

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA



Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Zoología

Reevaluación del estatus taxonómico de *Eupsophus roseus* (Duméril & Bibron, 1841) (Anura: Alsodidae).

CAMILA ANTONIETA CASTRO CARRASCO

Profesor Guía: Juan Carlos Ortiz Zapata
Profesor Co Guía: Claudio Correa Quezada
Departamento de Zoología
Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas

CONCEPCIÓN – CHILE

2015

*A la memoria de Nadia
Azócar Hitschfeld*



AGRADECIMIENTOS

La alumna tesista agradece el financiamiento otorgado por la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción mediante la Beca Exención de Matrícula de Arancel, así como a Conicyt, por la Beca de Magíster Nacional. A los proyectos “Diagnóstico y propuestas de conservación de poblaciones de anfibios en predios de Forestal de Arauco en la cordillera de la costa” UdeC – PUC – Forestal Arauco S.A., Proyecto de Inserción Fondecyt 79130032 y Proyecto: Proyecto Fondecyt 1130467.

Expreso especial gratitud a mi profesor tutor Juan Carlos Ortiz, por el apoyo académico, anímico y financiero a cada una de mis ideas. A Claudio Correa, por las enseñanzas a lo largo de esta tesis. A la comisión revisora, Dra. Marcela Vidal y Dr. Luis Parra, por sus aportes tanto en el proyecto como en el manuscrito final y a la Dra. Lucila Moreno, por el ayuda brindada durante este proceso.

Por la cooperación y compañerismo en terreno, así como el aporte de muestras para esta tesis, agradezco a la Agrupación Nahuelbuta Natural, así como a Juan Pablo Donoso, Francisca Fonseca y Gustavo Valenzuela.

Agradezco la importante y fundamental colaboración, no sólo técnica, sino que también anímica, de Margarita Ruiz de Gamboa y Tania Coronado. A mis amigos del alma, Carlos Barrientos y Viviana Rivera por la preocupación y consejos dados.

Por el cariño y la contención entregados a lo largo de este proceso, agradezco a mis familiares y amigos, en especial a Alonso Grau. Finalmente, a mis padres y a Carmen, quienes siempre han confiado en mis planes, aunque estos no siempre parezcan ser los más parsimoniosos.

INDICE

	Página
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSIÓN	36
7. CONCLUSIONES	42
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
9. ANEXOS	56



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa de distribución de <i>Eupsophus roseus</i> (tratado como <i>Eupsophus grayi</i>) tomado de Cei (1962b), donde es posible observar la amplia distribución de la especie.	15
Figura 2. Mapas de distribución de <i>Eupsophus roseus</i> presentados en los trabajos de a. Nuñez <i>et al.</i> (1999) b. Rabanal y Nuñez (2008) y c. Veloso <i>et al.</i> (2010).	16
Figura 3. Variación morfológica interespecífica en el grupo <i>roseus</i> . Morfos clásicos del género, presentes en distintas localidades.	18
Figura 4. Variación intrapoblacional observada en una misma localidad (San José de Colico, Provincia de Arauco, Región del Bio-Bío).	19
Figura 5. Mapa de las localidades incluidas en este estudio. En rojo, se observan las localidades obtenidas de Blotto <i>et al.</i> (2013) y en azul, las nuevas localidades muestreadas para este estudio.	25
Figura 6. Árbol obtenido por Máxima Parsimonia, mediante el programa Paup. Se muestran los valores de sustento de bootstrap para cada nodo, salvo aquellos con valor igual a 100. La coloración de los clados es consistente con aquella mostrada en las figuras 10 y 11.	31
Figura 7. Árbol consenso obtenido por Inferencia Bayesiana (BayesPhylogenies). Sustento estadístico: nodos sin cifra = 100; nodos con cifras en azul= 50 – 99; nodos con cifras en rojo: 1 – 49.	32

ÍNDICE DE FIGURAS (continuación)

Página

Figura 8. Histograma de diferencias pareadas obtenido por ABGD, donde es posible observar dos “gap”, en el 2% de distancia genética y entre 3% y 4%. 33

Figura 9. Grupos obtenidos mediante ABGD, con parámetros de distancia K80 Kimura MinSlope: 1.5. 34

Figura 10 a. b. c. Puntos georeferenciados y áreas tentativas de distribución de los diferentes clados del grupo *roseus* obtenidos por MP, IB y Distancia Genética. (polígono de área y puntos café, amarillo, naranja blanco y rojo = *E. roseus*; polígono de área y puntos rosados = *E. insularis*; polígono de área y puntos verde = *E. migueli*; polígono de área y puntos celeste = *E. calcaratus*). 36

Figura 11 a. Mapa de puntos georeferenciados y área tentativa de la especie *E. roseus*. En el polígono color rojo claro se muestra el área total de la especie, dentro de esta área es posible visualizar zonas en otros colores, correspondientes a los linajes identificados en la topología de MP, IB y análisis de DG (polígono y puntos color café = clado *E. septentrionalis*; polígono y puntos color naranja = clado *E. contulmoensis* + *E. nahuelbutensis*; polígono y puntos color amarillo = *E. sp* Predio Quidico; polígono y punto color blanco = *E. sp* Cerro Adencul y polígono y puntos color rojo oscuro = *E. roseus* sensu stricto).

b. Área de distribución disyunta de *Eupsophus insularis* (polígonos y puntos rosado).

c. Área de distribución de los individuos del clado de *Eupsophus migueli*. 40

Figura 12. Árbol editado y obtenido por Inferencia Bayesiana, donde se muestran las especies resultantes del presente estudio. 57

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Localidades muestreadas en el presente estudio (29) y sus coordenadas geográficas. 23 de estos sitios corresponden a puntos de los cuales no existían secuencias genéticas publicadas, ni muestreos previos (localidades negrita y asterisco).

23

Tabla 2. Especímenes muestreados por localidad, se incluye el tipo de muestra y las coordenadas geográficas.

29

Tabla 3. Especímenes tomados de Blotto *et al.*, (2013), indicando localidad y código de museo.

56



RESUMEN

El objetivo principal de la presente investigación es dilucidar el estatus taxonómico de *Eupsophus roseus* (Duméril y Bibron, 1841) (Anura: Alsodidae) y las especies asociadas al grupo *roseus*, mediante análisis moleculares, dado que otro tipo de aproximaciones (morfológicas, osteológicas y cariotípicas) no han sido concluyentes en la diferenciación de especies. Se muestreó y se obtuvo secuencias de ADN de especímenes de gran parte de la distribución del género y de las localidades tipo de las especies del grupo *roseus* (*E. altor*, *E. calcaratus*, *E. contulmoensis*, *E. insularis*, *E. migueli*, *E. nahuelbutensis* y *E. septentrionalis*). Se amplificó, mediante la técnica de PCR, un total de cinco genes (tres mitocondriales y dos nucleares) para, posteriormente, realizar análisis filogenéticos de Máxima Parsimonia, Inferencia Bayesiana y análisis de distancia genética (ABGD). De esta manera se evaluó los grupos presentes en el género, así como, sus diferentes linajes. Los resultados obtenidos, permiten concluir que: i) *E. roseus* presenta una mayor distribución que la descrita en la literatura; ii) las especies *E. septentrionalis*, *E. contulmoensis* y *E. nahuelbutensis* son sinónimos junior de *E. roseus*, así como *E. altor* lo es de *E. migueli*; y iii) las especies válidas del grupo *roseus* serían: *E. calcaratus*, *E. insularis*, *E. migueli* y *E. roseus*.

ABSTRACT

The main objective of this research is to elucidate the taxonomic status of *Eupsophus roseus* (Duméril and Bibron, 1841) (Anura: Alsodidae) and associated species from the *roseus* group by molecular analysis, given that other approaches (morphological, osteological and karyotypic), are inconclusive in differentiating species of *Eupsophus*. Therefore, it we sampled and obtained DNA sequences of specimens of much of the distribution of the genus and the type localities from the species of the *roseus* group (*E. altor*, *E. calcaratus*, *E. contulmoensis*, *E. insularis*, *E. migueli*, *E. nahuelbutensis* and *E. septentrionalis*). For these samples, DNA was amplified by PCR for a total of five genes (three mitochondrial and two nuclear), to then perform phylogenetic analyzes of Maximum Parsimony, Bayesian Inference and analysis of genetic distance (ABGD). Thus, we evaluate the groups present in the genre, as well as their different lineages. Based on the obtained results, it was possible to conclude that: i) *E. roseus* exhibits a greater distribution than the one described in the literature; ii) the species *E. septentrionalis*, *E. contulmoensis* and *E. nahuelbutensis* are junior synonyms of *E. roseus*, as *E. altor* is to *E. migueli*; and iii) valid species from *roseus* group are: *E. calcaratus*, *E. insularis*, *E. migueli* and *E. roseus*.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Eupsophus* es uno de los más diversos del área patagónica del extremo sur de Sudamérica, con un total de 10 especies descritas para Chile y Argentina: *E. altor*, *E. calcaratus*, *E. contulmoensis*, *E. emiliopugini*, *E. insularis*, *E. migueli*, *E. nahuelbutensis*, *E. roseus*, *E. septentrionalis* y *E. vertebralis* (Blotto *et al.*, 2013). El género se caracteriza por estar compuesto de anfibios que habitan el bosque templado, de pequeño tamaño (≈ 35 mm) y con patrones de coloración similares a la hojarasca (Formas *et al.*, 1983). A lo largo de la historia, este género ha experimentado diversas modificaciones taxonómicas, lo que ha propiciado confusión en la delimitación de sus especies.

1.1 Historia taxonómica del género

La taxonomía del género *Eupsophus* es bastante compleja y ha pasado por diversos cambios nomenclaturales. Duméril y Bibron (1841) describen *Cystignathus roseus* (“Le Cystignathe Rose”) a partir de especímenes enviados por Claudio Gay a Francia. En dicha descripción se señala como patria de la especie a Chile. Los ejemplares revisados por estos autores se encuentran depositados en el Museo Nacional de Historia Natural de Paris (MNHN) y en la nomenclatura actual corresponden a *Eupsophus roseus* (Grandison, 1961; Cei 1962a). Posterior al trabajo de Duméril y Bibron (1841), Bell (1843) describe las especies *Borborocoetes bibroni* y *B. grayi*, a partir de material recolectado por Charles Darwin, en su paso por Chile a bordo del H.M.S Beagle. Fitzinger (1843) propone el género *Eupsophus* para el *Cystignathus roseus* de Duméril y Bibron (1841), dado que este último género correspondía a otro grupo de anfibios diferentes dentro de la familia Lictodactylidae. Sin embargo, aún existía la sinonimia con *Borborocoetes* (Bell, 1843), por lo que Parker (1932) asigna *B. bibronii* y *B. grayi* a *Eupsophus*, señalando que el género de Bell (1843) ya estaba ocupado por otras entidades taxonómicas. Bajo el género *Eupsophus* se describieron numerosas especies, que desaparecieron tras ser incorporadas a distintos géneros y/o ser sinonimizadas.

Algunas de estas especies son: *E. nebulosus*, *E. maculatus*, *E. verrucosus*, *E. kriegi* (= *Alsodes nodosus*), *E. coppingeri* (= *Alsodes coppingeri*), *E. hidalgi*, *E. taeniatus* (= *Batrachyla taeniata*), *E. grayi*, *E. bibroni*, *E. masareyi* (= *E. roseus*) (Ceí, 1960, 1962a, 1962b; Grandison, 1961; Gallardo, 1970; Lynch, 1972). Sin embargo, tras las revisiones realizadas por Ceí (1960, 1962a), Grandison (1961), Lynch (1972) y otras publicaciones que abordan especies afines (Gallardo, 1962, 1970), el género quedó restringido a sólo dos especies, *E. roseus* y *E. vertebralis*.

Posteriormente, entre los años 1978 y 2012 se describen siete nuevas especies de *Eupsophus* (*E. migueli* Formas, 1978; *E. contulmoensis* Ortiz, Ibarra-Vidal y Formas, 1989; *E. emiliopugini* Formas, 1989; *E. nahuelbutensis* Ortiz y Ibarra-Vidal, 1992; *E. septentrionalis* Ibarra-Vidal, Ortiz y Torres-Pérez, 2004; *E. queulensis* Veloso et al., 2005 y *E. altor* Nuñez, Rabanal y Formas, 2012) y se revalidan otras dos especies, *E. calcaratus* (Günther 1881) y *E. insularis* (Phillippi, 1902) (Formas y Vera, 1982). Todas estas especies se reconocen actualmente como válidas, salvo por la sinonimización de *E. queulensis* a *E. septentrionalis* (Blotto et al., 2013). Las localidades tipo de algunas de estas especies como *E. migueli*, *E. contulmoensis*, *E. emiliopugini*, *E. nahuelbutensis* y *E. altor* (Formas, 1978; Ortiz, et al., 1989; Ortiz y Ibarra-Vidal, 1992; Nuñez et al., 2012) se ubican dentro del rango de distribución de las antes mencionadas, *E. roseus* y *E. vertebralis*, lo que ha generado diversas confusiones sobre la validez de algunas de ellas. Por otra parte, dadas sus características cariotípicas (Formas, 1991), sus vocalizaciones (Formas y Brieva, 1994) y recientes análisis moleculares, dentro del género se reconocen dos grupos: 1) grupo *roseus* formado actualmente por *E. roseus*, *E. altor*, *E. calcaratus*, *E. contulmoensis*, *E. insularis*, *E. migueli*, *E. nahuelbutensis* y *E. septentrionalis*; y 2) grupo *vertebralis*, formado por *E. vertebralis* y *E. emiliopugini* (Blotto et al., 2013).

