



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Biología

Determinación de la diversidad específica de los *Alsodes* australes de Chile

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Biólogo

POR ESTEBAN MANUEL SAN FRANCISCO AEDO



CONCEPCIÓN, CHILE

MARZO DEL 2024

Profesor Guía: Claudio Correa Quezada

Departamento de Zoología

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Claudio Correa Quezada.
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora:



Dr. Juan Carlos Ortiz.
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. Daniel Gómez Uchida.
Evaluador Externo
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	3
INDICE DE FIGURAS.....	5
INDICE DE TABLAS.....	6
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. El género <i>Alsodes</i>	10
1.2. Evidencia morfológica.....	12
1.3. Evidencia cromosómica.....	13
1.4. Evidencia filogenética.....	15
1.5. Distribución de los <i>Alsodes</i> australes.....	15
1.6. Resumen de las distribuciones de los <i>Alsodes</i> australes.....	16
2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVO GENERAL.....	22
5. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	22
6. MATERIALES Y METODOS.....	23
6.1. Localidades de muestreo y muestras incluidas.....	23
6.2. Marcadores moleculares y extracción de ADN.....	26
6.3. Análisis molecular.....	26
6.4. Análisis de delimitación de especies.....	27
6.5. Estructura genética y análisis demográfico.....	27
7. RESULTADOS.....	29
7.2. Análisis filogenético.....	29
7.3. Red de haplotipos.....	32
7.4. Diversidad genética.....	34
7.5. Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	36

7.6. Análisis de delimitación de especies.....	38
8. DISCUSIÓN	40
9. BIBLIOGRAFÍA.....	48



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de <i>Alsodes</i> australes.....	19
Figura 2. Nuevo mapa de distribución de <i>Alsodes</i> australes	25
Figura 3. Árbol consenso de inferencia bayesiana.....	31
Figura 4. Red de haplotipos del gen citocromo b	33
Figura 5. Análisis de delimitación de especies.....	39



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de resumen de datos cromosómicos.	14
Tabla 2. Nuevas poblaciones incluidas en el análisis filogenético,	24
Tabla 3. Diversidad genética.	35
Tabla 4. Resultados tabla AMOVA,	37



RESUMEN

Alsodes Bell, 1843 es el género de anuros más diverso del cono sur, con 19 especies reconocidas actualmente. El género se distribuye entre los 32°S y 50°S en Chile y Argentina. En la zona sur y austral de Chile se reconocen seis especies, cuatro de ellas (*A. australis*, *A. coppingeri*, *A. verrucosus* y *A. kaweshkari*) presentan un solapamiento en gran parte de sus distribuciones geográficas, entre los 40°S y 50°S. Además, existen registros de estas cuatro especies en el límite sur de esta zona, específicamente en la Isla Wellington. Algunos autores indican que esto sugiere la existencia de un centro de diferenciación específica en el límite distribucional austral del género para explicar este alto nivel de riqueza. Sin embargo, la evidencia que respalda la diversidad de los *Alsodes* australes en el extremo sur de su distribución no es concluyente. Por lo tanto, el objetivo principal de esta investigación radicó en determinar la diversidad específica de los *Alsodes* australes en la región comprendida entre los 40° y 50°, con énfasis en comprobar la existencia del centro de diferenciación específica en el límite distribucional austral del género. Para esto se realizaron distintos análisis genéticos y filogenético, utilizando secuencias de los genes mitocondriales citocromo b y un fragmento que abarca los genes 12S+ tRNAval +16S de varios especímenes de poblaciones del género *Alsodes* que se distribuyen entre los 40°S y 50°S. Los resultados indican que la distribución geográfica de *A. coppingeri* no se encuentra restringida a la zona austral de Chile, colindando hacia el norte de esta localidad con la distribución de *A. verrucosus* y hacia la cordillera de la costa con *A. valdiviensis*. Por otro lado, se puede observar un patrón de mayor diversidad genética a lo largo de las regiones costeras de Chile, junto con linajes poblacionales distribuidos ampliamente y más homogéneos genéticamente a medida que nos acercamos a latitudes más australes, lo que pone en duda la existencia de un centro de diferenciación específica en el límite distribucional austral del género *Alsodes*.

