferenciados, asigna a los individuos a diferentes poblaciones identificando discontinuidades genéticas entre las poblaciones (Guilliot *et al* 2005). Para esto se realizaron 2×10^7 iteraciones de K=1 a 15 (número de localidades muestreadas) y muestreando cada 1000 generaciones.

Para evaluar el grado de diferenciación genética entre los diferentes grupos

obtenidos en mediante nuestra filogenia y a partir de Geneland (alcance genealógico y alcance poblacional), se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al* 1992) con el programa Arlequin3.5. Para este análisis se definieron las agrupaciones utilizando criterios genealógicos y poblacionales, los que se mencionan a continuación:

2. Se definirán los grupos correspondientes, a partir de la filogenia obtenida para las cuatro especies nominales (genealógico).
3. Mediante el programa Geneland se estimará el número más probable de poblaciones; a partir de este resultado se agruparán las distintas localidades muestreadas (poblacional).

Por último, se evaluará la estructuración de nuestras poblaciones mediante un análisis de aislamiento por distancia, entre las especies del grupo roseus correlacionando matrices de distancia genética y distancia geográfica mediante la aplicación de una prueba de Mantel, a través del paquete multiplataforma para análisis genéticos de poblaciones que se ejecuta dentro de Microsoft Excel, denominado GeneAIEX (Peakall and Smouse 2012).

5. RESULTADOS

5.1. Muestreo geográfico.

El muestreo desarrollado en el presente trabajo aumenta el número de localidades respecto a las investigaciones taxonómicas aplicadas con anterioridad para las especies del género *Eupsophus*, considerando solo la distribución norte (36° - 38°S) (Tabla 1) mostrando un aumento de 6 localidades con respecto a Correa *et al* (2017), y 12 respecto de Suárez-Villota *et al* (2018). De acuerdo con el número de individuos muestreados en promedio esta investigación también supone un incremento por localidad muestreada respecto a Correa *et al* (2017).

5.2. Análisis moleculares y filogenia.

El alineamiento de las 162 secuencias de la región control del género *Eupsophus* tuvo una longitud total de 544 sitios nucleotídicos, incluyendo sitios con gaps. La prueba de Xia indicó que las secuencias de la región control no presentan señales de saturación.

La topología obtenida muestra dos clados, los dos clados agrupan en sentido norte a sur a las especies *E. septentrionalis* más *E. roseus* (Grupo norte) y *E. nahuelbutensis* más *E. contulmoensis* (Grupo sur) (figura 2).

En el grupo norte (pp: 0,54) se observa un buen sustento en algunas ramas internas, para la especie *E. septentrionalis* (pp= 0,87), respecto a *E. roseus* (pp: 0,92), el clado también presenta un buen sustento. Ninguna de las localidades dentro del grupo norte se comparte. De acuerdo con las localidades sin Identificación (Cerro Cayumanque) esta no se encuentra asociada a ninguna de las ramas internas y por otra parte se observan localidades formando politomías, por tanto, no se encuentra resuelto en su totalidad. Por último, la localidad sin identificación (Santa Juana) al igual que Ramadillas se asocian al clado conformado por las localidades a las que históricamente se ha descrito a la especie *E. roseus*.

En relación con el grupo sur (pp= 0,86) podemos observar que las localidades en las que se describieron las dos especies se encuentran conformando una politomía al igual que el grupo norte, no obstante, se observan tres clados con un buen sustento compartiendo localidades de las especies descritas en Nahuelbuta, se observa que las secuencias de Contulmo (pp: 0,98) se encuentran anidadas dentro de las secuencias de Nahuelbuta. Finalmente, se observa la asociación de la localidad sin identificación (La sirena), con las secuencias de Nahuelbuta.

5.3. Red de haplotipos

Respecto a la red de haplotipos (Figura 3) construida se puede mencionar lo siguiente:

Se consideró para las 15 localidades utilizadas tres categorías; La primera categoría son las cuatro especies nominales a las que se le asignó un color (*E. septentrionalis*:

amarillo; *E. roseus*: rojo, *E. nahuelbutensis*: verde, *E. contulmoensis*: purpura), la segunda categoría incluye con un color azul a las localidades en donde no se ha descrito a la especie perteneciente al grupo *roseus*. Por último, se incluye con un color naranja a la localidad de Ramadillas, ya que en este sitio se ha descrito la existencia de las especies *E. nahuelbutensis* y *E. contulmoensis* (Ortiz and Ibarra-Vidal 2005).

Una vez definido esto se obtuvo el ordenamiento que se expone en la figura 3. La red fue ordenada de norte a sur asumiendo la distribución de las cuatro especies dentro de este rango latitudinal según bibliografía, además se confeccionó una tabla (Tabla 3) indicando las localidades con sus valores de diversidad genética (diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica) e indicando la asignación por especie, finalmente se muestra el número total de haplotipos igual a 75.

Así, la primera agrupación de haplotipos que se observa son los haplotipos de la especie *E. septentrionalis* (amarillo), los que corresponden a dos localidades muestreadas R.N Los Queules (Suárez-Villota *et al* 2018; Correa *et al* 2017) que corresponde a la localidad tipo para la especie y Estero Manqui (Trehuaco), no se incluyen localidades sin id dentro de esta agrupación. Se distingue que las localidades descritas para esta especie se encuentran separadas por un total de 3 pasos mutacionales siendo esta la mayor diferenciación dentro de este grupo, no se observan haplotipos compartidos entre estas dos localidades, ni con las localidades en donde se describen otras especies presentando un mayor número de haplotipos privativos.

Respecto a nuestra segunda agrupación correspondiente a *E. roseus*, se caracteriza por presentar el mayor número de localidades (4), Hualpén, Camino a Einstein (Concepción), Sector Redolino (Nonguén), Los Guindos (San Pedro de la Paz), en donde se incluyen además las localidades sin id (3), estas son Cerro Cayumanque, Cerros de Chiguayante, Santa Juana. Respecto a los haplotipos encontramos que estos se comparten entre Nonguén, Concepción y Chiguayante, también entre, Santa Juana, Los Guindos y Nonguén. Por último, se distinguen dos grupos extremos, el de Cerro Cayumanque que se distancia a 4 pasos mutacionales y un grupo que integra a cuatro localidades (Ramadillas, Santa Juana, Los Guindos y Nonguén) que presenta un total de 5 pasos mutacionales. No obstante, se observa

un total de pasos mutacionales (4 y 6 respectivamente) igual o mayor dentro de estos grupos.