1.2. Historia natural del género

Las especies de *Eupsophus* presentan diversas adaptaciones a los bosques templados, principalmente relacionadas con su modo reproductivo. Este consiste en la capacidad de reproducirse al interior de túneles que, dependiendo de la especie,

presentan mayor o menor grado de humedad. Es así como *E. nahuelbutensis* utiliza galerías inundadas (Nuñez y Úbeda, 2009), mientras que *E. altor*, oquedades prácticamente secas (Nuñez *et al.*, 2012). En estas cavidades subterráneas se realiza la totalidad del proceso reproductivo: los machos emiten vocalizaciones reproductivas, las parejas llevan a cabo el amplexus, se produce la ovipostura, el desarrollo larvario completo y posterior metamorfosis. A su vez, las larvas del género también presentan adaptaciones a este modo reproductivo. Se trata de larvas con alimentación endotrófica, es decir, durante el periodo larvario se nutren exclusivamente de vitelo, el que es sintetizado por la hembra y se almacena en cada ovocito para ser utilizado durante el desarrollo larval. Además, presentan un escaso desarrollo del disco oral y queratodontes, lo que estaría dado por no requerir de alimentación vía oral (Formas, 1981, 1989a). Los adultos del género habitan entre la hojarasca, musgos y helechos del bosque, así como bajo troncos podridos y piedras, siempre en lugares muy húmedos (Rabanal y Nuñez, 2008). Presentan patrones de coloración que se asemejan a la hojarasca del bosque templado y estos patrones varían bastante, incluso dentro de poblaciones de la misma especie y de la misma localidad (Formas, 1978; Formas *et al.*, 1983; Ibarra *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2005; Holzapel, 2007).

1.3. Biogeografía histórica y distribuciones actuales

En Chile, a diferencia de otros géneros de anfibios, las especies de *Eupsophus* se distribuyen exclusivamente en el bosque templado (Formas, 1979), desde la Reserva Nacional Los Queules, región del Maule (36°S) hasta Isla Wellington, Región de Magallanes y la Antártida Chilena (49°S) (Rabanal y Nuñez, 2008; Asencio *et al.*, 2009). En Argentina, el género tiene una presencia marginal y las especies *E. calcaratus*, *E. emiliopugini* y *E. vertebralis* han sido reportadas en las laderas boscosas de la cordillera de los Andes de las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut (Úbeda, 2000; Úbeda *et al.*, 2010, Vaira *et al.*, 2012).

Basado en Schaeffer (1949), que describe la presencia de un *Eupsophus* sp. en Chubut durante el Oligoceno, Formas (1979), señala que durante el

Terciario, el género habría tenido una amplia distribución en la Patagonia. Sin embargo, Nicoli (2012) desestima que el fósil de Shaeffer (1949) se trate de un *Eupsophus* y señala que con la evidencia existente no es posible determinar la posición taxonómica del fósil. Actualmente, se desconoce la distribución histórica del género. Por otra parte, Parker (1932) y Cei (1962b), en base a atributos morfológicos, señalan que *Eupsophus* estaría estrechamente relacionado con anfibios brasileños del grupo *Thoropa* y peruanos del conjunto *wettsteini-peruanus*, por lo que se podría hipotetizar una posible colonización desde áreas subtropicales. Estudios recientes, como los de Frost *et al.* (2006) y Pyron y Wiens (2011), señalan que los grupos emparentados a la familia Alsodidae (actual familia a la que pertenece *Eupsophus*), serían anfibios del género *Limnomedusa* y de la familia Hylodidae, lo que se contradice con los trabajos de Parker (1932) y Cei (1962b); sin embargo, estas relaciones filogenéticas (Frost *et al.* 2005; Pyron y Wiens, 2011), presentan un bajo sustento estadístico. Por lo anterior, en la actualidad, las relaciones de parentesco de *Eupsophus* y de la familia Alsodidae son inciertas y los orígenes y biogeografía histórica del grupo se desconocen.

Formas (1979) señala que “*Eupsophus*, tradicionalmente, ha sido un género muy confuso y mal definido, lo que ha traído como consecuencia falsas interpretaciones biogeográficas”. Actualmente y luego de diversos procesos de sinonimización y descripción de especies, esta problemática sigue presente. Tras los trabajos de Cei (1960, 1962a), Grandison (1961), Gallardo (1970) y Lynch (1971, 1972), se esclarecen las especies del género y su distribución queda restringida a aquella de *E. roseus* y *E. vertebralis*.

En el libro Batracios de Chile de Cei (1962b) se muestran registros de *E. roseus* (tratados ahí como *E. grayi*) desde Tomé, Región del Bio-Bío, hasta la península de Taitao en Aysén, incluyendo zonas insulares como Isla Mocha, Chiloé y el archipiélago de Chonos (Figura 1). Sin embargo, dentro del rango de distribución de *E. roseus* e incluso en localidades donde esta especie estaba registrada, cuatro nuevos taxa fueron descritos y dos se revalidaron, todos pertenecientes al grupo *roseus*: *E. migueli*, *E. contulmoensis*, *E. nahuelbutensis* y *E. altor*, y las revalidadas *E. calcaratus* y *E. insularis*. Todas estas especies, a

excepción de *E. calcaratus*, son conocidas sólo en su localidad tipo o en un rango de distribución muy reducido (Rabanal y Nuñez, 2008).

La amplia distribución descrita por Ceí (1962b) contrasta con los trabajos de Nuñez *et al.* (1999), Nuñez (2003), Rabanal y Nuñez (2008) y con los mapas de distribución de UICN (Veloso *et al.*, 2010) (Figura 2. a, b, c), donde se muestra que ésta especie habita un área más acotada que aquella de Ceí (1962b). Esta restricción en la distribución de *E. roseus*, es el resultado de trabajos como los de Formas y Vera (1982), donde los autores revalidan las especies *E. calcaratus* y *E. insularis*, basados en caracteres como la coloración del iris y la coloración dorsal. Como se detalla en la sección 1.4., estos caracteres son cuestionables. Al describirse nuevas especies en el rango de distribución de *E. roseus* (Formas, 1978; Ortiz *et al.*, 1989; Formas, 1989; Ortiz e Ibarra-Vidal, 1992; Ibarra-Vidal *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2005; Nuñez, *et al.*, 2012), se asumió implícitamente que la especie no se encontraba ahí y por lo tanto su distribución se redujo, quedando acotada a áreas no ocupadas por las nuevas especies y ni por las revalidadas, sin realizar, en los trabajos correspondientes (Formas, 1978; Formas y Vera, 1982; Ortiz *et al.*, 1989; Formas, 1989b; Ortiz e Ibarra-Vidal, 1992; Nuñez *et al.*, 1999; Ibarra-Vidal *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2005; Nuñez *et al.*, 2012) comentarios explicativos sobre la reducción del área de distribución de *E. roseus*. En las descripciones posteriores del género no se menciona la presencia de *E. roseus* en las localidades tipo de las nuevas especies, a excepción de *E. contulmoensis* (Ortiz *et al.* 1989). Sin embargo, esto es descartado por Nuñez (2003) en su tesis doctoral. En el resto de las descripciones de especies del grupo *roseus* no se menciona ni se discute la presencia de *E. roseus*, a pesar de ser una especie que la literatura señala para aquellas localidades y de amplia distribución en Chile. Por otra parte, no hay trabajos recientes que clarifiquen la distribución de *E. roseus*. Es así como, en la actualidad, se desconoce la extensión de la distribución de la especie. A su vez, considerando la alta variación morfológica intrapoblacional (Formas, 1978; Formas *et al.*, 1983; Ibarra *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2005; Holzapel, 2007), existe la incertidumbre sobre si individuos de *E. roseus* cohabitan o no con las especies

posteriormente descritas, o bien, si estas últimas serían parte de la variabilidad y por ende, sinonimias de *E. roseus*.

En síntesis, existe incertidumbre acerca de las distribuciones de las especies de *Eupsophus* del grupo *roseus* en el territorio nacional, particularmente de *E. roseus*. Es decir, si tras las nuevas especies descritas, *E. roseus*, que presentaba una amplia distribución, actualmente se distribuye en áreas acotadas; o bien, si las nuevas especies habitan en islas dentro de la distribución de *E. roseus*. O, como una tercera opción, las especies descritas recientemente viven en simpatría con *E. roseus*.

Figura 1. Mapa de distribución de *Eupsophus roseus* (tratado como *Eupsophus grayi*) tomado de Cei (1962b), donde es posible observar la amplia distribución de la especie.

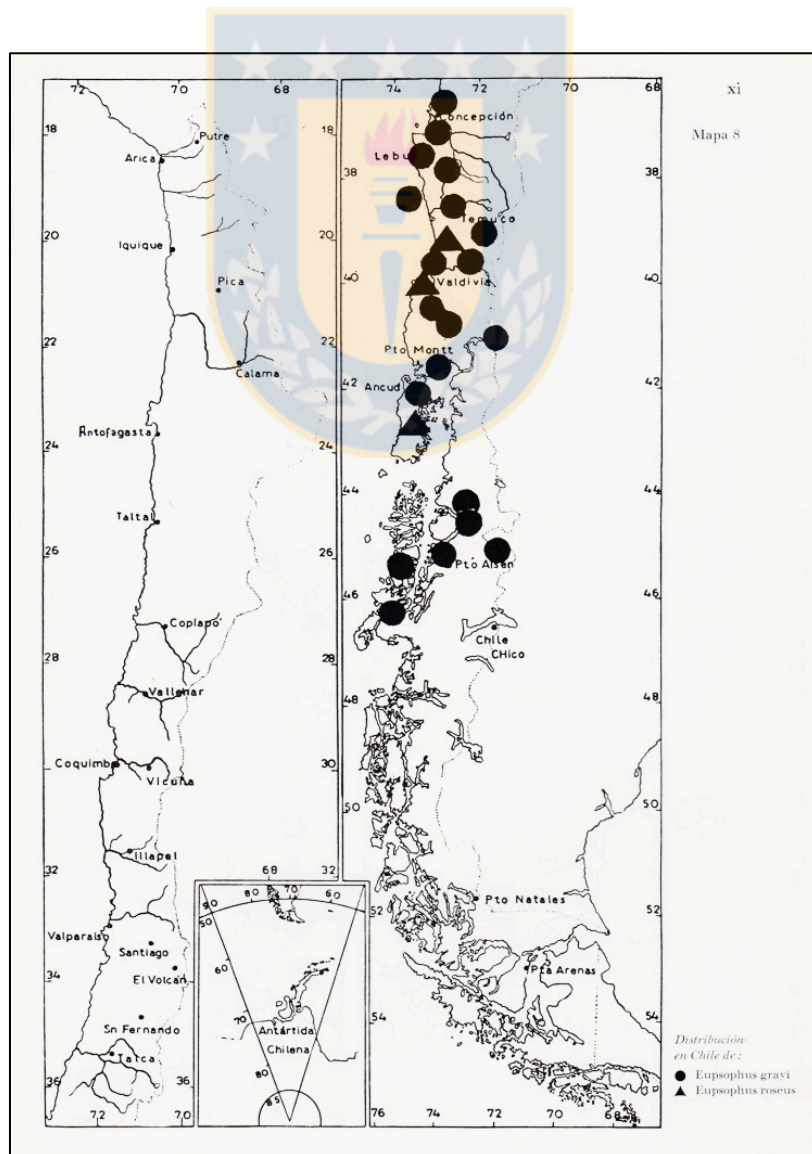
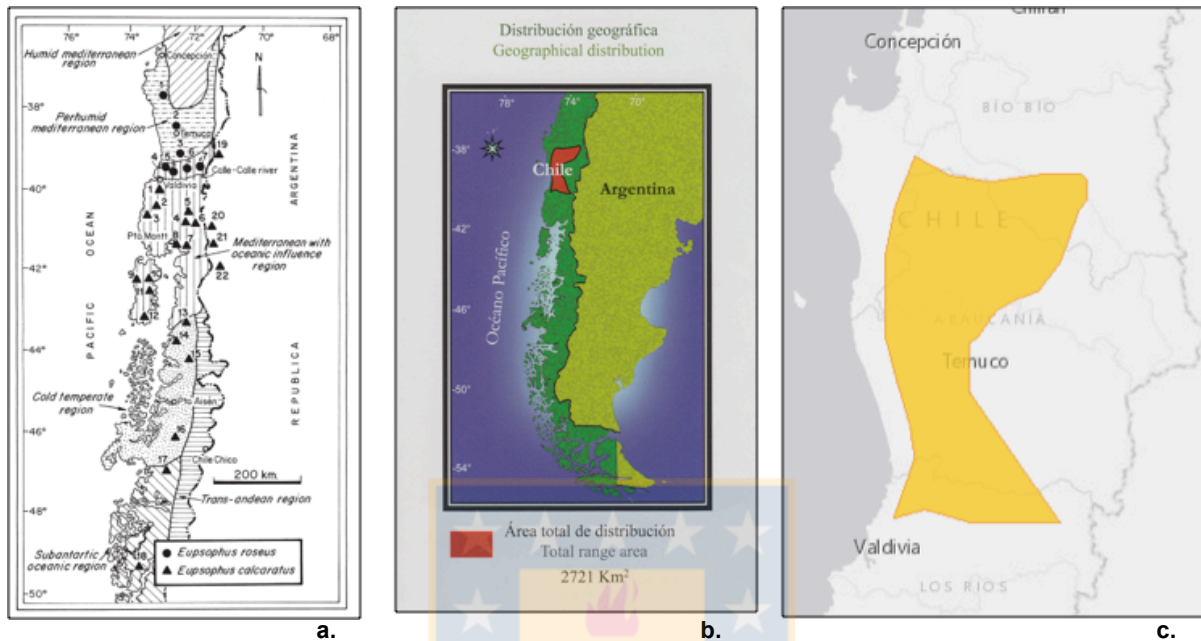


Figura 2. Mapas de distribución de *Eupsophus roseus* presentados en los trabajos de **a.** Nuñez *et al.* (1999) **b.** Rabanal y Nuñez (2008) y **c.** Veloso *et al.* (2010).