Palabras claves: Diversidad específica, *Alsodes*, Distribución geográfica.

1. INTRODUCCIÓN

La sistemática es una disciplina de la biología comparada que estudia las relaciones jerárquicas de los linajes, que toman un nombre de acuerdo con los grupos resultantes. Su objetivo es ordenar la diversidad biológica en categorías jerárquicas que reflejen la ascendencia evolutiva de los organismos (Mayr, 1968). Esto implica que los miembros de un grupo comparten algún tipo de relación que no comparten con otros, con el fin de proporcionar un marco sistemático que facilite la comunicación y el estudio de la biodiversidad (Wiley & Lieberman, 2011). Aborda tres aspectos fundamentales: 1) reconocer la biodiversidad, es decir, identificar a las especies y definir otros taxa superiores, 2) reconstruir la filogenia o historia evolutiva de los taxa, y 3) elaborar clasificaciones fieles a la filogenia. Desde este punto de vista, la sistemática conforma la base para otros campos de la biología comparada, al proporcionar las hipótesis filogenéticas que se utilizan, por ejemplo, para interpretaciones en un marco evolutivo (Harvey & Pagel, 1991). En este contexto, las especies constituyen la unidad primordial que componen estos grupos taxonómicos. Es por esto que conocer la diversidad de especies de un grupo taxonómico o de una región geográfica, no solo es importante para disciplinas como la ecología, biología evolutiva y biogeografía (Morrone, 2006), sino que también constituyen las unidades básicas para establecer el estado de conservación de la biodiversidad. Por este motivo, el desconocimiento y la incertidumbre taxonómicas pueden afectar directa o indirectamente la investigación en todos los ámbitos biológicos (Correa, 2022).

Los anfibios conforman en nuestros días uno de los grupos de vertebrados más amenazados por efecto antrópico. Se trata de un grupo compuesto por alrededor de 8.694 especies (AmphibiaWeb, 2023) a nivel mundial y se divide en tres órdenes: Caudata (salamandras y tritones), Gymnophiona (cecilias) y Anura, que reúne a los anfibios más conocidos como las ranas y sapos (Pough et al., 2013). En términos de diversidad, de las 8.694 especies reconocidas, el mayor

porcentaje de ellos corresponde a Anura y es el orden que representan los únicos anfibios presentes en Chile (Veloso & Navarro, 1988).

Los primeros análisis sistemáticos de Anura se basaron principalmente en la observación de caracteres morfológicos en adultos, como la coloración, granulaciones, el cráneo, la cintura, la musculatura del muslo, la lengua, el aparato hiolaríngeo y la columna vertebral, así como en la morfología de las larvas (Ford & Cannatella, 1993; Lynch, 1973).

El constante desarrollo de nuevas herramientas analíticas y tecnológicas en el área de la sistemática, estrechamente ligadas a la incorporación de datos moleculares, en la actualidad se han convertido en una pieza fundamental de la biología moderna. Existe una amplia gama de marcadores moleculares que son directamente responsables de los avances en varias áreas de investigación, como la genética de poblaciones, e incluso han tomado una importante relevancia en la inferencia de filogenias de especies (Thomson et al., 2010). Uno de los tipos de marcadores moleculares más utilizados en análisis filogenéticos en un sinnúmero de taxa es el ADN mitocondrial (ADNmt) (Beltrán-Torres & Hernández-Fernández, 2018; Cardoso, 2014; Montero & Autino, 2009). Esta molécula es de pequeño tamaño, posee un alto contenido de residuos adenina-timina, carece de bases metiladas, no sufre recombinación, corresponde a una molécula haploide (n), se hereda exclusivamente por vía materna, posee regiones universalmente conservadas y otras variables, presenta una rápida tasa de evolución y es relativamente fácil de obtener. Por estas razones y características, ha sido la principal fuente de secuencias de ADN para realizar análisis filogenéticos (Avice, 1986; Caterino et al., 2000; Hillis, 1987; Burns et al., 2003)