La tercera agrupación comprende las localidades en donde se ha descrito a las especies *E. nahuelbutensis*, siendo P.N. Nahuelbuta la localidad tipo (Suárez-Villota *et al* 2018; Correa *et al* 2017) se incluye además a Chacay y por último La Sirena como localidad sin identificación. Se observan haplotipos compartidos entre Chacay y P.N. Nahuelbuta. Se distingue también un mayor número de pasos mutacionales dentro del grupo definido para esta especie (12 pasos mutacionales) comparado con los pasos mutacionales que lo separan con las especies *E. contulmoensis* (6 pasos mutacionales) en el sur y *E. roseus* más *E. septentrionalis* (9 pasos mutacionales) hacia el norte.

Nuestra última agrupación considera las localidades en donde se ha descrito a la especie *E. contulmoensis*, siendo esta M.N Contulmo (Suárez-Villota *et al* 2018; Correa *et al* 2017) y se incluye la EX R.F Contulmo. Se puede observar que existen haplotipos compartidos entre ambas localidades, existiendo un bajo número de pasos mutacionales (4 pasos mutacionales) respecto a los que lo separan del grupo de la especie *E. nahuelbutensis* (6 pasos mutacionales).

5.4. Geneland

El número de poblaciones genéticas obtenidas por Geneland fue de $K=8$ (Figura 5), pero con un bajo valor de probabilidad a posteriori (0,3).

En relación con las ocho poblaciones obtenidas se puede indicar que los valores de pertenencia más altos no sobrepasaron el 20% (Pop 1, Pop 5 y Pop 6). Respecto a estas ocho poblaciones sólo dos relacionaron localidades en donde se describió una especie del grupo roseus (Pop 3: *E. nahuelbutensis* y Pop 5: *E. contulmoensis*). Solo una población asocia localidades en donde se describió una especie con una localidad sin identificación a nivel de especie. (Pop 1: Concepción, Nonguén y Chiguayante). Por último, se obtuvieron tres poblaciones con localidades sin identificación a nivel de especies (Pop 4: Santa Juana, Pop 8: La Sirena y Pop 6: Cerro Cayumanque).

5.5. Análisis de varianza molecular

Se realizaron dos análisis AMOVA (Tabla 2) en los que se agruparon las localidades muestreadas siguiendo dos criterios. Respecto al primer análisis, correspondiente a la filogenia, se obtuvo que el 37,72% de la varianza fue explicada por los grupos definidos a partir de la filogenia de haplotipos, mientras que el porcentaje de variación entre poblaciones dentro de cada grupo y dentro de las poblaciones fue de 42,68% y 19,60% respectivamente. Las tres fuentes de variación presentaron índices de fijación significativos.

Y respecto al segundo criterio se obtuvo el ordenamiento a partir de los resultados de GENELAND, se obtuvo que el 45,17% de la varianza fue explicada por los ocho grupos definidos, en tanto, el porcentaje de variación entre poblaciones dentro de cada grupo y dentro de las poblaciones fue de 31,08% y 23,75% respectivamente, las tres fuentes de variación presentaron índices de fijación significativos.

El AMOVA muestra que el mayor valor de variación entre grupos obtenidos lo presenta el Geneland, en comparación a los resultados obtenidos con la filogenia. Sin embargo, ningún ordenamiento maximiza a tal punto la varianza entre grupos para ser considerado por sobre el otro.

5.6. Aislamiento por distancia

Se realizó la comparación de matrices de distancia genética y geográfica, a partir de las localidades muestreadas por Suárez-Villota *et al* 2018 y la inclusión de localidades intermedias (Figura 4). El ajuste de los datos para la primera correlación (Suárez-Villota *et al* 2018) mantiene un R^2 : 0,88, sin embargo, para este análisis el resultado no es significativo, lo que puede ser útil para comprender la dinámica genética y poblacional en el espacio.

Respecto a la segunda matriz nuestro resultado indica un menor ajuste (R^2 : 0,33) pero significativo, la correlación de matrices mostró que en las primeras clases de distancia (<50km) se observa una determinada distancia genética (0,007-0,685 aproximadamente), posterior esta distancia genética tiende a estabilizarse entre un rango de distancia.

6. DISCUSIÓN

Dentro de la última década se ha generado una controversia taxonómica con respecto a las especies del género *Eupsophus*, específicamente las que componen el grupo *roseus* (Correa *et al* 2017, Suárez-Villota *et al* 2018, Correa & Durán 2019). La última investigación sobre el género incluyó un mayor número de loci, al incorporar marcadores nucleares a los análisis de delimitación de especies, sin embargo, las localidades utilizadas se restringen a las localidades tipo de las especies nominales, sin incluir las localidades intermedias descritas previamente por Correa *et al* 2017.

En esta investigación se aborda el efecto del muestreo geográfico (número de localidades) sobre la actual propuesta taxonómica del género *Eupsophus*, poniendo énfasis en el rango norte de su distribución (36-38°S), donde se distribuye la mayor parte de las especies del grupo *roseus*.

En este estudio se aumentó el número de localidades muestreadas en comparación a los trabajos previos donde se aborda la problemática taxonómica (Correa *et al* 2017; Suárez-Villota *et al* 2018). De las cuales cuatro corresponden históricamente a la especie descrita como *E. roseus*, otras cuatro a las que no se ha podido dar identificación a nivel de especie y por último una localidad en donde se describió a dos especies del grupo *roseus* (*E. nahuelbutensis* y *E. contulmoensis*). Por lo tanto, esta investigación presenta un mayor número de localidades, lo que permitió evaluar con mayor precisión las relaciones dentro de este grupo.

6.1. Implicancias taxonómicas

La presente investigación muestra que en la zona de estudio no se detectó estructuración genética utilizando marcadores mitocondriales, por consiguiente, no se comprueba la reciprocidad monofilética, descartando la existencia de cuatro linajes independientes en este rango latitudinal (e.g. especies).