1.4 Especies descritas y caracteres diagnósticos.

Lynch (1971), señala que *Eupsophus* es un género vagamente definido y además, muy heterogéneo. Señala, además, que ningún autor ha realizado estudios que trataran al género como un todo, sino que, sólo existían trabajos que estudiaban algunas especies de grupo. El mismo autor (Lynch 1972) señala que el género es taxonómicamente difícil de definir y que existe una alta variación intra-genérica dado que *Eupsophus* fue usado para clasificar aquellos leptodactílidos sin caracteres distintivos.

Para describir las especies del género *Eupsophus* se han utilizado, principalmente, caracteres de tipo morfológico y cariotípicos. En el caso de los morfológicos, los caracteres más utilizados son: coloración del iris, coloración dorsal y ventral, patrones de coloración (diseño), medidas anatómicas (longitud hocico cloaca, longitud y ancho de la cabeza, distancia entre ojos, entre narinas, entre ojos y narinas, diámetro del ojo, longitud de las patas traseras, longitud del pie)

y anatomía del esternón (Duméril y Bibron 1841; Grandison 1962; Formas, 1978; Formas 1989; Ortiz *et al.*, 1989; Ortiz y Ibarra-Vidal, 1992; Ortiz *et al.*, 2004; Nuñez *et al.*, 2012). Tras revisar la literatura y descripciones del género, es posible constatar que en ciertos casos, los caracteres, como las medidas anatómicas, se superponen en las diferentes especies, como muestran, por ejemplo, Nuñez *et al.* (2012) para *E. altor*, *E. migueli* y *E. roseus*. Por otra parte, ciertos caracteres reconocidos como diagnósticos y utilizados para determinar las especies (coloración del iris, coloración dorsal y ventral y patrones de coloración) no son exclusivos de cada especie, sino que, por el contrario, es posible encontrar caracteres específicos de cierta especie en poblaciones de otras especies. Esto lo evidencia Nuñez *et al.* (1999) al señalar que la coloración del iris en *E. calcaratus* y *E. roseus* no sería un carácter diagnóstico al estar presente en ambas especies tanto individuos con coloraciones amarilla y otros, rojiza. Esto a pesar de que Formas y Vera (1982) utilizaran dicho carácter para revalidar a *E. calcaratus*. Holzapel (2007), en su tesis de pregrado, muestra cómo en una misma población de *E. roseus* de la localidad de San Martín, es posible encontrar patrones de coloración asignados a otras especies. Uno de los caracteres morfológicos frecuentemente utilizado en las descripciones del género es la anatomía del esternón, dado que se considera un carácter altamente conservado. Sin embargo, Díaz (1986), tras revisar un total de 37 esternones de *E. roseus* y 45 de *E. migueli*, llega a la conclusión de que existen cuatro morfotipos diferentes y que es posible encontrarlos en las dos especies que él analizó, por lo que el carácter presentaría un alto nivel de variabilidad intraespecífica. Por lo anteriormente planteado, los caracteres morfológicos descritos para el grupo, no serían buenos elementos diagnósticos en las especies de *Eupsophus* (Figura 3).

Figura 3. Variación morfológica interespecífica en el grupo *roseus*. Morfos clásicos del género, presentes en distintas localidades.



Figura 3. a) *E. roseus*, La Saval. b) *Eupsophus* sp., R.N. Nonguén. c) *E. nahuelbutensis*, Ramadillas.



d) *E. roseus*, Carahue. e) *E. contulmoensis*, M.N. Contulmo. f) *E. nahuelbutensis*, Butamalal.



g) *E. calcaratus*, P.N.Cucao. h) *E. roseus*, La Unión. i) *E. nahuelbutensis*, Río Picoiquien.



j) *E. altor*, Reserva Oncol. k) *E. nahuelbutensis*, Ramadillas. l) *Eupsophus* sp. San José de Colico.

Al revisar la colección del Museo de Zoología de la Universidad de Concepción (MZUC) es posible constatar que existen numerosas localidades no descritas en la literatura, con presencia de individuos del género, pero dada la alta variabilidad intrapoblacional e interespecífica del género, la determinación taxonómica morfológica no es confiable (Figura 4). Es así como, investigadores en anfibios y profesionales dedicados a trabajos de líneas base, suelen determinar las especies del género basándose únicamente en la localidad de procedencia y no en caracteres propios de los individuos, lo que genera identificaciones erróneas.

Por lo anterior, para este género, los caracteres morfológicos diagnósticos más frecuentemente utilizados hasta ahora no son útiles, por lo cual sería necesario buscar otras aproximaciones para delimitar taxonómica y geográficamente a las especies.

Figura 4. Variación intrapoblacional observada en una misma localidad (San José de Colico, Provincia de Arauco, Región del Bio-Bío).



1.5 Distancia genética para separar especies

La determinación específica a partir de caracteres morfológicos se complica ante ciertos fenómenos biológicos como plasticidad fenotípica, especies crípticas, variabilidad fenotípica de caracteres y el hecho de que muchas claves morfológicas sirven sólo para un estado de desarrollo o sexo. Hebert *et al.* (2003) desarrollan una nueva técnica para la determinación de especies e identificación de nuevos taxa. Dichos autores plantearon la idea de que un gen mitocondrial (citocromo c oxidasa I, COI) podría servir como un código de barras genético y así contar con un sistema global de bioidentificación para animales. De esta forma, ellos señalan que la microgenómica, el análisis de un pequeño segmento del genoma, permitiría la diagnosis de la diversidad biológica. Esta idea ya había sido puesta a prueba de forma exitosa para otros grupos como bacterias, virus y protistas (Nanney, 1982; Pace, 1997; Hamels *et al.*, 2001). Para metazoos, estudios como los de Saccone *et al.* (1999, 2001) y Larizza *et al.* (1999) señalan la utilidad del genoma mitocondrial para resolver tanto relaciones filogenéticas dentro de grupos taxonómicos mayores (e.g. phylum o orden), como a nivel de especie, debido a que el genoma mitocondrial se mantiene constante en cuanto a su tamaño y contenido. Además, presenta una escasa proporción de genes parálogos, con respecto a los ortólogos, a diferencia de los genes nucleares. A su vez, el ADN mitocondrial otorgaría otros beneficios para la identificación de especies, ya que no presenta intrones, tiene bajas tasas de recombinación y su herencia es de tipo haploide (materna). Hebert *et al.*, (2003) señalan, de forma general, que dada su limitada tasa de cambio (2% por Myr), se espera una diferencia de 12 nucleótidos diagnósticos, en una comparación de 600 pares de bases (bp), para especies con una historia de un millón de años de aislamiento reproductivo.

Por estas características, el ADN mitocondrial se ha utilizado para la delimitación e identificación de especies en diversos grupos de animales, tales como: colémbolos (Hogg y Hebert, 2004), lepidópteros (Rougerie *et al.*, 2014), rájidos (Spies *et al.*, 2006), peces (Hubert *et al.*, 2008; Mabragaña *et al.*, 2011), anfibios (Vences *et al.*, 2005; Jin Jeon *et al.*, 2013), reptiles (Jin Jeon *et al.*, 2013), aves (Alabadian *et al.*, 2009; Kerr *et al.*, 2009), quirópteros (Clare *et al.*, 2006; 2011; Koubínová *et al.*, 2013) y mamíferos (Ivanova *et al.*, 2012). Es así como, el ADN mitocondrial se presenta como una herramienta útil para obtener caracteres diagnósticos para la identificación de especies. Además de la delimitación de especies por distancia genética, es necesario contrastar esto con evidencia que entregue información sobre los distintos linajes de los grupos (Padiál *et al.*, 2010). Por esto, diversos autores señalan que no bastaría con utilizar sólo ADN mitocondrial para probar la existencia de especies, sino que, sería necesario sumar otro tipo de caracteres, con el fin de llegar a una delimitación de especies más robusta (De Salle, 2006; Wiemers y Fiedler, 2007). Actualmente, se prefiere la utilización no sólo de genes mitocondriales, sino también nucleares, a pesar de presentar ciertos inconvenientes como la presencia de genes parálogos y pseudogenes (Larizza *et al.*, 1999). La importancia de incluir genes nucleares se basa en la idea de realizar una taxonomía más bien integrativa (Padiál *et al.*, 2010). Por otra parte, la inclusión de un mayor número de genes de diferentes orígenes, permite acercarse hacia la confección de hipótesis filogenéticas de especies y no sólo de genes (Page y Holmes, 1998). Por esto, la integración de un mayor número de genes de diversos orígenes, mitocondriales y nucleares, permitiría resolver de mejor manera cuáles son los linajes dentro de un grupo taxonómico e identificar las especies que este contiene.

2. HIPÓTESIS

De la problemática anteriormente expuesta, es posible plantear las siguientes hipótesis:

2.1. Algunas de las especies del grupo *roseus* no son válidas y corresponden a linajes dentro de la especie *Eupsophus roseus* (Duméril & Bibron, 1841).

2.2. El rango de distribución de *Eupsophus roseus* (Duméril & Bibron, 1841) abarca un área mayor que lo señalado en la literatura actual.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Delimitar taxonómica y geográficamente a la especie *Eupsophus roseus*.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Realizar un análisis filogenético del género *Eupsophus* con secuencias mitocondriales y nucleares, incluyendo ejemplares de áreas no reportadas previamente en la literatura.

3.2.2. Delimitar las especies del grupo *roseus* mediante aproximaciones filogenéticas y de distancia genética.

3.2.3. Definir las distribuciones geográficas de las especies del grupo *roseus*.



4. MATERIALS Y MÉTODOS

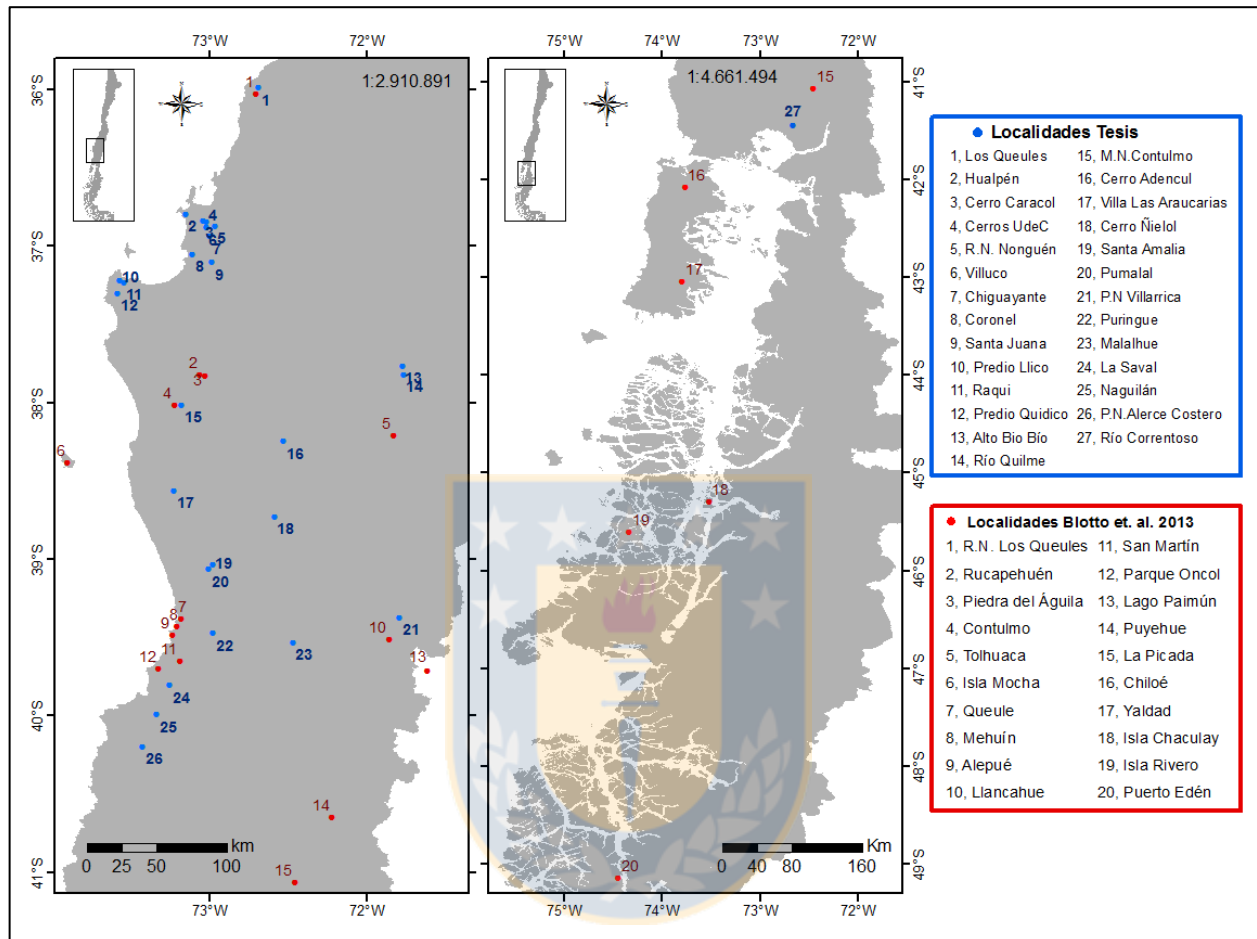
4.1. Localidades y especímenes de estudio