La incorporación de herramientas genéticas también ha permitido modificar y profundizar nuestro conocimiento de la diversidad de los anfibios. Como ejemplo, uno de los cambios más significativos en la taxonomía de los anfibios de Chile

ha sido aumento de las familias nativas de tres a siete (Pyron & Wiens, 2011), lo cual implica que en nuestro país hay una mayor diversidad evolutiva de la que se había asumido (Correa et al., 2016). Estos avances han posibilitado la realización de muchas hipótesis filogenéticas, lo cual también ha provocado una inestabilidad taxonómica que se ha traducido en profundos cambios en los esquemas de clasificación. Por otro lado, estos estudios sistemáticos han mejorado notablemente nuestra percepción acerca de la diversificación de los anfibios. Este tema adquiere especial relevancia si consideramos el incompleto estado de conocimiento de su diversidad, revelado no sólo por los numerosos cambios taxonómicos, sino también por la continua descripción de especies (Vidal & Labra, 2008)

En el caso de los anfibios de Chile, el número de especies nativas ha fluctuado constantemente en los últimos 60 años. En 2013 se alcanzó un máximo de 63 (Lobos et al., 2013), pero desde esa fecha se ha producido una disminución debido a varios cambios taxonómicos y trabajos sistemáticos. Desde 2019 hasta 2021, se reconocieron 60 especies (Correa, 2022). Por último, la reciente sinonimización de tres especies del género *Telmatobius* (Von Tschirnhaus & Correa, 2021) redujo este número a 58.

1.1. El género *Alsodes*

Alsodes Bell, 1843 es el género de anuros más diverso del cono sur (Chile y Argentina). Como características generales, estos anuros se caracterizan por ser de cuerpo robusto y fuerte, carecen de ventana timpánica externa, y en los machos se puede observar durante la época reproductiva un engrosamiento de las extremidades anteriores, además de la presencia de parches en la zona pectoral formados por espinas queratinosas de tamaños variables. Estas formaciones de queratina también se aprecian tapizando los tubérculos palmares internos y, generalmente, extendiéndose hacia el primer y segundo dedo de la mano (Ceí, 1980; Cuevas, 2008; Gallardo, 1970). Actualmente se reconocen 19

especies, de las cuales 13 son endémicas de Chile (Correa, 2022). Su distribución total es entre los 32°S y 50°S (Rabanal et al., 2022). En Chile se distribuye en diferentes ecorregiones a lo largo del país, por ejemplo, en la zona mediterránea y zona andina, aunque también se considera un género más típico de los bosques templados y ambientes patagónicos en el sur de América del sur (Charrier et al., 2015).

Entre las especies de *Alsodes* que se distribuyen en los Andes podemos encontrar varias que presentan poblaciones sobre los 2000 m s.n.m.: *A. montanus*, *A. tumultuosus*, *A. pehuenche* y *A. hugoi*, las cuales han sido mencionadas en una serie de reportes que han permitido conocer mejor su distribución geográfica (Araya & Riveros, 2008; Correa et al., 2013; Correa et al., 2018; Ramírez Álvarez, 2015). Sin embargo, estos estudios también revelaron el escaso conocimiento biogeográfico que se tiene de este género (Correa et al., 2018).

Más al sur, en Chile y Argentina, entre los 40°S y 50°S, se encuentran varias especies que habitan las laderas de los Andes, usualmente por debajo de los 1500 m s.n.m., así como porciones insulares de Chile, como es el caso de *A. australis*, *A. coppingeri*, *A. gargola*, *A. verrucosus*, *A. valdiviensis* y *A. kaweshkari* (Barrasso et al., 2022). Este grupo será denominado como “*Alsodes* australes” para efectos de esta investigación.

Este grupo ha experimentado diversas modificaciones taxonómicas, lo que ha producido confusión en la delimitación de sus especies. Además, la riqueza específica de este género aumenta conforme nos desplazamos hacia el sur en la zona comprendida entre los 40°S y los 50°S. En contraste con otros géneros de anfibios (por ejemplo, *Batrachyla* y *Eupsophus*), los cuales presentan una sola especie que alcanza los 50°S o más al sur, los *Alsodes* australes exhiben la presencia de cuatro especies en el límite sur de esta zona, específicamente en la Isla Wellington (Figura 1). Algunos autores indican que esto “sugiere la

existencia de un centro de diferenciación específica en el límite distribucional austral del género” (Formas et al., 2008) para explicar este alto nivel de riqueza. Sin embargo, la evidencia que respalda la diversidad de los *Alsodes* australes en el extremo sur de su distribución no es concluyente según las evidencias que se exponen a continuación.