En el análisis filogenético solo se obtuvieron dos grupos (Norte & Sur), con bajo sustento. Por lo tanto, no detectó la estructuración congruente con la propuesta taxonómica actual. Así mismo para el análisis de red de haplotipos se observó que

los pasos mutacionales entre las especies definidas eran igual o mayor que los pasos mutacionales dentro los grupos. De acuerdo con el Geneland se obtuvieron ocho poblaciones dentro del área de estudio, sin embargo, presentaban una baja probabilidad a posteriori.

Con el presente estudio los análisis llevados a cabo sugieren que la riqueza de especies es menor a la descrita, debido a que las localidades intermedias indeterminadas muestran que este esquema de especies aisladas no refleja adecuadamente la distribución del género (Correa & Durán 2019), no obstante se distingue en los análisis filogenéticos y de red de haplotipos la existencia de segregación geográfica leve.

Correa *et al* 2017, mediante una propuesta conservadora, proponen a partir de los análisis y bibliografía utilizada (filogenéticos, divergencia genética, cromosómicas y bioacústicas), que las especies del género no pueden ser diagnosticadas por ningún carácter fenotípico conocido, lo que corresponde según ellos a la falta de caracteres de diagnóstico coherentes y fiables, debilitando las evidencias utilizadas para distinguir algunas especies, particularmente aquellas cuyo diagnóstico descansa casi exclusivamente en estos caracteres (Correa & Durán 2019), por lo tanto, la taxonomía utilizada para describir a las especies que se distribuyen entre los 36-38°S en la presente investigación no son congruentes, ya que en general se observa una baja estructuración genética.

Además, existen discrepancias asociadas a la literatura y la taxonomía que forman parte de los problemas de identificación de las especies del grupo *roseus*, en relación con el presente estudio se expone el caso de Ramadillas ya que, según bibliografía se han descrito dos especies, *E. nahuelbutensis* y *E. contulmoensis* (Ortiz & Ibarra-Vidal 2005; Úbeda & Núñez 2006). Los haplotipos obtenidos de esta localidad se encuentran más emparentados con las localidades que se han descrito históricamente para la especie *E. roseus*.

Según Correa & Durán 2019, el área de distribución de *E. roseus* es la más difícil de definir a partir de la literatura, ya que sus límites difieren en muchas fuentes y se han descrito cuatro especies dentro de la misma en Chile, incluyéndola además en las localidades tipo de algunas especies del género, por ejemplo, en la distribución de *E. septentrionalis* y en la cordillera de Nahuelbuta, por lo tanto para dar resolución

a la controversia o parte de esta, es necesario incluir muestras de los sitios en donde se ha descrito.

Estos antecedentes refuerzan la idea de que la taxonomía utilizada para las especies del grupo *roseus* descritas entre los 36-38°S no es congruente, exponiendo una de las problemáticas del grupo que refiere al solapamiento en los rangos de distribución y a la dificultad de identificar a las especies del grupo (Correa & Durán 2019).

6.2. Límites geográficos

Correa *et al* 2017 presentaron una propuesta de delimitación de las especies del grupo *roseus* presentando de manera explícita los rangos de distribución dentro del género, simplificando el esquema biogeográfico del grupo.

Por otra parte, Suárez-Villota *et al* (2018) al validar las especies del género *Eupsophus* exponen que los periodos de divergencia de las especies del grupo *roseus* son un producto de los ciclos de glaciaciones, siendo afectadas por el último máximo glacial (0,020 – 0,014 M). Sin embargo, no se propone un mecanismo que pudiera explicar la formación de las especies y no se propone una actualización de los rangos de distribución asumiendo el alto grado de superposición.

Durán (2017), en su tesis de pregrado, propuso tres refugios glaciares para el género, siendo estos, Península de Arauco, Cordillera de Nahuelbuta y el rango costero valdiviano, la importancia de los refugios para este grupo es que intensificaron la estructuración genética de la población. (asume la sinonimización de especies por Correa *et al* 2017).

Otro ejemplo en donde tampoco se describieron procesos de especiación es en Núñez *et al* (2011) mediante el estudio de la especie hermana del grupo *roseus*, *E. calcaratus*, donde evaluaron los efectos generados por los cambios climáticos a lo largo del Pleistoceno, concluyendo que solo generaron profundos efectos en los patrones genéticos de este taxón (estructuración genética de sus poblaciones), por lo tanto, si no se describieron patrones de especiación en altas latitudes donde el efecto de la glaciación fue mayor, es correcto cuestionar, ¿por qué esto ocurría en latitudes donde hubo menor afectación producto de las glaciaciones?.

Otros antecedentes son los descritos por Ortiz & Ibarra-Vidal (2005) para las especies que encontramos en la cordillera de Nahuelbuta, en que indicaron que sus rangos de distribución se encuentran determinados por la altitud (*E. contulmoensis*: 20-800 m; *E. nahuelbutensis*: 900-1500 m), esta descripción también es refutada en la presente investigación, ya que de ser así se esperaba un patrón de estructuración entre sus poblaciones.

Por otra parte, se evaluó a partir de la distribución de nuestras localidades, la influencia del río Biobío como una barrera geográfica. Cisternas 2022, en su tesis de doctorado, obtuvo la separación de dos grupos genéticos para la especie *B. taeniata*. De acuerdo con esta propuesta y lo análisis llevados a cabo en este estudio podemos mencionar que para el grupo *roseus* la influencia del río Biobío no genera tal diferenciación debido a la baja estructuración detectada.

El análisis de la controversia taxonómica en un contexto biogeográfico propone que la gran variación entre grupos no es suficiente para considerarlas especies distintas, la variación genética es de esperar porque los anfibios son especies que tienen una capacidad de dispersión restringida que tiende a promover la diferenciación, por lo que suelen presentar una mayor estructura genética en sus poblaciones respecto a otros vertebrados (Semlitsch & Skelly 2007).

De acuerdo con la presente investigación la baja estructuración obtenida, sugiere que en el rango de distribución norte del grupo *roseus*, existen al menos dos agrupaciones genéticas las que podemos identificar como *E. septentrionalis* (Norte) y *E. contulmoensis* (Sur), por consiguiente incluir secuencias de la localidad tipo de *E. roseus* (Valdivia) aportaría en la resolución de la filogenia obtenida en esta investigación.

6.3. Efecto de las localidades intermedias

La principal discrepancia entre Correa *et al* 2017 y Suárez-Villota *et al* 2018, son el número de loci utilizados y el número de localidades muestreadas. En este estudio se evaluó la controversia para las especies del grupo *roseus* utilizando una metodología que considera el efecto de la geografía.