Con el fin de cumplir con los objetivos 3.2.1 y 3.2.3, en el presente estudio se incluyeron especímenes de las localidades tipo de las ocho especies del grupo *roseus* (*E. altor*, *E. calcaratus*, *E. contulmoensis*, *E. insularis*, *E. migueli*, *E. nahuelbutensis*, *E. roseus* y *E. septentrionalis*). Las secuencias genéticas de dichas localidades fueron incluidas en el trabajo de Blotto *et al.* (2013) y se encuentran disponibles en GenBank, desde donde fueron descargadas. En dicho trabajo, se incluyen, además, 13 localidades cercanas a las localidades tipo, que también se incluyeron. Además, con el fin de obtener muestras de zonas intermedias entre las localidades tipo y que no han sido muestreadas anteriormente, se tomaron muestras de especímenes de *Eupsophus*, en salidas a terreno enmarcadas en diversos proyectos y que abarcaron áreas boscosas de la cordillera de la Costa, Depresión Intermedia y la cordillera de los Andes (Proyecto de Inserción Fondecyt 79130032, Proyecto: “Diagnóstico y propuestas de conservación de poblaciones de anfibios en predios de Forestal de Arauco en la cordillera de la costa” UdeC – PUC – Forestal Arauco S.A.; Proyecto Fondecyt 1130467) y salidas particulares de la alumna tesista. Estas muestras se depositaron en el Museo de Zoología de la Universidad de Concepción (MZUC) y en la Colección de Flora y Fauna Prof. Patricio Sánchez Reyes del Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile (SSUC). Estas localidades intermedias suman un total de 29 sitios (Tabla 1, Figura 5), de las cuales, 24 corresponden a nuevas localidades para *Eupsophus*. Se incluyó, además, como grupo externo, un espécimen de *Alsodes barrioi* (IZUA 3549), que pertenece al género hermano a *Eupsophus*, ambos de la familia Alsodidae (Pyron y Wiens, 2011) y tres muestras de individuos del grupo *vertebralis* del género *Eupsophus* (*E. emiliopugini* (IZUA 3585 – 3586) y *E. vertebralis* (IZUA 3605)). Estas secuencias se encuentran disponibles en GenBank (Blotto *et al.*, 2013).

Tabla 1. Localidades muestreadas en el presente estudio (29) y sus coordenadas geográficas. 23 de estos sitios corresponden a puntos de los cuales no existen secuencias genéticas publicadas, ni muestreos previos (localidades negrita y asterisco).

	Localidad	Coordenadas geográficas	
1	Los Queules	35°59'12" S	72°41'23" W
2	Hualpén (*)	36°47'38" S	73°9'30" W
3	Cerro Caracol (*)	36°50'15" S	73°2'53" W
4	Cerros UdeC (*)	36°50'30" S	73°1'33" W
5	R.N. Nonguén (*)	36°52'16" S	72°58'17" W
6	Villuco (*)	36°52'47" S	73°1'33" W
7	Cerros de Chiguayante (*)	36°56'7" S	73°0'4" W
8	Coronel (*)	37°2'56" S	73°6'41" W
9	Santa Juana (*)	37°6'12" S	72°59'24" W
10	Predio Llico (*)	37°12'58" S	73°34'57" W
11	Raqui (*)	37°13'56" S	73°33'14" W
12	Predio Quidico (*)	37°17'53" S	73°35'31" W
13	Alto Bio Bío (*)	37°45'54" S	71°46'23" W
14	Río Quilme (*)	37°49'8" S	71°45'59" W
15	Nahuelbuta / Piedra del Águila	37°49'26" S	73°03'36" W
16	M.N.Contulmo	38°0'46" S	73°11'5" W
17	Cerro Adencul (*)	38°14'42" S	72°31'57" W
18	Villa Las Araucarias (*)	38°33'40" S	73°13'47" W
19	Cerro Ñielol (*)	38°43'34" S	72°35'24" W
20	Santa Amalia (*)	39°2'3" S	72°59'3" W
21	Pumalal (*)	39°3'47" S	73°0'35" W
22	Villarrica	39°22'27" S	71°47'22" W
23	Puringue (*)	39°28'19" S	72°58'50" W
24	Malalhue (*)	39°31'53" S	72°28'19" W
25	La Saval	39°48'16" S	73°15'27" W
26	Naguilán (*)	39°59'36" S	73°20'40" W
27	P.N.Alerce Costero (*)	40°11'48" S	73°25'55" W
28	Río Correntoso (*)	41°26'47" S	72°39'54" W
29	Mehuín	39°26'17" S	73°11'44" W

Figura 5. Mapa de las localidades incluidas en este estudio. En rojo, se observan las localidades obtenidas de Blotto *et al.* (2013) y en azul, las nuevas localidades muestreadas para este estudio.



4.2. Obtención de material genético

En cada una de las localidades muestreadas, se obtuvo ADN de al menos dos individuos de cada población (asumiendo una población por localidad). Las muestras de ADN se extrajeron mediante dos formas. Algunos individuos fueron colectados (permiso de captura del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Resolución 6840/2012) y eutanasiados con una solución anestésica de benzocaína y fijados en alcohol puro para análisis. Las muestras de tejido utilizadas fueron musculatura de la lengua, muslo o tejido hepático. La otra fuente de ADN correspondió a mucosa bucal, la cual se obtuvo mediante el uso de tómulas bucales marca Copan®, siguiendo el protocolo de Gallardo *et al.* (2012), que tiene la ventaja

de ser no-invasivo (los individuos se liberaron en el mismo sitio de captura). Todos los individuos fueron fotografiados en vistas dorsal y lateral estrictas.

4.3. Elección de caracteres

Para estimar las relaciones filogenéticas y las distancias genéticas entre linajes se utilizaron genes mitocondriales y nucleares. En el caso de los genes mitocondriales, se amplificaron tres fragmentos: para la porción 12S se utilizaron los partidores H1478 (5'-TGACT GCAGA GGGTG ACGGG CGGTG TGT-3') y L1091 (5'-AAAAA GCTTC AAAC TGGAT TAGAT ACCCC ACTAT-3') (Kocher *et al.*, 1989); para el gen 16S, los partidores 16Sar-L (5'-CGCCT GTTTA TCAAA AACAT-3') y 16Sbr-H (5'-CCG GTCTG AACTC AGATC ACGT-3') (Palumbi *et al.*, 1991). Además, se amplificó una porción del ADN mitocondrial ubicada entre los genes 12S y 16S, con partidores modificados por Correa *et al.* (2008) a partir de los partidores Hedges16H10 (Hedges, 1994) y L2751 (Richards y Moore, 1996). Estos corresponden a 1216LN (5'-CCAAY ACGTCA GGTCA AGGTG-3') y a 1216H (5'-TGATT ACGCT ACCTT YGCA-3'). Además, se utilizaron dos genes nucleares, estos corresponden a fragmentos del exón 1 de *rhodopsina*, con los partidores Rhod1A (5'-ACCAT GAACG GAACA GAAG GYCC-3') y Rhod1D (5'-GTAGC GAAGA ARCCT TCAA MGTA-3') (Bossuyt y Milinkovitch, 2000), y al segmento *seven in absentia*, con los partidores Sia1 (5'-TCGAG TGCCC CGTGT GYTTY GAYTA-3') y Sia2 (5'-GAAGT GGAAG CCGAA GCAGS WYTGC ATCAT-3') (Bonacum *et al.*, 2001).

4.4. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

La extracción de ADN a partir de los tejidos y tórulas colectadas se efectuó con el Kit de la marca Promega "Wizard® SV Genomic DNA Purification System". La amplificación de los fragmentos génicos se realizó con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en dependencias del Laboratorio de Herpetología de la Universidad de Concepción. Para los genes mitocondriales, el protocolo de amplificación de ADN por PCR se basó en el trabajo de Goebel *et al.* (1999), modificado por Correa *et al.* (2006) y Correa *et al.* (2008). Los reactivos de la

mezcla total de PCR (30uL) utilizados para el ADN mitocondrial fueron: 3.6 mM de MgCl₂, 0.35 mM de cada dNTP, 0.25 μM de cada partidor, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen ®) y 1 uL de ADN extraído. El perfil térmico para los genes mitocondriales correspondió a: 94°C por 1 min., seguido de 38 ciclos a 94°C por 40 segundos, 56°C por 45 segundos y 72°C por 50 segundos, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Para los genes nucleares, los reactivos de la mezcla total de PCR (30uL) utilizados fueron: 4.2 mM de MgCl₂, 0.6 mM de cada dNTP, 0.2 μM de cada partidor, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen ®) y 1 uL de ADN extraído. El perfil térmico para los genes nucleares fue: 94°C por 1 min., seguido de 38 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 55 segundos y 72°C por 50 segundos, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos mitocondriales y nucleares de PCR se enviaron a MacroGen® para su secuenciación.

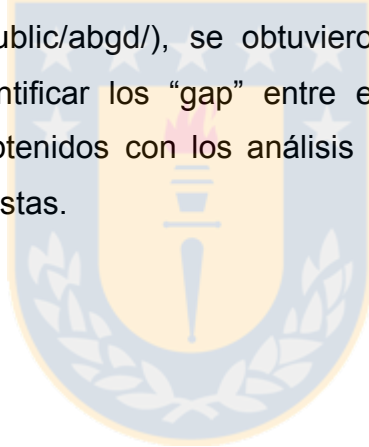
4.5. Análisis filogenéticos

Las secuencias de los cinco genes (tres mitocondriales y dos nucleares) se editaron con el programa BioEdit v7.1.3. (Hall, 1999), se alinearon con MUSCLE (Edgar, 2004) en el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2013) y se concatenaron. Posteriormente, se evaluó la saturación de las secuencias para los genes utilizados mediante el test de Xia en el programa Dambe (Xia, 2013). Las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *roseus* se estimaron por los métodos de Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB), utilizando los programas PAUP* V4.10B (Swofford, 2002) y BayesPhylogenies 1.1. (Page y Meade, 2004), respectivamente. Para los análisis de máxima parsimonia, se realizó una búsqueda heurística, utilizando el algoritmo de TBR (tree- bisection-reconnection) y “Branch Swapping” (intercambio de ramas) y el calculo del soporte estadístico de los nodos se estimó a través de “bootstrap” no-paramétrico con 2000 réplicas (Felsenstein, 1995). Para el análisis de inferencia bayesiana, se ejecutaron 20.000.000 iteraciones de la cadena de Markov Monte Carlo, con muestreos cada 1000 para evitar seudoréplicas y se descartó como burning el primer millón de iteraciones. Con estos análisis se obtuvo dos hipótesis filogenéticas (una por máxima parsimonia y otra

por inferencia bayesiana) con el fin de identificar los diferentes linajes presentes dentro del grupo *roseus* (objetivo 3.2.1) y estos se compararon con los resultados obtenidos con el análisis de distancia genética.

4.6. Análisis por distancia genética

Con el fin de delimitar cuantas especies es posible diferenciar dentro del grupo *roseus* (objetivo 3.2.2), se aplicó el análisis propuesto por Puillandre *et al.* (2011), llamado “Automatic Barcode Gap Discovery” (ABGD). Este análisis consiste en la identificación de un “gap” o brecha en una distribución de frecuencias de distancias pareadas, que se observa cuando las distancias genéticas intraespecíficas son menores que las interespecíficas. Para eso, se ingresó el alineamiento final de las secuencias de ADN, en formato fasta, al programa (disponible en línea en <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>), se obtuvieron los gráficos de diferencias pareadas, con el fin de identificar los “gap” entre especies. Estos resultados se compararon con los datos obtenidos con los análisis de MP y IB, es decir, con las hipótesis filogenéticas propuestas.



5. RESULTADOS

En el presente estudio, se muestrearon un total de 61 individuos, por los medios anteriormente señalados, en 29 localidades intermedias a las localidades tipo (Tabla 2).

Tabla 2. Especímenes muestreados por localidad, se incluye el tipo de muestra y las coordenadas geográficas.