1.2. Evidencia morfológica

Analizando detalladamente la literatura, podemos observar que los principales caracteres por los que fueron diferenciadas estas especies son: tamaño corporal, morfología de la pata, coloración y fórmula cromosómica (Formas et al., 1998; Formas et al., 1997; Formas et al., 2002; Formas et al., 2008). No obstante, las diagnósticos de cada especie presentan características en común, como por ejemplo, la ausencia de coloración en los miembros posteriores (coloración en forma de barras), hocico truncado en vista lateral, mancha interocular, granulación dorsolateral y el mismo número de cromosomas (se diferencian en la fórmula cromosómica) (Formas et al., 2008).

El rango del tamaño corporal de *A. australis* (56 – 60 mm) se sobrepone con el de *A. kaweshkari* (56,5 – 62,2mm) y *A. valdiviensis* (39,5 – 63,4 mm). Sin embargo, los individuos de *A. coppingeri* recientemente encontrados en Lago del Desierto, Argentina, también presentan un tamaño corporal que se solapa con resto de este grupo (43,22 – 58,69 mm). Además, presentan características corporales utilizadas para la diagnóstico de *A. kaweshkari*: dedos bien rebordeados, membrana entre los dedos reducida, pero presente entre todos los dedos, superficies dorsolaterales granulares, piel alrededor de la cloaca y muslos posteriores granulares, coloración general gris y notable desarrollo de caracteres sexuales secundarios (Barrasso et al., 2022). Por último, los autores de ese estudio destacan que la plasticidad fenotípica encontrada en los pocos especímenes de *A. coppingeri* conocidos en Argentina se superpone con casi todos los caracteres que se utilizaron para distinguir a los *Alsodes* australes. Un

ejemplo que evidencia lo similares que son estas especies es el registro e identificación de *Alsodes verrucosus* en Río Correntoso, Futaleufú (Elgueta et al., 2006), el cual fue realizado utilizando el criterio morfológico (que es el utilizado siempre durante una campaña de terreno), pero según los análisis filogenéticos realizados en Correa et al. (2018), esta población correspondería a *A. gargola*.

1.3. Evidencia cromosómica

Si bien todos los *Alsodes* australes pertenecen al grupo de *Alsodes* que porta 26 cromosomas (Número Fundamental = 52), se pueden diferenciar en su fórmula cromosómica (número de cromosomas metacéntricos + submetacéntricos + subtelocéntricos) (Formas et al., 2008) (Tabla 1). No obstante, se pueden apreciar ciertas incongruencias al analizar la literatura. Por ejemplo, los resultados del primer estudio cromosómico en *A. verrucosus* realizado en 1983, no se corresponden con los obtenidos en 2003 para esta especie, en ambos casos utilizando ejemplares de la misma población (Cuevas & Formas, 2003; Formas & Vera, 1983). Sin embargo, los autores se refieren a estas diferencias como “Discrepancias menores en las proporciones centroméricas de algunos cromosomas”, que podrían deberse a “diferentes tratamientos con colchicina”. Otro ejemplo es el caso del estudio cromosómico realizado en la descripción de *A. australis* (donde no se menciona la población de la que provenían los ejemplares utilizados para el estudio cromosómico, podría ser Arroyo Zanjón Hondo (Argentina) o Puente Traihuanca (Chile)), en comparación con los resultados del estudio cromosómico realizado en la descripción de *A. valdiviensis*, no muestran ninguna diferencia entre ambas especies (Formas et al., 1997; Formas et al., 2002), lo cual no es mencionado por los autores del último estudio mencionado. Por lo tanto, se puede considerar que el criterio cromosómico no representa una buena herramienta para diferenciar y clasificar las especies de este grupo.