Las localidades intermedias permitieron observar una baja estructuración dentro de

las poblaciones definidas para las tres especies consideradas actualmente como válidas. Además, el análisis de aislamiento por distancia reveló que la distancia genética alcanza valores máximos a una distancia geográfica de aproximadamente 50 km.

La dispersión es un proceso fundamental en la demografía de los organismos, ya que determina la colonización y persistencia en hábitats fragmentados y define la capacidad de intercambio genético entre poblaciones (Hillman *et al* 2014). Este efecto de la distancia en los anuros se ve limitado ya que requieren condiciones ambientales específicas, como baja temperatura, alta humedad relativa y agua libre, para equilibrar un balance hídrico (Hillman *et al* 2014).

Respecto a lo anteriormente mencionado, el modelo de aislamiento por distancia permitió hallar un rango máximo de dispersión de las especies del grupo *roseus* el cual se sugiere aplicar para poder eliminar el sesgo de muestreo, y así evitar captar estructuración producto de la distancia geográfica.

Por lo tanto, se encontró que una de las incongruencias de acuerdo con la propuesta taxonómica actual se debe a un bajo número de localidades muestreadas por Suárez-Villota *et al* 2018 utilizadas para revalidar las especies del género, debido a las distribuciones poco conocidas de las diferentes especies del género *Eupsophus* en este rango latitudinal (36-38°S), ya que solo se consideran las localidades tipo y sectores cercanos.

6.4. Implicancias para la conservación

De acuerdo con la RCE, las tres especies validadas se encuentran con categoría de amenaza, debido a los reducidos rangos de distribución que están presentan (*E. septentrionalis*; *E. nahuelbutensis* y *E. contulmoensis*) considerándolas En Peligro (EN), por otra parte *E. roseus* según la RCE se encuentra amenazada, pero es considerada Vulnerable (VU).

En el presente estudio los resultados siguieren que la riqueza de especies del grupo *roseus* se encuentra sobrestimada, ya que no se encontró evidencia filogenética y filogeográfica que permita aceptar la propuesta taxonómica actual.

Correa *et al* 2017 presentaron una visión más conservadora para el grupo. Por lo

tanto, el reordenamiento de los rangos de distribución y la sinonimización de especies propuesta por estos autores es la más congruente y concuerda con la taxonomía del género. No obstante, una de las debilidades del presente estudio es que no se incluyó la localidad tipo para la especie *E. roseus*, utilizada para sinonimizar las especies actualmente validadas.

Se sugiere para futuros trabajos la adición de un mayor número de localidades (e.g. localidades tipo de *E. roseus*, nuevas localidades de *E. nahuelbutensis* y *E. contulmoensis*, (Castro-Carrasco & Ortiz 2019) que ayuden a una mejor resolución sobre los límites entre grupos y que aportaría al desarrollo de estrategias de conservación.

7. CONCLUSIONES

No se encontró evidencia de acuerdo con la hipótesis taxonómica actual que valida las tres especies del grupo *roseus* en su distribución norte (36-38°S).

Los linajes mitocondriales que corresponden a las cuatro especies nominales evaluadas no presentaron un ordenamiento de norte a sur como se había propuesto utilizando marcadores mitocondriales, por consiguiente, la delimitación de sus rangos de distribución debe ser evaluada utilizando análisis de delimitación de especies con un mayor número de loci.

Se encontró fuerte evidencia del efecto que producen las localidades intermedias en la estructuración de las poblaciones, siguiendo la metodología de muestreo aplicada por Correa *et al* 2017. En relación con este hallazgo, se sugiere en futuras investigaciones considerar la utilización de un mayor número de loci, principal mérito de Suárez-Villota *et al* 2018 e incluir localidades dentro del rango mínimo de distancia geográfica (<50km) obtenido en esta investigación.

Finalmente, estos resultados son un aporte para la conservación de la batracofauna en Chile, principalmente de las especies de la familia Alsodidae, que presentan los mayores valores de endemismo dentro de los anuros de Chile, por lo tanto, es de suma importancia comprender la riqueza de especies presente este grupo estrechamente vinculado al bosque templado, lugar que concentra altos niveles de biodiversidad, pero a la vez un estado avanzado de transformación y progresiva fragmentación.

8. REFERENCIAS

Avise JC, 2004, *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)*, Sinauer, Sunderland, MA, 684 pp.

Blanco G, Morinha F, Roques S, 2021, Fine-scale genetic structure in the critically endangered red-fronted macaw in the absence of geographic and ecological barriers, *Sci Rep* 11, 556.

Blotto BL, Nuñez JJ, Basso NG, Úbeda CA, Wheeler WC & Faivovich J, 2013, Phylogenetic relationships of a Patagonian frog radiation, the *Alsodes* - *Eupsophus* clade (Anura: Alsodidae), with comments on the supposed paraphyly of *Eupsophus*, *Cladistic*, 29(2), 113–131.

Castro C, 2015, Reevaluación del estatus taxonómico de *Eupsophus roseus* (Duméril & Bibron, 1841) (Anura: Alsodidae) (Tesis magister), Universidad de Concepción, Concepción.

Castro-Carrasco C & JC Ortiz (2019) Actualización de la taxonomía, distribución y riqueza de especies de anfibios de la cordillera de Nahuelbuta. En: Smith-Ramírez, C & FA Squeo (Eds) *Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile*, pp. 125-136. Editorial Universidad de Los Lagos, Osorno, Chile.

Correa C, 2019, Nueva lista comentada de los anfibios de Chile (Amphibia, Anura), *Boletín Chileno de herpetología*, 6, 1-14.

Correa C & Durán F, 2019, Taxonomy, systematics and geographic distribution of ground frogs (Alsodidae, *Eupsophus*): a comprehensive synthesis of the last six decades of research, *Zookeys*, 863, 107–152.

Correa C, Vásquez D, Castro-Carrasco C, Zúñiga-Reinoso Á, Ortiz J. C, Palma R. E, 2017, Species delimitation in frogs from South American temperate forests: The case of *Eupsophus*, a taxonomically complex genus with high phenotypic variation, *Plos one*, 12(8)

Edgar RC, 2004, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.

Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM, 1992, Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics*, 131(2), 479-491.