	Localidad	Especímenes muestreados	Tipo de muestra	Coordenadas geográficas	
1	Los Queules	3	Tejido	35°59'12" S	72°41'23" W
2	Hualpén	1	Tejido	36°47'38" S	73°09'30" W
3	Cerro Caracol	2	Tejido	36°50'15" S	73°02'53" W
4	Cerros UdeC	1	Tejido	36°50'30" S	73°01'33" W
5	R.N. Nonguén	2	Tejido	36°52'16" S	72°58'17" W
6	Villuco	2	Tejido	36°52'47" S	73°01'33" W
7	Cerros de Chiguayante	3	Tórula y tejido	36°56'7" S	73°0'4" W
8	Coronel	2	Tejido	37°2'56" S	73°6'41" W
9	Santa Juana	3	Tórula y tejido	37°6'12" S	72°59'24" W
10	Predio Llico	4	Tejido	37°12'58" S	73°34'57" W
11	Raqui	2	Tejido	37°13'56" S	73°33'14" W
12	Predio Quidico	2	Tejido	37°17'53" S	73°35'31" W
13	Alto Bio Bío	2	Tejido	37°45'54" S	71°46'23" W
14	Río Quilme	1	Tórula	37°49'8" S	71°45'59" W
15	Nahuelbuta/Piedra del Águila	3	Tejido	37°49'26" S	73°03'36" W
16	M.N.Contulmo	3	Tórula y tejido	38°0'46" S	73°11'5" W
17	Cerro Adencul	2	Tórula y tejido	38°14'42" S	72°31'57" W
18	Villa Las Araucarias	2	Tórula y tejido	38°33'40" S	73°13'47" W
19	Cerro Ñielol	3	Tórula y tejido	38°43'34" S	72°35'24" W
20	Santa Amalia	2	Tejido	39°2'3" S	72°59'3" W
21	Pumalal	1	Tejido	39°3'47" S	73°0'35" W
22	Camino a P.N.Villarrica	3	Tórula y tejido	39°22'27" S	71°47'22" W
23	Puringue	3	Tórula y tejido	39°28'19" S	72°58'50" W
24	Malalhue	1	Tórula	39°31'53" S	72°28'19" W
25	La Saval	3	Tórula y tejido	39°48'16" S	73°15'27" W
26	Naguilán	2	Tejido	39°59'36" S	73°20'40" W
27	P.N.Alerce Costero	1	Tejido	40°11'48" S	73°25'55" W
28	Río Correntoso	1	Tejido	41°26'47" S	72°39'54" W
29	Mehuín	1	Tejido	39°26'17" S	73°11'44" W
	TOTAL	61			

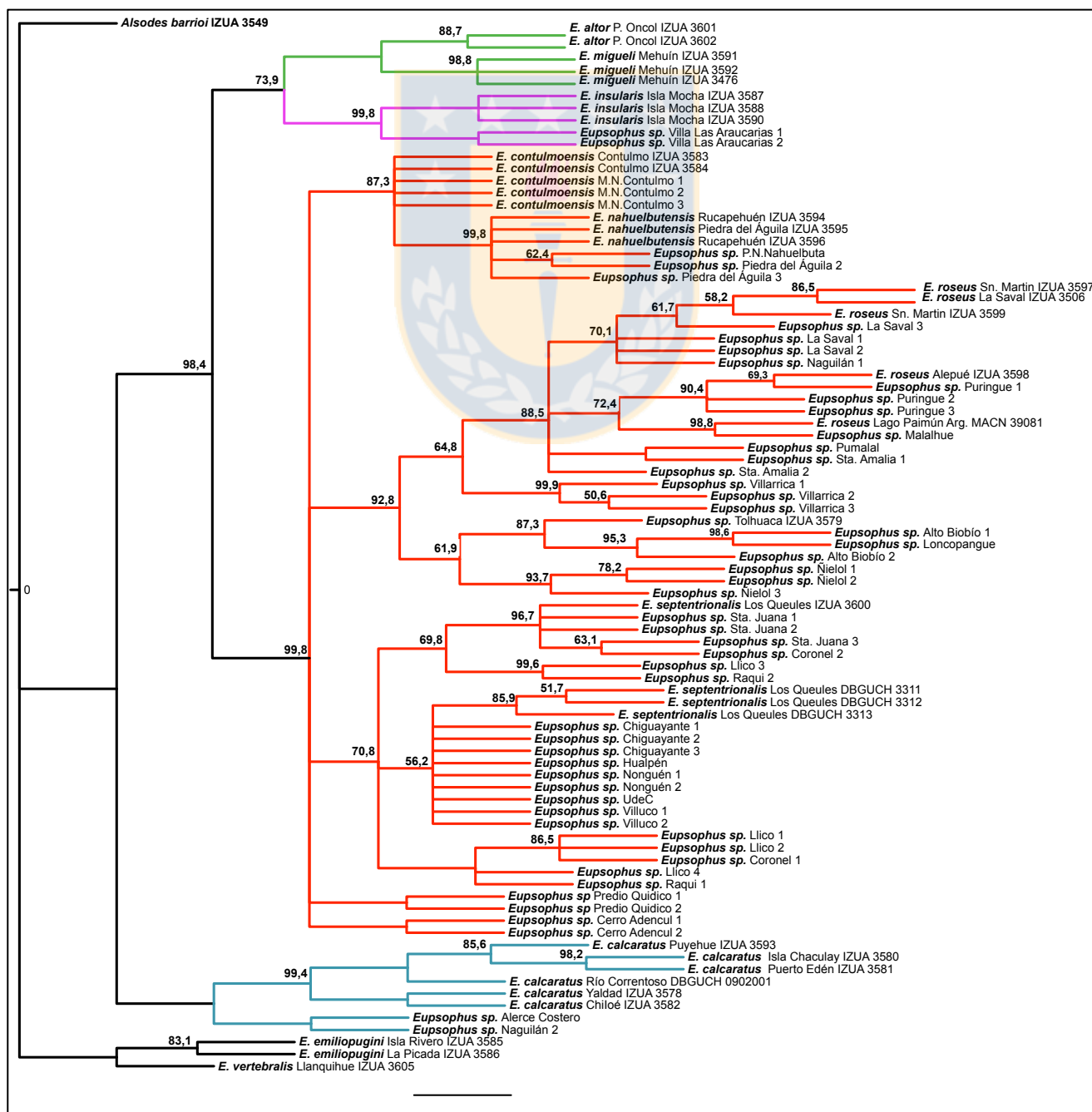
5.1. Análisis filogenéticos

De las muestras obtenidas (tórulas y tejidos) se realizaron extracciones, amplificación por PCR y secuenciación de ADN. Las secuencias se alinearon “al ojo” en base a los espectroferogramas obtenidos y mediante MUSCLE. Luego, los cinco genes fueron concatenados con el programa FaBox (http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/alignment_joiner.php), obteniendo un total de 2685 pares de bases. Tras evaluar las secuencias mediante el Test de Xia, en el programa Dambe (Xia, 2013), se constató que la secuencias obtenidas no se encuentran saturadas. Con el alineamiento final, se procedió a realizar los análisis filogenéticos en base a Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana. Para MP, se corrió un análisis que consideró los gaps de información como un quinto carácter y 2000 réplicas de bootstrap. Con esto se obtuvo el árbol más parsimonioso, de 870 pasos, en base a 376 sitios informativos (Figura 6). Este árbol fue visualizado y editado mediante el programa FigTree V1.4.2. En base a IB, con el programa BayesPhylogenies, se obtuvo un total de 1901 árboles, con los cuales se logro obtener el árbol consenso; éste presentó similar topología al obtenido por MP. Este árbol fue visualizado y editado mediante el programa BayesTrees V1.3. (<http://www.evolution.rdg.ac.uk/BayesTrees.html>) (Figura 7).

En los terminales de la topología obtenida, es posible observar los nuevos 61 especímenes de las 28 localidades de esta tesis (Tabla 2), los 26 especímenes de las 20 localidades obtenidas desde Blotto *et al.* (2013) (Tabla 3) y el grupo externo, siendo esta, la filogenia más completa del género a la fecha. De las especies de *Eupsophus*, es posible observar como el grupo vertebralis (*E. emiliopugini* + *E. vertebralis*) se separa de las especies grupo *roseus*, con un sustento máximo, lo que confirma lo señalado por Blotto *et al.* (2013) y por la literatura, al respecto. Dentro del grupo *roseus*, es posible separar de manera robusta al clado de los especímenes correspondientes a la especie *Eupsophus calcaratus*. Como clado hermano de *E. calcaratus*, encontramos un clado formado, a su vez, por tres grupos con altos valores de sustento a posteriori. El primero de estos corresponde al clado de especímenes afines a *E. insularis* e incluye muestras de la Isla Mocha, única localidad conocida para la especie y de Villa Las Araucarias, localidad ubicada en el límite oeste entre la Región del Biobío y de la Araucanía. Como clado hermano al de *E. insularis*, encontramos el formado por *E.*

migueli y *E. altor*. El tercer grupo de este clado, hermano de *E. insularis* y *E. migueli*, sería el de *E. roseus*, dentro del cual es posible encontrar especímenes de las especies nominales: *E. contulmoensis*, *E. nahuelbutensis*, *E. septentrionalis* y *E. roseus*, así como especímenes de 21 localidades intermedias, ordenados indistintamente.

Figura 6. Árbol obtenido por Máxima Parsimonia, mediante el programa Paup. Se muestran los valores de sustento de bootstrap para cada nodo, salvo aquellos con valor igual a 100. La coloración de los clados es consistente con aquella mostrada en las figuras 10 y 11.



5.2. Análisis por distancia genética

Mediante el programa ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) (Puillandre *et al.*, 2012) se evidenciaron los “Gap” significativos entre las especies del género *Eupsophus* y se obtuvieron los resultados observados en la figura 8.

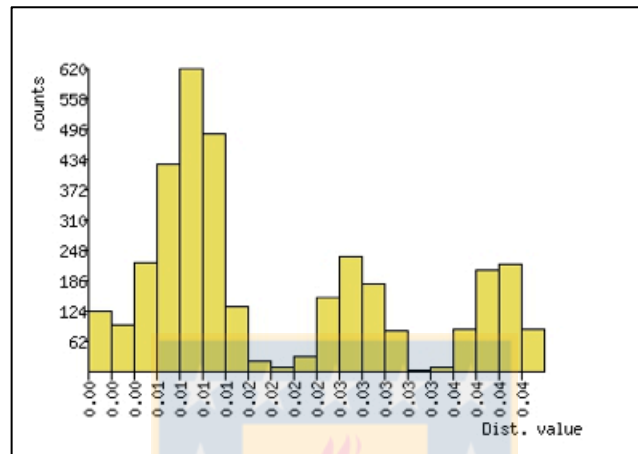


Figura 8. Histograma de diferencias pareadas obtenido por ABGD, donde es posible observar dos “gap” en su distribución, en el 2% de distancia genética y entre 3% y 4%.

El programa ABGD entrega, además, los grupos encontrados en el total de secuencias ingresadas (Figura 9). Es posible constatar como los grupos obtenidos son congruentes con nodos con alto soporte y sus los clados obtenidos en la hipótesis filogenética por Inferencia Bayesiana, es decir, un grupo conformado por *E. migueli* y *E. altor* (1), otro grupo (2) que incluye a *E. insularis* de Isla Mocha y los especímenes de Villa Las Araucarias, otro (3) formado por *E. calcaratus* y finalmente un grupo (4) de 65 individuos, compuestos por especímenes del resto de la localidades, que serían afines a *E. roseus*. Al disminuir los parámetros de distancia, para forzar al programa a formar más grupos (acercándonos a las hipótesis de especies nominales del grupo *roseus*) se observó que el grupo (4) se mantiene entero, con los 65 individuos que lo componen y que, inclusive, se separan los otros grupos, bien sustentados por la filogenia. Esto nos muestra que dentro del grupo (4), las diferencias genéticas sería menores y no suficientes para poder discriminar especies.



Initial Partition with prior maximal distance $P=4.64e-03$
Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000
Download (left click and save) or see below the tree file corresponding to this partition: click [here](#)

Group[1] n: 5 ;id: EaltPOIZUA3601 EaltPOIZUA3602 EmigmIZUA3591 EmigQIZUA3592 EmigmIZUA3476
Group[2] n: 5 ;id: EinsIMIZUA3587 EinsIMIZUA3588 EinsIMIZUA3590 EspVA1 EspVA2
Group[3] n: 8 ;id: EcalPuyIZUA3593 EcalYIZUA3578 EcalIChIZUA3580 EcalPEIZUA3581 EcalChIZUA3582 EcalAC EcalRC0902001 Nag2
Group[4] n: 65 ;id: EconConIZUA3583 EconConIZUA3584 EconMNC EconMNC1 EconMNC2 EnahRIZUA3594 EnahPAIZUA3595 EnahRIZUA3596 PNN3 PNN1PA PNN2PA ErosSMIZUA3597 ErosAleIZUA3598 ErosSMIZUA3599 ErosLSIZUA3506 ErosLS1 ErosLS2 ErosLS3 ErosLPaMACN39081 ErosTIZUA3579 EspPurt1 EspPurt2 EspPurt3 EspPum1 EspSA1 EspSA2 EsepLQIZUA3600 EsepLQ3311 EsepLQ3312 EsepLQ3313 EspCCh1 EspCCh2 EspCCh3 EspSJ1 EspSJ2 EspSJ3 Vil1 Vil2 Vil3 LL1 LL2 LL3 LL4 R1 R2 Q1 Q2 CO1 CO2 H1 N1 N2 U1 V1 V2 ABB1 ABB2 CA1 CA3 Lon1 Nag1 Niet Nie3 Nie4 P9

Figura 9. Grupos obtenidos mediante ABGD, con parámetros de distancia K80 Kimura MinSlope: 1.5.