Tabla 1. Tabla de resumen de datos cromosómicos. 2N: número diploide; NF: número fundamental; M: cromosomas metacéntricos; SM: cromosomas submetacéntricos; ST: cromosomas subtelocéntricos; CS: cromosoma portador de la(s) constricción(es) secundaria(s). el símbolo * significa localidad tipo.

ESPECIE	LOCALIDAD	2N	NF	M	SM	ST	CS	FUENTE
<i>Alsodes australis</i>	Arroyo Zanjón Hondo (Argentina) o Puente Traihuanca* (Chile)	26	52	7	3	3	4	Formas et al. (1997)
<i>Alsodes coppingeri</i>	Puerto Río Frío*	26	52	8	2	3	4	Formas et al. (2008)
<i>Alsodes kaweshkari</i>	Puerto Edén*	26	52	6	6	1	3	Formas et al. (1998)
<i>Alsodes valdiviensis</i>	Cerro Mirador*	26	52	7	3	3	4	Formas et al. (2002)
<i>Alsodes verrucosus</i>	Puyehue	26	52	10	3	0	3	Formas & Vera (1983)
<i>Alsodes verrucosus</i>	Puyehue	26	52	6	4	3	4	Cuevas & Formas (2003)
<i>Alsodes gargola</i>	Laguna Schmoll, Ceno Catedral	26	52	4	8	4		Barrio & Rinaldi de Chieri (1971)



1.4. Evidencia filogenética

Es destacable la baja divergencia genética entre algunas especies de *Alsodes* australes, como es el caso de *A. coppingeri* con *A. australis* (Blotto et al., 2013). La excepción es *A. gargola*, que se diferencia filogenéticamente del resto de los *Alsodes* australes (Blotto et al., 2013). Esto se vio evidenciado en el estudio filogenético de la familia Alsodidae de Blotto et al. (2013), donde varias poblaciones de la zona austral que se asignaban a la especie *A. australis* fueron atribuidas a *A. coppingeri* y una población de Argentina, Zajón Hondo, la cual fue utilizada en la descripción de *A. australis*, se atribuyó a la especie *A. gargola*. Por otro lado, la única secuencia depositada en GenBank de *A. kaweshkari* proveniente del holotipo de esta especie; al ser incluida en los análisis filogenéticos, no presenta ninguna diferencia con la población de *A. gargola* de Futaleufú, Región de Los Lagos (Blotto et al. 2013; Barrasso et al., 2022), al igual que la población de *A. verrucosus* de Río Correntoso, Futaleufú, que como se mencionó en párrafos anteriores, también pertenece a *A. gargola* (Correa et al., 2018). Además, cuatro de las seis especies de los *Alsodes* australes (*A. australis*, *A. coppingeri*, *A. verrucosus* y *A. valdiviensis*) conforman un clado que se ha recuperado consistentemente en todos los estudios filogenéticos donde se han incluido a estas especies (Blotto et al., 2013; Charrier et al., 2015; Mella-Romero et al., 2022; Rabanal et al., 2022a). A continuación, se entrega un resumen de las distribuciones geográficas de todas las especies de *Alsodes* australes e hitos de la literatura que revelan más problemáticas de este grupo.

1.5. Distribución de los *Alsodes* australes

Los rangos de distribución y límites geográficos de los *Alsodes* australes son poco conocidos. De acuerdo con la literatura (ver más adelante) existe un solapamiento entre las distribuciones geográficas de cuatro especies de este grupo (*A. australis*, *A. coppingeri*, *A. verrucosus*, *A. kaweshkari*) (Figura 1), que termina en una concentración de registros de las cuatro especies en el límite sur

de sus distribuciones, lo que fue atribuido a la existencia de un centro de diferenciación específica del género *Alsodes* (Formas et al. 2008). Por otro lado, *A. valdiviensis* se distribuye en latitudes similares a *A. verrucosus*, pero a lo largo de la cordillera de la costa, incluyendo la Isla de Chiloé (Rabanal et al., 2022). A continuación, se entrega un resumen de las distribuciones geográficas de todas las especies de *Alsodes* australes e hitos de la literatura que revelan la problemática de este grupo (Figura 1).