Gallardo CE, Correa C, Morales P, Sáez P.A, Pastenes L, & Méndez M.A, 2012, Validation of a cheap and simple nondestructive method for obtaining AFLPs and DNA sequences (mitochondrial and nuclear) in amphibians, *Molecular ecology resources*, 12(6), 1090-1096.

Guilliot G, Mortier F & Estoup A, 2005, Geneland: a computer package for landscape Genetics, *Molecular Ecology resources*, 5(3), 712-715.

Hall T A, 1999, BioEdit - a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic acids symposium Series*, 41, 95-98.

Hillman S, Drewes R, Hedrick M & Hancock T, 2014, Physiological Vagility: Correlations with Dispersal and Population Genetic Structure of Amphibians, *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(1), 105–112.

Holzapfel C, 2007, Diferenciación Haplotípica de *Eupsophus roseus* (Anura: Neobatrachia) a través de Secuencias Nucleotídicas de la Región Control Mitocondrial (Tesis de Grado), Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Cisternas I, 2022, Filogeografía de *Batrachyla taeniata* (Girard, 1855) e influencia del paisaje sobre la estructura genética de sus poblaciones.

Kalin M, Marquet P, Marticorena C, Simonetti J, Cavieres L, Squeo F, 2006, El hotspot chileno, prioridad mundial para la conservación, *Diversidad de Ecosistemas, Ecosistemas Terrestres*, in *Diversidad de Chile, Patrimonios y Desafíos*, 94-97.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, & Tamura K. 2018, MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549.

Leigh JW & Bryant D, 2015, PopART: Full-feature software for haplotype network construction, *Methods in ecology and evolution* 6(9), 1110–1116.

Nahuelhual L, Donoso P, Lara A, Nuñez D, Oyazún C & Neira E, 2006, Valuing ecosystem services of Chilean temperate rainforests, *Environment, Development and Sustainability*, 9(4), 481–499.

Nuñez JJ, 2003, Taxonomía y sistemática de las ranas del género *Eupsophus* (Leptodactylidae), PhD Thesis, Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile.

Nuñez JJ, Wood N, Rabanal F, Fontanella F & Sites J, (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(2), 343–352.

Ortiz JC, Ibarra-Vidal H, 2005, Anfibios y reptiles de la Cordillera de Nahuelbuta. In: Smith-Ramírez C, Armesto JJ, Valdovinos C (Eds) *Historia, Biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, 427–440.

Peakall R & Smouse PE, 2012, GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539.

Popescu V & Gibbs J, 2009, *Amphibian Ecology and Conservation*.

Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres D.L, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard M.A & Huelsenbeck J.P, 2012, MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space, *Systematic Biology*, 61, 539–542.

Rubinoff D & Holland B, 2005, Between Two Extremes: Mitochondrial DNA is neither the Panacea nor the Nemesis of Phylogenetic and Taxonomic Inference, *Systematic biology*, 54(6), 952–961.

Segovia R & Armesto J, 2015, The Gondwanan legacy in South American biogeography, *Journal of biogeography*, 42(2), 209–217.

Semlitsch R & Skelly DK, 2007, Ecology and conservation of pool breeding

amphibians (Calhoun AJK & D. PG Eds.). London: CRC Press.

Skorupski J, Michaux J, Śmietana P, 2021, A Meta-Analytical Investigation of the Gap between Measured and Predicted Inter-Population Genetic Diversity in Species of High Conservation Concern—The Case of the Critically Endangered European Mink *Mustela lutreola* L, 1761, *Genes*, 12(10):1555.

Smith-Ramírez C, 2004, The Chilean coastal range: a vanishing center of biodiversity and endemism in South American temperate rainforests, *Biodiversity and conservation*, 13(2), 373–393.

Suárez-Villota EY, Quercia CA, Díaz LM, Vera-Sovier V, Nuñez JJ, 2018, Speciation in a biodiversity hotspot: Phylogenetic relationships, species delimitation, and divergence times of Patagonian ground frogs from the *Eupsophus roseus* group (Alsodidae), *Plos one*, 13(12).

Tecklin D, Dellasala D, Luebbert F & Pliscoff P, 2010, Valdivian Temperate Rainforests of Chile and Argentina, Island press, Washington DC, 132-153.

Templeton AR, Crandall KA, Sing CF, 1992, A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III Cladogram estimation, *Genetics*, 132(2), 619-633.

Toews D & Brelsford A, 2012, The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals, *Molecular ecology*, 21(16), 3907–3930.

Úbeda C & Nuñez J, 2006, New parental care behaviours in two telmatobiine genera from temperate Patagonian forests: *Batrachyla* and *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae), *Amphibia-Reptilia*, 27(3), 441–444.

Zeisset I, Beebee T, 2008, Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101, 109–119.

Tabla 1: Comparación entre las metodologías de muestreo entre las investigaciones llevadas a cabo para las especies del grupo roseus en su distribución norte (36°-38°S). DE: Desviación estándar; Rango: Rango de Muestras de individuos por localidad.

Fuentes	N° localidades	Promedio individuos/localidad	DE	Rango
Correa <i>et al</i> 2017	9	2,9	1,2	[1-5]
Suárez-Villota <i>et al</i> 2018	3	8,6	1,5	[7-10]
Investigación	15	9,4	4,7	[3-16]

Tabla 2: Se indican las localidades utilizadas con su respectivo código, las especies identificadas por distribución y su respectiva georreferenciación.

Número	Localidad	Código	Especies	Latitud S	Longitud
1	R.N. Los Queules	ESQE+LQ	<i>E. septentrionalis</i>	35°59'12.06"	72°41'23.59"
2	Trehuaco	Tre	<i>E. septentrionalis</i>	36°23'50.96"	72°44'17.42"
3	Cerro Cayumanque	Cay	<i>Eupsophus</i> sp.	36°42'12.49"	72°30'21.57"
4	Hualpén	Hua	<i>E. roseus</i>	36°47'32.73"	73° 9'32.80"
5	Camino Einstein	CE	<i>E. roseus</i>	36°50'26.71"	73° 1'27.42"
6	Los Guindos	LG	<i>E. roseus</i>	36°53'11.20"	73° 7'13.82"
7	Nonguén	Non	<i>E. roseus</i>	36°53'47.22"	72°59'22.10"
8	Cerros de Chiguayante	Ecfr	<i>Eupsophus</i> sp.	36°56'8.00"	73° 0'4.00"
9	Santa Juana	SJ+ Sju	<i>Eupsophus</i> sp.	37°11'3.61"	72°55'45.98"
10	Ramadillas	Ram	<i>E. nahuelbutensis</i> + <i>E. contulmoensis</i>	37°18'39.15"	73°15'2.68"
11	La Sirena	Lsi	<i>Eupsophus</i> sp.	37°34'27.36"	73° 1'10.69"