5.3. Áreas de distribución

Una vez obtenidos los clados con alto sustento de la filogenia y los grupos por distancia genética, se procedió a situarlos geográficamente, para obtener un área tentativa de distribución de los cuatro grupos encontrados (Figura 10 a.b.c).

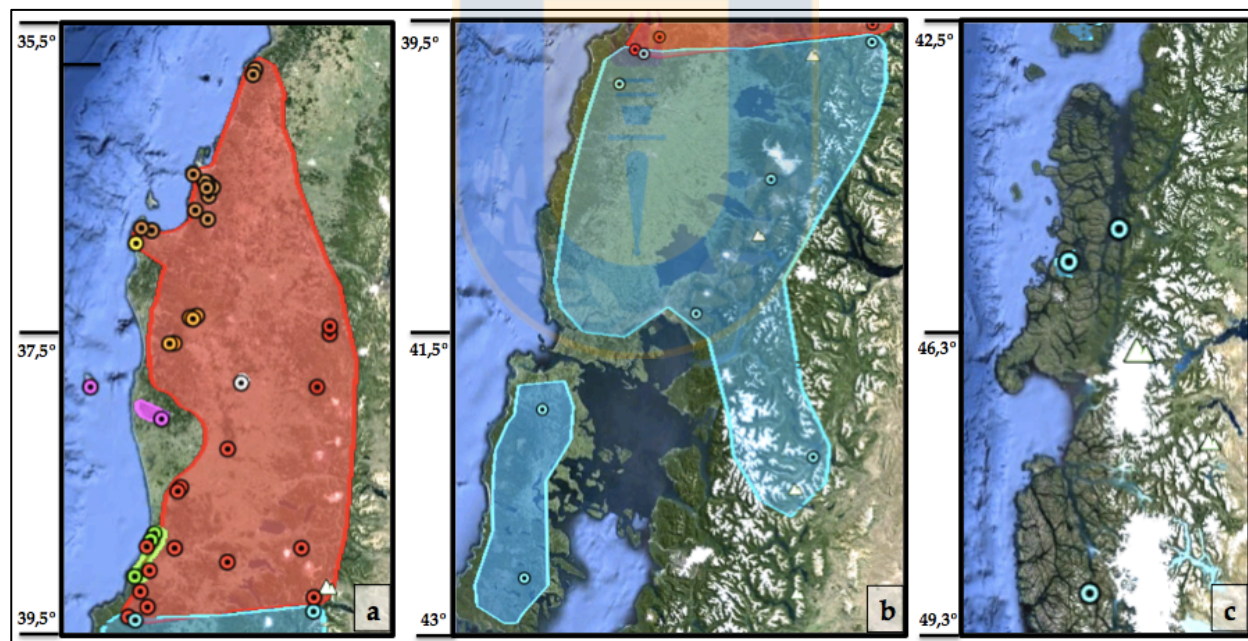
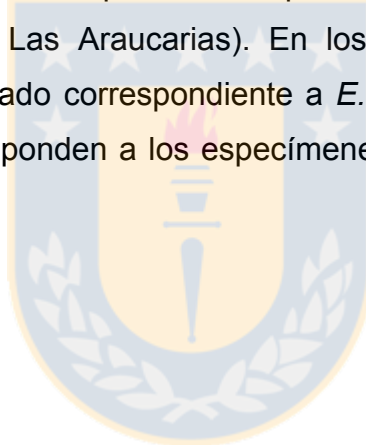


Figura 10 a. b. c. Puntos georeferenciados y áreas tentativas de distribución de los diferentes clados del grupo *roseus* obtenidos por MP, IB y Distancia Genética. (polígono de área rojo y puntos café, amarillo, naranja blanco y rojo = *E. roseus*; polígono de área y puntos rosados = *E. insularis*; polígono de área y puntos verde = *E. migueli*; polígono de área y puntos celeste = *E. calcaratus*).

En el polígono rojo se observa lo que corresponde al grupo de individuos afines a *E. roseus*, que incluye además, ciertas especies descritas (*E. septentrionalis*, *E. contulmoensis*, *E. nahuelbutensis*). En base a la topología obtenida por IB, las especies descritas dentro del clado de *E. roseus* se muestran con puntos con coloraciones diferentes. Es así como, dentro del polígono de *E. roseus* se encuentran especímenes determinados por Blotto *et al.* (2013) como: *E. septentrionalis* (puntos café), *E. contulmoensis* y *E. nahuelbutensis* (puntos naranjos), *E. roseus* (puntos rojos). Además, se muestran en diferentes coloraciones a *E. sp* de Predio Quidico (puntos amarillos) y *E. sp* de Cerro Adencul (puntos blancos), esto debido a que los especímenes de estas dos localidades forman linajes dentro del clado de *E. roseus*, al igual que las especies nominales mencionadas anteriormente. En los puntos y el polígono rosado, se aprecian los especímenes que se reagrupan en el clado de *E. insularis* (Isla Mocha y Villa Las Araucarias). En los puntos y polígono verde, se observan los individuos del clado correspondiente a *E. migueli* (*E. migueli* + *E. altor*). Los puntos y área azul corresponden a los especímenes agrupados en el clado de *E. calcaratus*.



6. DISCUSIÓN

En base a los datos y resultados de los análisis obtenidos, es posible definir las especies del grupo *roseus* que pueden considerarse como válidas, así como su distribución geográfica.

6.1. Especies del grupo *roseus* y su distribución

Eupsophus calcaratus

Dada la sustento estadístico del clado formado por esta especie, que se separa de otras entidades taxonómicas y a la distancia genética que presenta con el grupo más cercano, es posible afirmar que *E. calcaratus* es una especie válida. Esto es consistente con lo planteado por Blotto *et al.* (2013) y si bien la literatura señala una difícil determinación morfológica al compararla con *E. roseus* y una alta variabilidad fenotípica (Nuñez *et al.*, 1999), la evidencia genética nos señala que *E. calcaratus* sería una especie válida. La repartición de linajes y filogeografía de esta especie fue evaluada por Nuñez *et al.* (2011) quienes señalaron la existencia de cinco linajes, distribuidos desde Villarrica (región de la Araucanía) hasta Lago Quetru (región de Aysén). Según nuestros datos, el límite norte de la distribución de la especie sería la región de los Ríos, a la latitud de la localidad de Naguilán y no Villarrica, como señalan Nuñez *et al.* (2011). Esto debido a que en nuestro muestreo incluimos la localidad de Villarrica y aquellos individuos corresponderían a *E. roseus*. Cabe destacar que Naguilán, es la única localidad donde encontramos la presencia de dos especies del grupo *roseus*: *E. roseus* y *E. calcaratus*, por lo que esta área podría corresponder a una zona de simpatría entre estas dos especies, una distribuida hacia el norte y la otra hacia el sur, respectivamente. Por el área de la cordillera de los Andes, el límite norte correspondería a Termas de Epulafquén, localidad no incluida en esta tesis, pero señalada por Blotto *et al.* (2013). Úbeda (2000) señala la presencia de *E. calcaratus* en la localidad de Lago Paimún; sin embargo, según nuestros análisis, las secuencias de aquellos especímenes se agrupan con *E. roseus*. El límite sur de *E. calcaratus* sería la

región de Magallanes y la Antártida Chilena, dado que fue reportada en Isla Wellington (Asencio *et al.*, 2009). Según las localidades analizadas en este estudio, la distribución de *E. calcaratus* sería similar a la observada en la figura 10. b y c. (polígono celeste).

Eupsophus insularis

Esta especie, descrita por Philippi (1902) y revalidada por Formas y Vera (1982) se describe como endémica de la Isla Mocha (Provincia de Arauco, región del Biobío) (Rabanal y Nuñez, 2008). Tras revisar la topología obtenida y las distancias genéticas que separan a esta especie de sus congéneres, es posible sostener que se trata de una especie válida. Sin embargo, a partir de nuestros datos, podemos señalar *E. insularis* no sería endémica de la Isla Mocha, es decir que es posible encontrar individuos genéticamente afines a la especie fuera de dicha isla, en las cercanías de Villa Las Araucarias, localidad ubicada en el continente, a una latitud similar (10 minutos Lat/Sur de diferencia), como se muestra en la figura 11. b. (polígono rosado). Para evaluar de manera más robusta la hipótesis sobre la presencia de *E. insularis* en el continente, sería necesario agregar otras localidades continentales, de similares latitudes a Isla Mocha (tales como Tirúa, Caleta Quidico, Liliicura y Aguas Blancas). Con un mapeo más claro de la presencia de la especie en el continente, es posible formular y poner a prueba hipótesis ligadas a la colonización u origen de la especie, ya sea en la isla o en el continente. Sin embargo, con los datos de la presente investigación, es posible plantear que *E. insularis* presenta una distribución disyunta (insular y continental) con presencia en Isla Mocha y en Villa Las Araucarias (figura 11.b).

Eupsophus migueli

Tanto por distancia genética como por los linajes recuperados por Inferencia Bayesiana, es posible afirmar que las especies *E. migueli* y *E. altor* corresponderían a una sinonimia, donde debería prevalecer la especie *senior*, que en este caso sería *E. migueli*. La descripción de *E. altor* (Nuñez *et al.*, 2012), se basa en la taxonomía integrativa, razón por la cual, los autores exploran diversas aristas con el fin de sumar

argumentos a la hipótesis de nueva especie. Para *E. altor*, realizan diversas comparaciones con las especies más cercanas en cuanto a su distribución, *E. migueli* y *E. roseus*. Tras revisar las metodologías y evidencia presentada, es posible constatar que los autores señalan que existen dos argumentos que sostiene la hipótesis de *E. altor sp. nov.* y estos serían el canto y el modo de desarrollo larvario en ausencia de agua. Argumentos como la morfología (externa e interna), análisis moleculares y cariotípicos no entregan evidencia alguna que diferencie *E. altor* de *E. roseus* y *E. migueli*. Con los análisis filogenéticos en base a ADN mitocondrial realizados por Nuñez *et al.* (2012) no es posible diferenciar a *E. altor* y *E. migueli*. Al analizar los argumentos que sostienen la hipótesis de *E. altor sp. nov.* (canto y desarrollo larvario) se puede observar que: el desarrollo larvario es diferente del de *E. roseus*, ya que esta última utiliza cavidades húmedas; sin embargo, no es posible diferenciarlo de *E. migueli*, ya que se desconoce el modo de desarrollo larval de esta última. Con respecto al canto, se toma como argumento la presencia de canto espectral por sobre los 20 kHz, a diferencia de *E. roseus* y *E. migueli*; sin embargo, los demás parámetros acústicos solapan sus valores. Por la falta de evidencia concreta que delimite *E. migueli* y *E. altor* y dado que la evidencia genética obtenida en esta tesis señala que se trataría de la misma entidad taxonómica, es que se sugiere la sinonimización de ambas especies.

Es posible situar geográficamente el clado de *E. migueli* en una franja costera entre la localidad Queule y Parque Oncol (incluyendo la localidad tipo de *E. migueli*, Mehuín) (Figura 11. c). Si bien no se encontró la presencia de *E. migueli* y *E. roseus* en una misma localidad, nuestros datos señalan que individuos de Alepué, localidad ubicada entre Mehuín y el Parque Oncol, corresponderían a *E. roseus*. Esto sugiere la realización de un muestreo más exhaustivo de la distribución geográfica y posibles zonas de simpatría entre estas dos especies.

Eupsophus roseus

A partir de los datos obtenidos por Inferencia Bayesiana y por distancia genética (DG), es posible sostener que esta especie alberga otras especies descritas, siendo éstas sinonimias de *E. roseus*. Esto sería lo ocurrido con las especies: *E. septentrionalis*, *E. contulmoensis* y *E. nahuelbutensis*. Estas especies fueron descritas dentro del rango de distribución conocido para *E. roseus* (Cei, 1962b) y sus caracteres morfológicos presentan una alta variabilidad intraespecífica, solapándose de forma interespecífica. Las topologías obtenidas sugieren que estas tres especies nominales, corresponden a linajes dentro de una especie de amplia distribución, que sería el caso de *E. roseus*. Esto, más la evidencia entregada por los análisis de distancia genética, validaría la hipótesis 2.1., que señala que dentro del grupo *roseus* existen especies descritas que serían, en realidad, linajes de *E. roseus*. Algo similar ocurre con las muestras recolectadas de Cerro Adencul y Predio Quidico, que en los análisis de distancia genética se agrupan junto a las 65 muestras de *E. roseus*, pero en el árbol filogenético, es posible encontrarlas en linajes separados dentro del clado de *E. roseus*. Por tanto, en el clado de *E. roseus*, sustentado y que conforma un solo grupo por DG, es posible distinguir cinco linajes: *E. roseus septentrionalis*, *E. roseus contulmoensis-nahuelbutensis*, *E. sp* Cerro Adencul, *E. sp* Predio Quidico y *E. roseus* sensu stricto (figura 9. a). Dentro del linaje correspondiente a *E. roseus* sensu stricto es posible encontrar especímenes de las localidades cercanas a la cordillera de los Andes (Alto Biobío, Río Quilme, Tolhuaca, Villarrica, Malalhue y Lago Paimún, Arg.). Llama la atención que, dentro del clado de *E. roseus*, estas localidades se encuentran más emparentadas con especímenes costeros del sur (sector de Valdivia) que con especímenes costeros de latitudes similares. Blotto *et al.* (2013) presenta una filogenia del género e incluyen muestras de Tolhuaca y Lago Paimún y las determinan como *Eupsophus sp.* Tras incluir estas muestras en nuestro análisis, que contempla más localidades de la cordillera de los Andes y localidades geográficamente “intermedias”, es posible observar como estas muestras inciertas para Blotto *et al.* (2013), se agrupan claramente con *E. roseus*.