1.6. Resumen de las distribuciones de los *Alsodes* australes

1.6.1. *Alsodes australis* Formas, Úbeda, Cuevas & Nuñez, 1997. Su localidad tipo, Puente Traihuanca, es la única localidad que puede atribuirse con seguridad a *A. australis* en Chile (Correa, 2022). Aun así, hay menciones de la presencia de esta especie en Hornopirén, Región de los Lagos (Celis-Diez et al., 2011) y en Puerto Edén, Isla Wellington en la Región de Magallanes (Asencio et al., 2009). Sin embargo, esos registros requieren confirmación (IUCN, 2022). Además, hay menciones de su presencia en Cerro Righi, Argentina (Formas et al., 1997) y Lago Vintter, Argentina (Úbeda, 2000), registros que siguen siendo válidos para la especie en ese país (Correa, 2022). Por lo mencionado anteriormente, su rango de distribución es entre los 41°S y 49°S.

1.6.2. *Alsodes coppingeri* (Günther, 1881) Su localidad tipo es Puerto Río Frío, Isla Wellington, y como se mencionó anteriormente, varias poblaciones de zonas cercanas a la isla Wellington que se reconocían como *A. australis* terminaron siendo atribuidas a *A. coppingeri* (Blotto et al. 2013). También existen otros registros para esta especie que no han sido mencionados en la literatura hace más de 60 años: Puyuhuapi, Región de Aysén (Codoceo, 1957), Casa Pangué y Peulla, provincia de Llanquihue, Región de Los Lagos (Grandison, 1961). Sin embargo, la identidad taxonómica de estas poblaciones requiere revisión. Además, esta especie fue recientemente

encontrada en Lago del Desierto, Provincia de Santa Cruz, Argentina, siendo la especie con la distribución más austral de ese país (Barrasso et al., 2022). Su rango de distribución se encuentra entre 47°S y 49°S.

1.6.3. *Alsodes verrucosus* (Philippi, 1902). Su localidad tipo fue vagamente definida como Andes de la Provincia de Cautín, Región de La Araucanía. En Díaz & Núñez (1988) se reportó su presencia en Bahía White, Isla Wellington, Región de Magallanes (50°S), y también se menciona la latitud de la localidad tipo de esta especie, pero esta mención no es fundamentada ni discutida posteriormente (Díaz & Núñez, 1988). Además, hay otras poblaciones reconocidas de *A. verrucosus*, las cuales son Parque Nacional Puyehue, Región de los Lagos (Formas & Vera, 1983) y Cayutué, Región de los Lagos (Mella-Romero & Lamilla-Maulén, 2019). Por lo mencionado anteriormente, el rango la distribución de esta especie es tentativamente entre 38° - 50°S.

1.6.4. *Alsodes valdiviensis* Formas, Cuevas & Brieva, 2002. Su localidad tipo es Cerro Mirador, Provincia de Valdivia, Región de los Ríos. Además, se distribuye desde Llancahue, Provincia de Valdivia, que es el registro más al norte de su distribución (Núñez et al., 2019), hasta Llicaldad, Provincia de Chiloé, Región de los Lagos (Rabanal et al., 2022). El rango de distribución de esta especie está entre 40°S - 42°S.

1.6.5. *Alsodes gargola* (Gallardo, 1970). Su localidad tipo es Lago Tonchek, Cerro Catedral, Provincia de Río Negro, Argentina. Se distribuye en Argentina desde Río San Isidro, Provincia de Neuquén (Úbeda, 1998), que es la localidad más al norte de su distribución, hasta La Hoya, Cordón de Esquel, Provincia de Chubut, la que corresponde a la localidad más al sur de su distribución (Ubeda, 2000). En Chile se distribuye desde Futaleufú, Región de los Lagos (Blotto et al. 2013), hasta Paso las Golondrinas, Región de Aysén, que sería la localidad más austral de la especie (Mella-Romero

et al., 2022). El rango de distribución geográfica para esta especie se encuentra entre los 40°S y 44°S.