Número	Localidad	Código	Especies	Latitud S	Longitud
12	Chacay	Cha	<i>E. nahuelbutensis</i>	37°48'5.60"	73° 2'45.46"
13	P.N. Nahuelbuta	Nah+EnPNN+P NN+ENNA	<i>E. nahuelbutensis</i>	37°49'23.25"	73° 2'7.03"
14	M.N. Contulmo	EcoMNC+MNC +ECCO	<i>E. contulmoensis</i>	38° 0'46.60"	73°11'5.44"
15	EX R.F. Contulmo	ERC	<i>E. contulmoensis</i>	38° 1'45.20"	73°12'10.09"

Tabla 3 Resultados de los índices genéticos para las localidades muestreadas, se presentan el número de haplotipos (H); diversidad haplotípica (Hd); diversidad nucleotídica (pi) y las especies por localidad.

Localidad	Hd	Pi	N° Haplotipos	Especies
Los Queules	0,795	0,00264	6	<i>E. septentrionalis</i>
Trehuaco	0,7	0,00221	3	<i>E. septentrionalis</i>
Cerro Cayumanque	0,733	0,00337	5	SP
Hualpén	0,607	0,00191	3	<i>E. roseus</i>
Concepción	0,848	0,00517	6	<i>E. roseus</i>
Nonguen	0,667	0,00587	5	<i>E. roseus</i>
Cerros de Chiguayante	0,533	0,00098	2	SP
San Pedro	0,889	0,00957	6	<i>E. roseus</i>
Santa Juana	0,342	0,00103	3	SP
Ramadillas	0,9	0,00663	4	<i>E. nahuelbutensis</i> + <i>E. contulmoensis</i>
La Sirena	0,894	0,01062	8	SP
Chacay	0,844	0,01082	6	<i>E. nahuelbutensis</i>

Localidad	Hd	Pi	N° Haplotipos	Especies
P.N. Nahuelbuta	0,924	0,01147	8	<i>E. nahuelbutensis</i>
M.N. Contulmo	0,911	0,0045	7	<i>E. contulmoensis</i>
Ex R.F. Contulmo	0,425	0,00083	3	<i>E. contulmoensis</i>

Tabla 4: Resultados de AMOVA para los dos criterios definidos, se muestran los grados de libertad (g.de. l) e índices de fijación. * indica un valor significativo ($p < 0,005$).

1) Resultados a partir de los grupos obtenidos mediante la filogenia construida.

Fuente de variación	g. de.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación
Entre grupos	1	457.368	5.07350 Va	37.62	FCT: 0.37724*
Entre poblaciones dentro de los grupos	13	830.605	5.73955 Vb	42.68	FSC: 0.68528*
Dentro de las poblaciones	148	390.113	2.63590 Vc	19.60	FST: 0.80401*
Total	162	1678.086	13.44895		

2) Resultados a partir de los grupos obtenidos mediante Geneland.

Fuente de variación	g.de.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación
Entre grupos	7	1028.963	5.11973 Va	45.17	FCT: 0.45166*
Entre poblaciones dentro de los grupos	6	217.684	3.52328 Vb	31.08	FSC: 0.56683*
Dentro de las poblaciones	144	387.713	2.69245 Vc	23.75	FST: 0.76248*

Fuente de variación	g.de.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación
Total	157	1634.361	11.33547		

Figura 1: Ubicación geográfica de las localidades muestreadas en este estudio. Se muestran en color las especies nominales (Amarillo: *E. septentrionalis*; Rojo: *E. roseus*; Verde: *E. nahuelbutensis*; Morado: *E. contulmoensis*; Azul: Localidades con especies indeterminadas; Anaranjado: Ramadillas), las estrellas reflejan las localidades tipo de las tres especies nominales.