Por lo planteado anteriormente y los resultados obtenidos, la distribución de *E. roseus* abarcaría una área amplia, que corresponde, en su límite norte desde la R.N. Los Queules (región del Libertador Bernardo O'Higgins) por el oeste (área costera) y por el este (área de la cordillera de los Andes), el sector de Alto Biobío (región del Biobío) y en su límite sur, hasta los 40°S, altura de la localidad de Naguilán (figura 11.a). Esta distribución es congruente con aquella planteada por Cei (1962b), previa descripción de las últimas especies del grupo *roseus*. Esto validaría lo planteado en la hipótesis 2.2, es decir, que la especie *E. roseus* presenta un área de distribución mayor que aquella observada en la literatura contemporánea (Nuñez *et al.*, 1999; Nuñez, 2003; Rabanal y Nuñez, 2008; Veloso *et al.*, 2010).

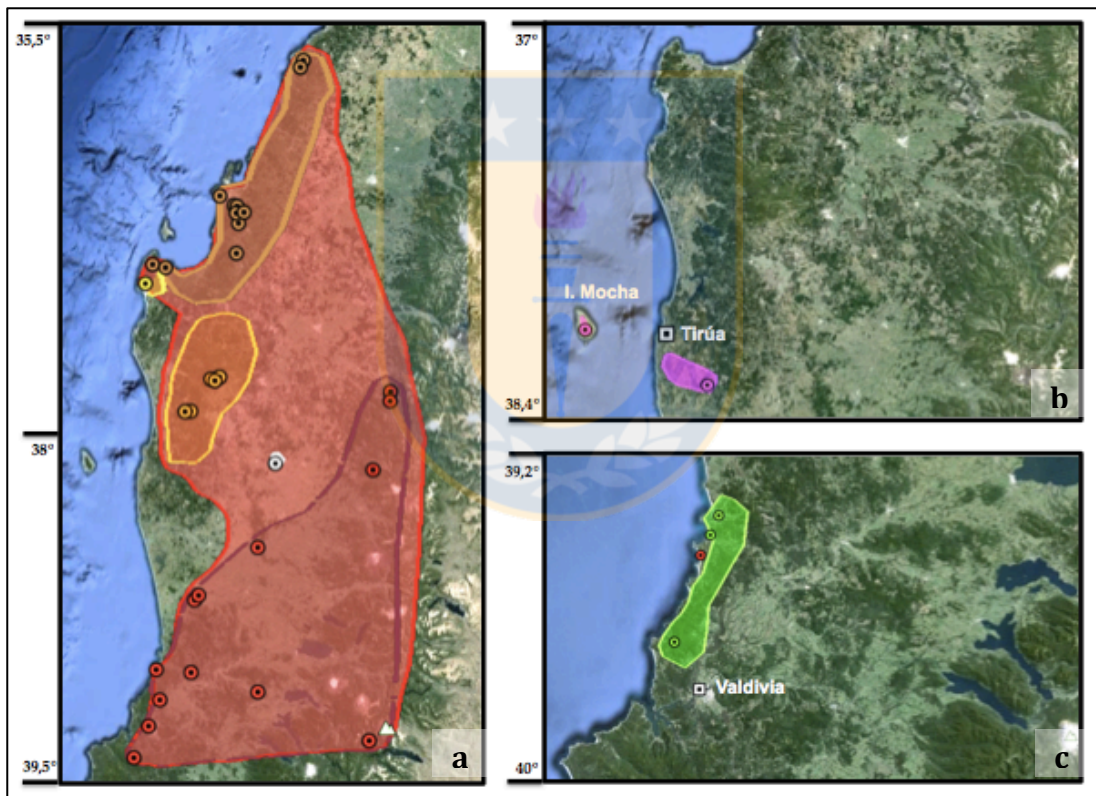


Figura 11 a. Mapa de puntos georeferenciados y área tentativa de la especie *E. roseus*. En el polígono color rojo claro se muestra el área total de la especie, dentro de esta área es posible visualizar zonas en otros colores, correspondientes a los linajes identificados en la topología de MP, IB y análisis de DG (polígono y puntos color café = clado *E. septentrionalis*; polígono y puntos color naranja = clado *E. contulmoensis* + *E.*

nahuelbutensis; polígono y puntos color amarillo = *E. sp* Predio Quidico; polígono y punto color blanco = *E. sp* Cerro Adencul y polígono y puntos color rojo oscuro = *E. roseus* sensu stricto).

b. Área de distribución disyunta de *Eupsophus insularis* (polígonos y puntos rosado).

c. Área de distribución de los individuos del clado de *Eupsophus migueli* (polígono y puntos color verde) (*E. migueli* + *E. altor*). Esta área se sobrepone con un punto con presencia de *E. roseus*, Alepué (punto color rojo) (Blotto *et al.*, 2013), localidad ubicada entre dos localidades de *E. migueli* (Mehuín y Parque Oncol). Sin embargo, estas especies no se han encontrado en simpatría.



7. CONCLUSIONES

7.1. Tras realizar los análisis filogenéticos y de distancia genética, es posible concluir que las especies de grupo *roseus* del género *Eupsophus* corresponden a: *E. roseus*, *E. insularis*, *E. migueli* y *E. calcaratus* (Figura 12).

7.2. Además, es posible sostener que las especies *Eupsophus septentrionalis*, *Eupsophus contulmoensis* y *Eupsophus nahuelbutensis* corresponden a sinonimias de la especie *Eupsophus roseus*. Según la hipótesis filogenética obtenida, estas entidades taxonómicas podrían corresponder a linajes dentro de la especie *E. roseus*, no superpuestos geográficamente.

7.3. La especie *Eupsophus altor* Nuñez, Rabanal & Formas, 2012, correspondería a una sinonimia junior de *Eupsophus migueli* Formas, 1978. Los especímenes pertenecientes a esta especie se distribuyen en una franja costera entre la localidad de Queule (39°22'S) y Parque Oncol (39°42'S).

7.4. Luego de evaluar genéticamente a especímenes de un total de 24 nuevas localidades para el género, es posible sostener que se amplía la distribución de dos especies del grupo *roseus* (*E. insularis* y *E. roseus*). Para el caso de *E. insularis*, es posible establecer que presenta una distribución geográfica disyunta, con presencia de especímenes no solo en la Isla Mocha, sino también en el continente (Villa Las Araucarias). Con respecto a *E. roseus*, se puede sostener que presenta un área de distribución mayor a la conocida actualmente para la especie, que iría desde los 36°S (R.N. Los Queules) hasta los 40°S (Naguilán) y no solo ocuparía áreas boscosas de la depresión intermedia y de la cordillera de la costa, sino que también es posible encontrarla distribuida en la cordillera de los Andes, desde Alto Biobío (37°45'S) hasta el Lago Paimún, Argentina (39°43'S).

7.5. La especie *Eupsophus calcaratus* sería una especie válida, al pertenecer a un clado bien sustentado, separado de las otras especie del grupo *roseus*. Según nuestros

datos, su límite de distribución norte se ubicaría a los 36°S, en la localidad de Naguilán, siendo esta la única localidad donde se encontraron dos especies del género en simpatria, precisamente con *Eupsophus roseus*.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aliabadian M., M Kaboli, V. Nijman, M. Vences (2009). Molecular identification of birds: performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species. *PloS One*, 4 (1): e4119. DOI :10.1371/journal.pone.0004119.
2. Asencio J., A. Kusch, J.M. Henríquez, J. Cárcamo (2009). Registros de anfibios en el bosque norpatagónico costero del canal de Messier, Chile. *Anales Instituto Patagonia*, 37 (1): 113-116.
3. Bell T. (1843). The Zoology of The Voyage on H.M.S. Beagle, under command of Captain Fitzroy, R.N., during the years 1832 to 1836. Part V Reptiles. Smith, Elder and Co. Editions. London, England.
4. Blotto, B.L., J.J. Nuñez, N.G. Basso, C.A. Úbeda, W.C. Wheeler, J. Faivovich (2013). Phylogenetic relationships of a Patagonian frog radiation, the *Alsodes* + *Eupsophus* clade (Anura: Alsodidae), with comments on the supposed paraphyly of *Eupsophus*. *Cladistics* 29 (2): 113–131. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-0031.2012.00417>.
5. Bonacum, J., R. DeSalle, P.M. O’Grady, D.S.C.G. Olivera, J. Wintermute, M. Zilversmit (2001). New nuclear and mitochondrial primers for systematics and comparative genomics in Drosophilidae. *Drosophila Information Service*, 84, 201 – 204.
6. Bossuyt, F., M.C. Milinkovitch (2000). Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (12), 6585–6590. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.12.6585>.

7. Cei J.M. (1960). A survey of the leptodactylid frogs, genus *Eupsophus*, in Chile. *Breviora*, 118: 1-13.
8. Cei J.M. (1962a). El género *Eupsophus* en Chile. *Invest. Zool. Chil.* 8: 7- 42.
9. Cei J.M. (1962). Los Batracios de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago, Chile. 128 pp.
10. Correa, C., A. Veloso, P. Iturra, M.A. Méndez (2006). Phylogenetic relationships of Chilean leptodactylids: a molecular approach based on mitochondrial genes 12S and 16S. *Rev. Chil. de Hist. Nat.*, 79 (4): 435- 450. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2006000400003>.
11. Correa, C., G. Lobos, L. Pastenes, M.A. Méndez (2008). Invasive *Pleurodema thaul* (Anura, Leiuperidae) from Robinson Crusoe Island: Molecular identification of its geographic origin and comments on the phylogeographic structure of this species in mainland Chile. *Herpetol. J.*, 18 (2): 77– 82.
12. Clare E.L., K.L. Burton, M.D. Engstrom, J.L. Eger, P.D.N. Hebert (2006). DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Mol. Ecol. Notes*, 7: 184- 190.
13. Clare E.L. (2011). Cryptic Species? Patterns of Maternal and Paternal Gene Flow in Eight Neotropical Bats. *PLoS ONE*, 6 (7): e21460. DOI: [10.1371/journal.pone.0021460](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021460).
14. De Salle R. (2006). Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. *Conserv. Biol.*, 20: 1545 – 1547.
15. Díaz, N.F. (1986). Biosistemática de los Leptodactylidae Chilenos. *An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso*, 17:65-85.

16. Duméril C., G. Bibron (1841). Batraciens Anoures. Erpétologie Générale. pp: 657-659.

17. Edgar R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput" *Nucleic Acids Research*, 32 (5): 1792–97. doi:10.1093/nar/gkh340.

18. Faivovich, J., C.F.B. Haddad, P.C.A. Garcia, D.R. Frost, J.A. Campbell, W.C. Wheeler (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 294: 1–240.

19. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783- 791.

20. Fitzinger, L. (1843). Systema Reptilium. Fasciculus primus Amblyglossae. Braumüller and Seidel, Vienna.

21. Formas, J.R. (1978). A new species of leptodactylid frog (*Eupsophus*) from the Coastal Range in southern Chile. *Stud. Neotrop. Fauna E.*, 13: 1- 9.

22. Formas, J.R. (1979). La herpetofauna de los bosques temperados de Sudamérica. En: Duellman, W. (ed.) The South American Herpetofauna: its origin, evolution and dispersal *Univ. Kansas Publ. Mus. Natur. Hist.* Monograph: 7. 341-369.

23. Formas, J. R. (1981). Adaptaciones larvarias de los anuros del bosque templado austral de Sudamérica. *Med. Amb.*, 5: 15- 21.

24. Formas, J. R. (1989a). The tadpole of *Eupsophus calcaratus* in Southern Chile. *J. Herpetol.*, 23 (2): 195-197.

25. Formas, J. R. (1989b). A new species of *Eupsophus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from Southern Chile. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 102: 568 - 576.
26. Formas J. R. (1991). The karyotypes of the chilean frogs *Eupsophus emiliopugini* and *E. vertebralis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 104 (1): 7- 11.
27. Formas J. R. y L. Brieva (1994). Advertisement calls and relationships of chilean frogs *Eupsophus contulmoensis* and *E. insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 107 (2): 391- 397.
28. Formas, J., M. Vera (1982). The status of two chilean frogs of the genus *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 95: 594-601.
29. Formas, J., M. Vera, S. Lacrampe (1983). Allozymic and morphological differentiation in the south american frog genus *Eupsophus*. *Com. Biochem. Physiol.*, 75 (3): 475- 478.
30. Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R., Haas, A., Haddad, C.F.B., de Saal, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D., Wheeler, W.C. (2006). The Amphibian tree of life. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 297: 1–370.
31. Gallardo, C.E., C. Correa, P. Morales, P.A. Sáez, L. Pastenes, M.A. Méndez (2012). Validation of a cheap and simple nondestructive method for obtaining AFLPs and DNA sequences (mitochondrial and nuclear) in amphibians. *Mol. Ecol. Res.*, 12 (6): 1090– 1096.