1.6.6. *Alsodes kaweshkari* Formas, Cuevas & Nuñez, 1998. Esta especie es conocida sólo en dos localidades: Puerto Edén (49°8'S, 74°25'O), Isla Wellington, y Seno Huemules (48°43'S, 74°25'O), Provincia de Última Esperanza, Región de Magallanes, Chile (Formas et al., 1998). No existen registros fotográficos de esta especie, solo la descripción morfológica del holotipo y un dibujo realizado por el autor que describió la especie.



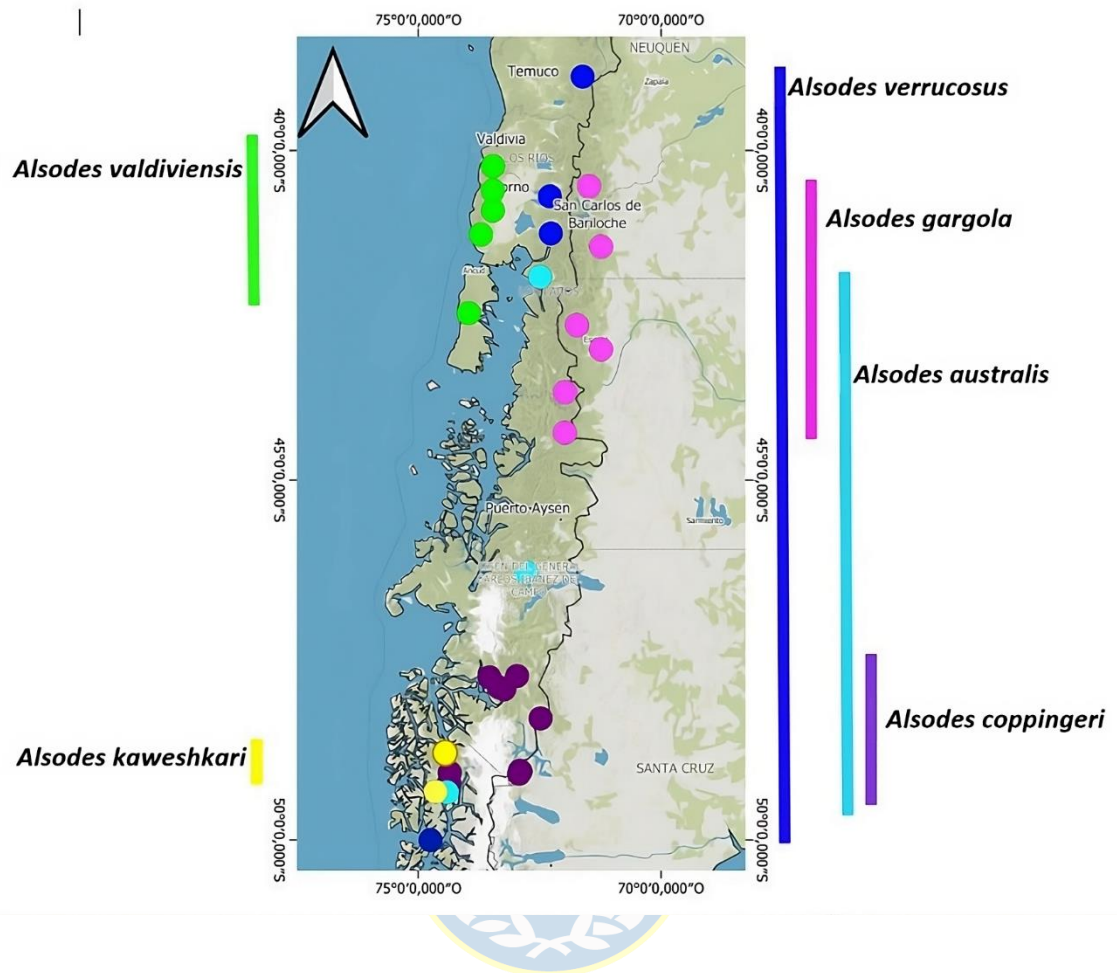


Figura 1. Mapa de distribución de *Alsodes* australes.

Mapa de distribución geográfica de *Alsodes australis* (celeste), *Alsodes coppingeri* (morado), *Alsodes valdiviensis* (verde), *Alsodes verrucosus* (azul), *Alsodes gargola* (rosado), *Alsodes kaweshkari* (amarillo).