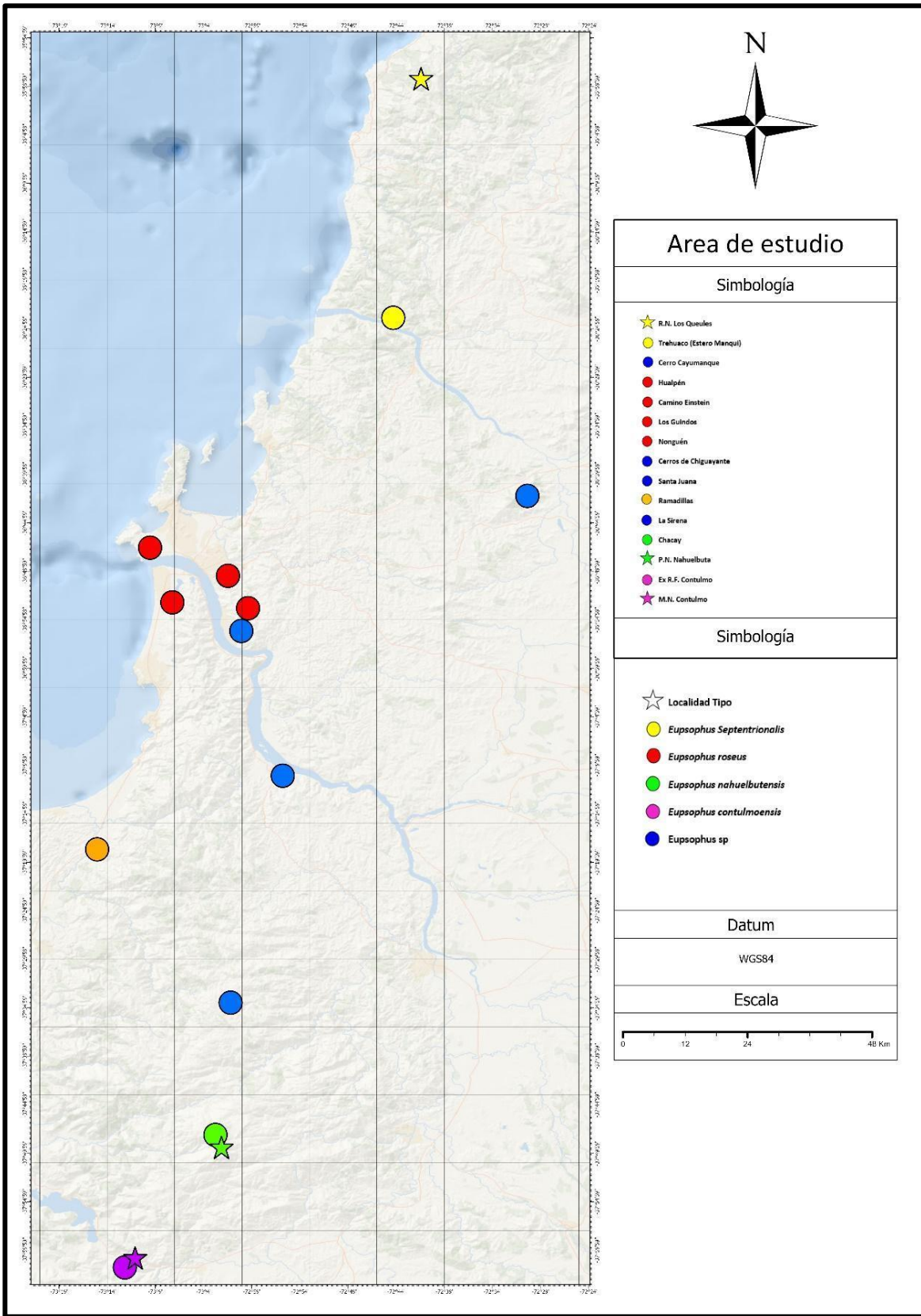


Figura 2: Árbol de consenso bayesiano obtenido con la región control mitocondrial para las localidades de las especies del grupo roseus en su distribución norte, mostrando un bajo sustento y las politomías. Respecto a los grupos se sigue la misma identificación por colores (Amarillo: *E. septentrionalis*; Rojo: *E. roseus*; Verde: *E. nahuelbutensis*; Morado: *E. contulmoensis*; Azul: Localidades con especies indeterminadas; Anaranjado: Ramadillas).

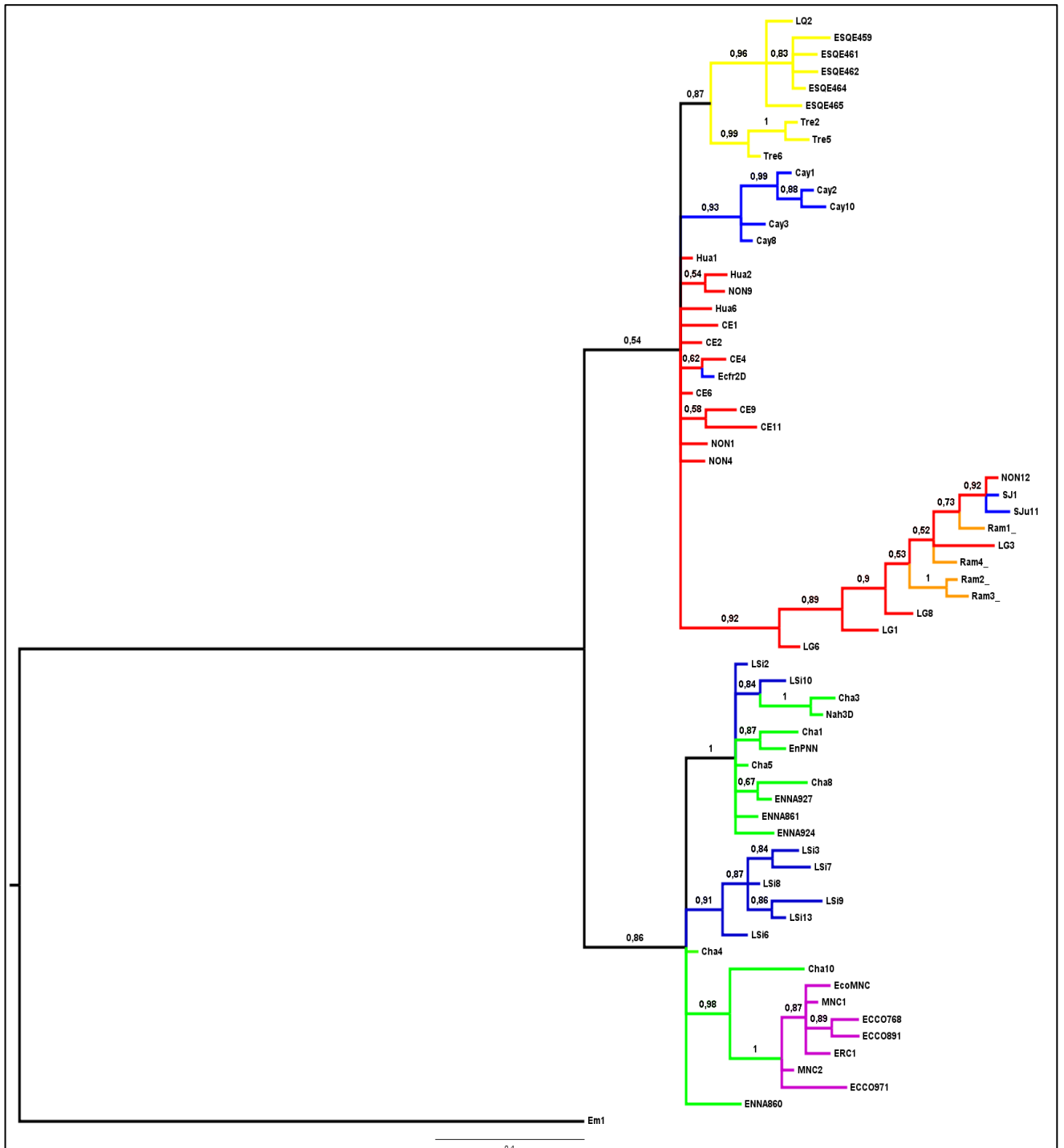


Figura 3: Red de haplotipos generada para las localidades muestreadas. Respecto a los grupos se sigue la misma identificación por colores (Amarillo: *E. septentrionalis*; Rojo: *E. roseus*; Verde: *E. nahuelbutensis*; Morado: *E. contulmoensis*; Azul: Localidades con especies indeterminadas; Anaranjado: Ramadillas).