32. Gallardo, J. M. (1962). Los géneros *Eupsophus* y *Batrachyla* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina y la verdadera identidad de *Paludicola illota* Barbour. *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. "Bernardino Rivadavia"*, 8: 113–122.
33. Gallardo, J.M. (1970). A propósito de los Telmatobiinae (Anura-Leptodactylidae) patagónicos. *Neotropica*, 16: 73- 85.
34. Goebel, A.M., J. M. Donnelly, M.E. Atz (1999). PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Mol. Phyl. Evol.*, 11 (1): 163- 199. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.1998.0538>.
35. Grandison, A. (1961). Chilean species of the genus *Eupsophus*. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist.*, 9: 111- 149.
36. Günther, A. C. L. G. (1881). Account of the zoological collections made collected during the survey of H.M.S. "Alert" in the Straits of Magellan and on the coast of Patagonia. III. Reptiles, batrachians, and fishes. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 1881: 18–22.
37. 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.
38. Hamels, J., L. Gala, S. Dufour, P. Vannuffel, N. Zammateo, J. Remacle (2001). Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *BioTechniques*, 31: 1364–1372.

39. Hebert P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. deWaard (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*: 270, 313–321. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.
40. Hedges, S. B. (1994). Molecular evidence for the origin of birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 2621–2624.
41. Hogg I.D., Hebert P.D.N. (2004). Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can. J. Zool.*, 82: 749- 754.
42. Holzapel C. (2007). Diferenciación haplotípica de *Eupsophus roseus* (Anura: Neobatrachia) a través de secuencias nucleotídicas de la región control mitocondrial. Tesis de grado para Licenciado en Ciencias Biológicas. Universidad Austral de Chile.
43. Hubert N., R. Hanner, E. Holm, N.E. Mandrak, E. Taylor, M. BurrIDGE, D. Watkinson, P. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April, L. Bernatchez (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE*, 3 (6): e2490. DOI:10.1371/journal.pone.0002490.
44. Ibarra-Vidal, H., J.C. Ortiz, F. Torres-Pérez (2004). *Eupsophus septentrionalis* n. sp., nueva especie de Leptodactylidae (Amphibia) de Chile central. *Bol. Soc. Biol. Concepc.* 75: 91–102.
45. Ivanova N.V., E.L. Clare, A.V. Borisenko (2012). DNA barcoding in mammals. *Methods Mol. Biol.* 858: 153-182.
46. Jin Jeong T., J. Jun, S. Han, H.T. Kim, K. Oh, M. Kwak (2013). DNA barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications. *Mol. Ecol. Res.*, DOI: 10.1111/1755-0998.12055.

47. Kerr K.C.R., M.Y. Stoeckle, C.J. Dove, L.A. Weigt, C.M. Francis, P.D.N. Hebert (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol Ecol. Notes.*, 7: 535- 543.
48. Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer S. Paabo, F. X. Villablanca, A. C. Wilson (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 6196-6200.
49. Koubínová D., N. Irwin, P. Hulva, P. Koubek, J. Zima (2013). Hidden diversity in Senegalese bats and associated findings in the systematics of the family Vespertilionidae. *Front. Zool.*, 10: 48.
50. Larizza A., G. Pessole, C. Saccone (1999). Systematic and evolutionary studies in mammals: the contribution of the mitochondrial genome. *Ital. J. Zool.*, 66: 233- 238.
51. Lynch, J. D. (1971). Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. *Univ. Kansas Publ. Mus. Natur. Hist.*, 53: 1- 238.
52. Lynch, J. (1972). Generic partitioning of the South American leptodactylid frog genus *Eupsophus* Fitzinger, 1843 (sensu lato). *Bull. S. Calif. Acad. Sci.*, 71: 2 – 11.
53. Mabrugaña E., J.M. Díaz de Astarloa, R. Hanner, J. Zhang, M. González-Castro (2011). DNA barcoding identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. *PLoS ONE*, 6 (12): e28655. doi:10.1371/journal.pone.0028655.
54. Nanney, D. L., (1982). Genes and phenes in *Tetrahymena*. *Bioscience*, 32, 783–788.

55. Nicoli, L., (2012). On the putative presence of *Eupsophus* (Anura: Cycloramphidae) in Central Patagonia during the Oligocene. *Herpetologica*, 68 (2): 236- 243.
56. Nuñez, J., (2003). Taxonomía y sistemática de las ranas del género *Eupsophus* (Leptodactylidae). Tesis Doctorado en Ciencias. Escuela de Graduados. Universidad Austral de Chile. 114 pp.
57. Nuñez, J. J., Zárraga, A. M., Formas, J. R (1999). New molecular and morphometric evidence for the validation of *Eupsophus calcaratus* and *E. roseus* (Anura: Leptodactylidae) in Chile. *Stud. Neotrop. Fauna & Environm.* 34: 150 - 155.
58. Nuñez J. J., C.A. Úbeda (2009). The tadpole of *Eupsophus nahuelbutensis* (Anura: Neobatrachia): external morphology, chondrocranium, and comments on its natural history. *Zootaxa*, 2126: 58- 68.
59. Nuñez, J.J., N. Koontz, F. Rabanal, F. Fontanella, and J.W. Sites, Jr. (2011). Amphibian phylogeography in the Antipodes: refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distributions in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). *Molecular Phylogenetics & Evolution* 58, 343-352.
60. Nuñez J. J., F.E. Rabanal, J. R. Formas, (2012). Description of a new species of *Eupsophus* (Amphibia: Neobatrachia) from the Valdivian Coastal range, Southern Chile: an integrative taxonomic approach. *Zootaxa*, 3305: 53- 68.
61. Ortiz J.C., H. Ibarra-Vidal, J.R. Formas (1989). A new species of *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae) from Contulmo, Nahuelbuta Range, Southern Chile. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 102: 1031-1035.

62. Ortiz J.C., H. Ibarra-Vidal (1992). Una nueva especie de Leptodactylidae (*Eupsophus*) de la cordillera de Nahuelbuta (Chile). *Acta Zool. Lill.*, 41: 75- 79.
63. Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276: 734- 740.
64. Padial J.M., A. Miralles, I. De la Riva, M. Vences (2010). The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.*, 7: 16.
65. Page, R. D. M., E. C. Holmes (1998). *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Londres, U.K. 352 pp.
66. Pagel M, A. Meade (2004). A phylogenetic mixture model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character-state data. *Syst. Biol.* 53, 571–581. doi:10.1080/10635150490522232
67. Parker N.W. (1932). The systematic status of some frogs of the Vienna Museum. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 10: 341- 344.
68. Palumbi S.R., A. Martin, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice, G. Grabowski (1991). *The simple fool's guide to PCR, Version 2.0*. Privately published document compiled by Palumbi S. Special Publication of Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, U.S.A. 44 pp.
69. Phillippi, R. (1902). *Suplemento a los Batraquios Chilenos Descritos en la Historia Física i Política de Chile de Don Claudio Gay*. Librería Ivens, Santiago, Chile. 161 pp.
70. Puillandre N., A. Lambert, S. Brouillet, G. Achaz (2011). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21: 1864- 1877.

71. Pyron R. A., J. J. Wiens (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders and caecilians. *Mol. Phyl. Evol.*, 61 (1): 543-583.
72. Rabanal F.E. & J.J. Núñez. (2008). Anfibios de los Bosques templados de Chile. Primera Edición. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 206 pp.
73. Richards, C. M., Moore, W. S. (1996). A phylogeny for the African treefrog family Hyperoliidae based on mitochondrial rDNA. *Mol. Phyl. Evol.* 5: 522–532.
74. Rougerie R., I.J. Kitching, J. Haxaire, S.E. Miller, A. Hausmann, P. D. N. Hebert (2014). Australian Sphingidae – DNA barcodes challenge current species boundaries and distributions. *PLoS ONE*, 9 (7): e101108. doi:10.1371/journal.pone.0101108.
75. Saccone C., C. De Giorgi, C. Gissi, G. Pessole, A. Reyes (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238: 195-209.
76. Saccone C., C. Gissi, C. Lavane, A. Larizza, G. Pessole, A. Reyes (2001). Evolution of the mitochondria genetic system: an overview. *Gene*, 261: 153- 159.
77. Schaeffer, B. (1949). Anurans from the early Tertiary of Patagonia. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 93: 47- 68.
78. Spies I. B., S. Gaichas, D. E. Stevenson, J. W. Orr, M. F. Canino (2006). DNA based identification of Alaska skates (*Amblyraja*, *Bathyraja* and *Raja*: Rajidae) using cytochrome c oxidase subunit I (COI) variation. *J. Fish Biol.* (Suppl. B) 69: 283 – 292.

79. Swofford, D.L. (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
80. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. and Evol.*, 30: 2725-2729.
81. Úbeda C. (2000). *Eupsophus calcaratus* (Anura, Leptodactylidae): ampliación de su distribución geográfica y hábitats en Argentina. *Cuad. Herpet.* 14 (1): 71 – 74.
82. Úbeda C., A. Veloso, H. Núñez, J.R. Formas, N. Basso (2010). *Eupsophus emiliopugini*. The UICN red list of threatened species. Version 2014.2 <www.uicnredlist.org>. Downloaded on 29 December 2014.
83. Vaira M., M. Akmentins, M. Attademo, D. Baldo, D. Barrasso, S. Barrionuevo, N. Basso, B. Blotto, S. Cairo, R. Cajade, J. Céspedes, V. Corbalán, P. Chilote, M. Duré, C. Falcione, D. Ferraro, F. R. Gutierrez, M. R. Ingaramo, C. Junges, R. Lajmanovich, J. N. Lescano, F. Marangoni, L. Martinazzo, R. Marti, L. Moreno, G. S. Natale, J. M. Pérez-Iglesias, P. Peltzer, L. Quiroga, S. Rosset, E. Sanabria, L. Sanchez, E. Schaefer, C. Úbeda, V. Zaracho (2012). Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuad. herpetol.* 26 (1): 131-159.
84. Veloso, A., J. Celis-Diez, P. Guerrero, M. Méndez, P. Iturra, J. Simonetti (2005). Description of a new *Eupsophus* species (amphibia, leptodactylidae) from the remnants of Maulino Forest, central Chile. *Herpetol. J.*, 15: 159-165.
85. Veloso A., H. Núñez, J.C. Ortiz. (2010) *Eupsophus roseus*. The UICN red list of threatened species. Version 2014.3 <www.uicnredlist.org>. Downloaded on 29 December 2014.

86. Vences, M., M. Thomas, R.M. Bonett, D.R. Vieites (2005). Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360:1859–1868.

87. Villesen, P (2007). *FaBox: an online toolbox for fasta sequences*, *Molecular Ecology Notes* 7 (6), 965–968. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x

88. Wiemers M., K. Fiedler (2007). Does Dna Barcoding gap exist? A case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Front. Zool.* 4: 8.

89. Xia, X. 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30:1720-1728.



9. ANEXOS

Tabla 3. Especímenes utilizados en este estudio, tomados de Blotto *et al.*, (2013), indicando localidad y código de museo.

Especie	Localidad	Cód. Museo
<i>Eupsophus altor</i>	Parque Oncol	IZUA 3601
<i>Eupsophus altor</i>	Parque Oncol	IZUA 3602
<i>Eupsophus migueli</i>	Mehuín	IZUA 3591
<i>Eupsophus migueli</i>	Queule	IZUA 3592
<i>Eupsophus insularis</i>	Isla Mocha	IZUA 3587
<i>Eupsophus insularis</i>	Isla Mocha	IZUA 3588
<i>Eupsophus insularis</i>	Isla Mocha	IZUA 3590
<i>Eupsophus calcaratus</i>	Puyehue	IZUA 3593
<i>Eupsophus calcaratus</i>	Yaldad	IZUA 3578
<i>Eupsophus calcaratus</i>	Isla Chaculay	IZUA 3580
<i>Eupsophus calcaratus</i>	Puerto Edén	IZUA 3581
<i>Eupsophus calcaratus</i>	Chiloe	IZUA 3582
<i>Eupsophus contulmoensis</i>	Contulmo	IZUA 3583
<i>Eupsophus contulmoensis</i>	Contulmo	IZUA 3584
<i>Eupsophus nahuelbutensis</i>	Rucapehuén	IZUA 3594
<i>Eupsophus nahuelbutensis</i>	Rucapehuén	IZUA 3596
<i>Eupsophus nahuelbutensis</i>	Piedra del Águila	IZUA 3595
<i>Eupsophus roseus</i>	San Martin	IZUA 3597
<i>Eupsophus roseus</i>	San Martin	IZUA 3599
<i>Eupsophus roseus</i>	Alepué	IZUA 3598
<i>Eupsophus roseus</i>	Lago Paimún, Arg.	MACN 39081
<i>Eupsophus roseus</i>	Tolhuaca	IZUA 3579
<i>Eupsophus septentrionalis</i>	Los Queules	IZUA 3600
<i>Eupsophus emiliopugini</i>	La Picada	IZUA 3586
<i>Eupsophus emiliopugini</i>	Isla Rivero	IZUA 3585
<i>Eupsophus vertebralis</i>	Llancahue	IZUA 3605

Figura 12. Árbol editado y obtenido por Inferencia Bayesiana, donde se muestran las especies resultantes del presente estudio.