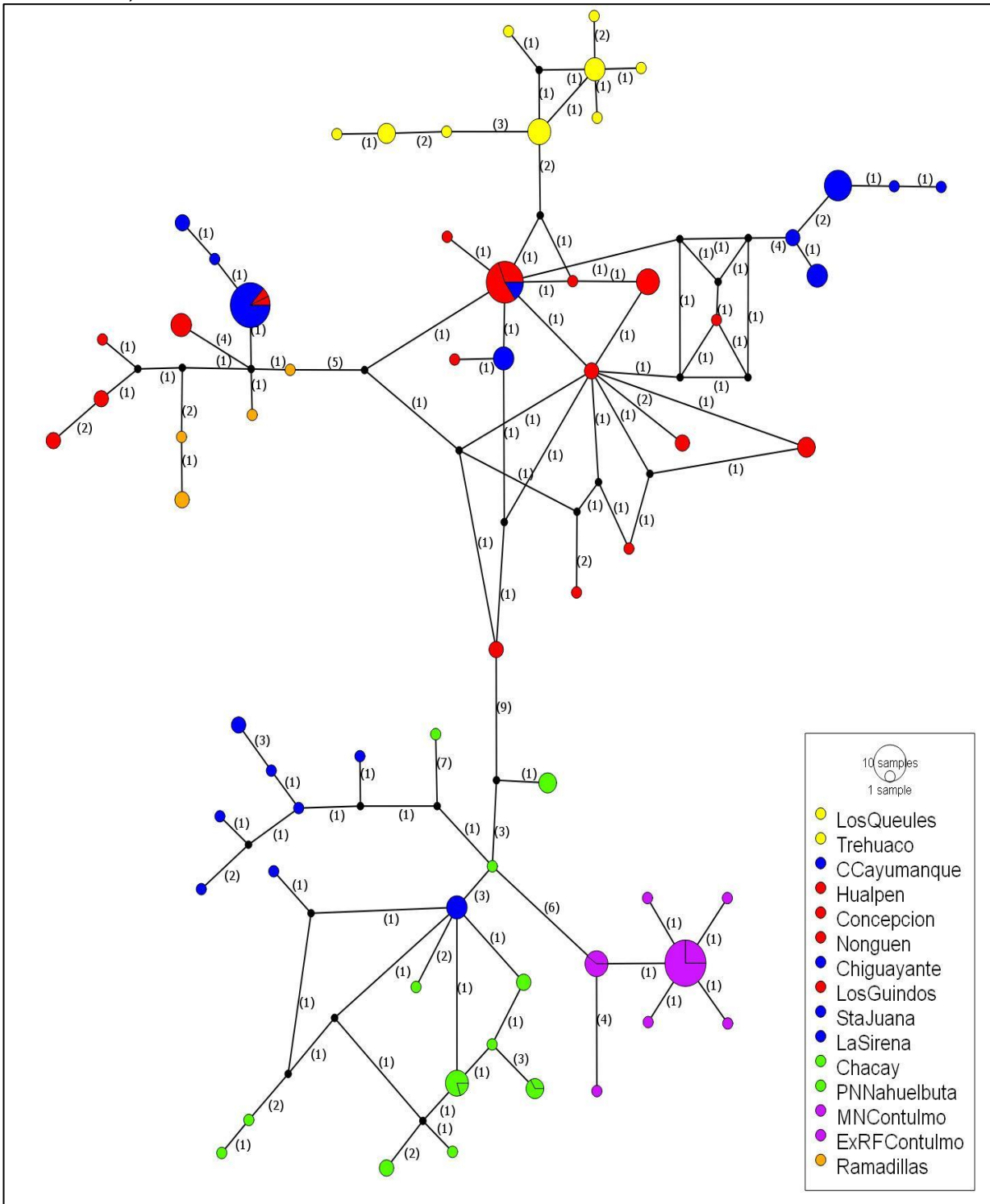


Figura 4: Resultado del análisis realizado en Geneland. Se muestra en número de poblaciones inferidos por este programa (K=8).

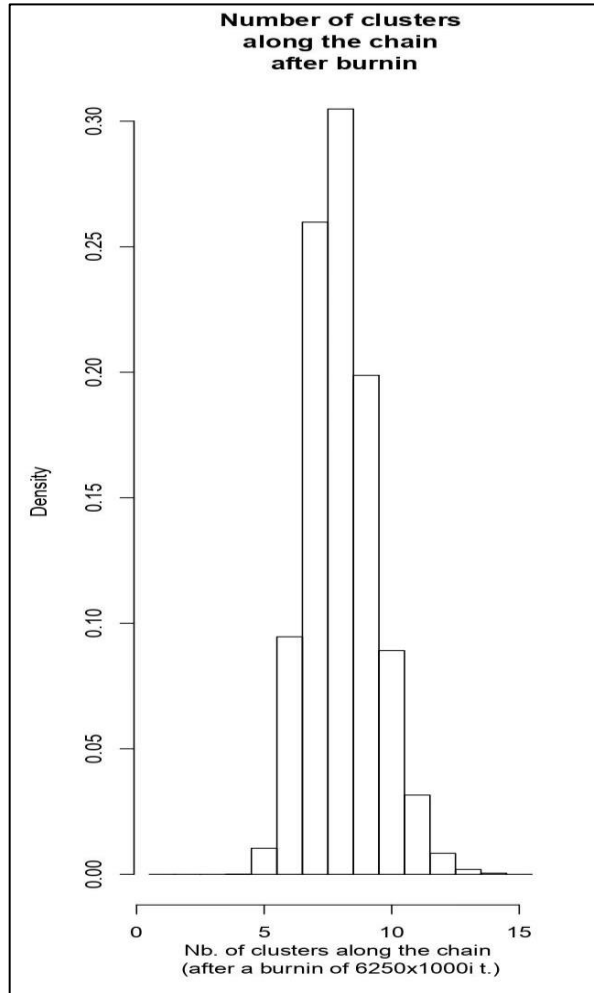


Figura 5: Modelos de aislamiento por distancia, comparando las localidades muestreadas por Suárez-Villota 2018 ($p > 0,005$, no significativo) y Modelos de aislamiento por distancia utilizando las localidades intermedias ($p < 0,005$, significativo)