2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

Dada la superposición de las distribuciones geográficas de los *Alsodes* australes, la limitada comprensión de los límites de cada especie, la ausencia de rasgos morfológicos distintivos, las inconsistencias en los datos cromosómicos y las estrechas relaciones filogenéticas entre ellas, la identificación de especímenes en poblaciones intermedias dentro de las áreas de superposición geográfica se convierte en un desafío. Por lo expuesto, el objetivo principal de esta investigación radica en determinar la diversidad de los *Alsodes* australes en la región comprendida entre los 40° y 50°, con especial énfasis en comprobar la existencia del centro de diferenciación específica en el límite distribucional austral del género *Alsodes* (Formas et al., 2008) mencionado anteriormente, mediante enfoques filogenéticos. Para ello se incluyeron poblaciones del género *Alsodes* que se distribuyen tanto a lo largo de la cordillera de la costa como en las zonas precordilleranas andinas. Asimismo, se incorporaron poblaciones de registros históricos, como Puyuhuapi, junto con nuevos hallazgos. Este estudio busca contribuir al entendimiento de la riqueza de especies del género *Alsodes* en la zona austral de su distribución y definir con mayor precisión sus límites geográficos.

3. HIPÓTESIS

En el extremo austral de la distribución del género *Alsodes* en Chile (49-50°S) hay cuatro especies de *Alsodes* australes codistribuidas.



4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad de los *Alsodes* australes en la zona comprendida desde los 40° hasta los 50° por medio de aproximaciones filogenéticas.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 5.1.** Obtener secuencias de los genes mitocondriales de poblaciones representativas, históricas y nuevas de los *Alsodes* australes.
- 5.2.** Determinar patrones de variación genética intra e interpoblacional de las poblaciones de los *Alsodes* australes.
- 5.3.** Redefinir los límites geográficos de las distribuciones de los *Alsodes* australes.
- 5.4.** Determinar la diversidad específica de los *Alsodes* australes por medio de análisis genéticos.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Localidades de muestreo y muestras incluidas

El área de estudio abarcó toda la distribución conocida de los *Alsodes* australes, desde la Cordillera Pelada hasta Puerto Río Frío. Se incluyeron nuevas secuencias de ADN para el grupo, obtenidas tanto de sus localidades tipo como de nuevas localidades (ver Tabla 2 y Figura 2). El resto de las muestras se obtuvieron de GenBank, lo que permitió incluir un total de 16 especies reconocidas del género *Alsodes*. La mayoría de las nuevas localidades cubren lagunas de distribución entre los registros históricos y todas se encuentran dentro del área de distribución de los *Alsodes* australes. Para la obtención de muestras de mucosa bucal de los individuos representantes de cada población, se emplearon torulas Copan 516CS01. Posterior a la toma de muestra, los individuos fueron liberados en el mismo sitio de captura (Correa et al., 2018)

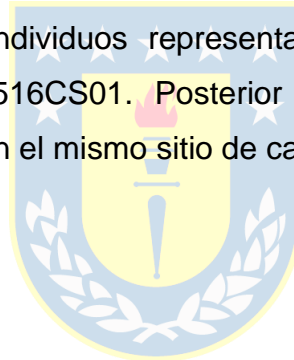


Tabla 2. Nuevas poblaciones incluidas en el análisis filogenético, ordenadas de norte a sur. N: número de muestras

Numero	Sitio de muestreo	N	Latitud(S)	Longitud(W)	Referencia
1	Riñihue	4	39°48'45"	72°26'08"	Este estudio
2	Lago Constanca	2	40°38'59"	71°52'11"	Este estudio
3	Cochamó	1	41°30'07"	72°16'25"	Este estudio
4	Fiordo Quintupeu	1	42°09'44"	72°24'56"	Este estudio
5	Puyuhuapi	2	44°19'17"	72°34'16"	Codoceo (1957)
6	Puerto Cisnes	1	44°43'20"	72°40'37"	Este estudio
7	Puente Traihuanca	2	46°19'57"	72°46'09"	Formas et al. (1997)

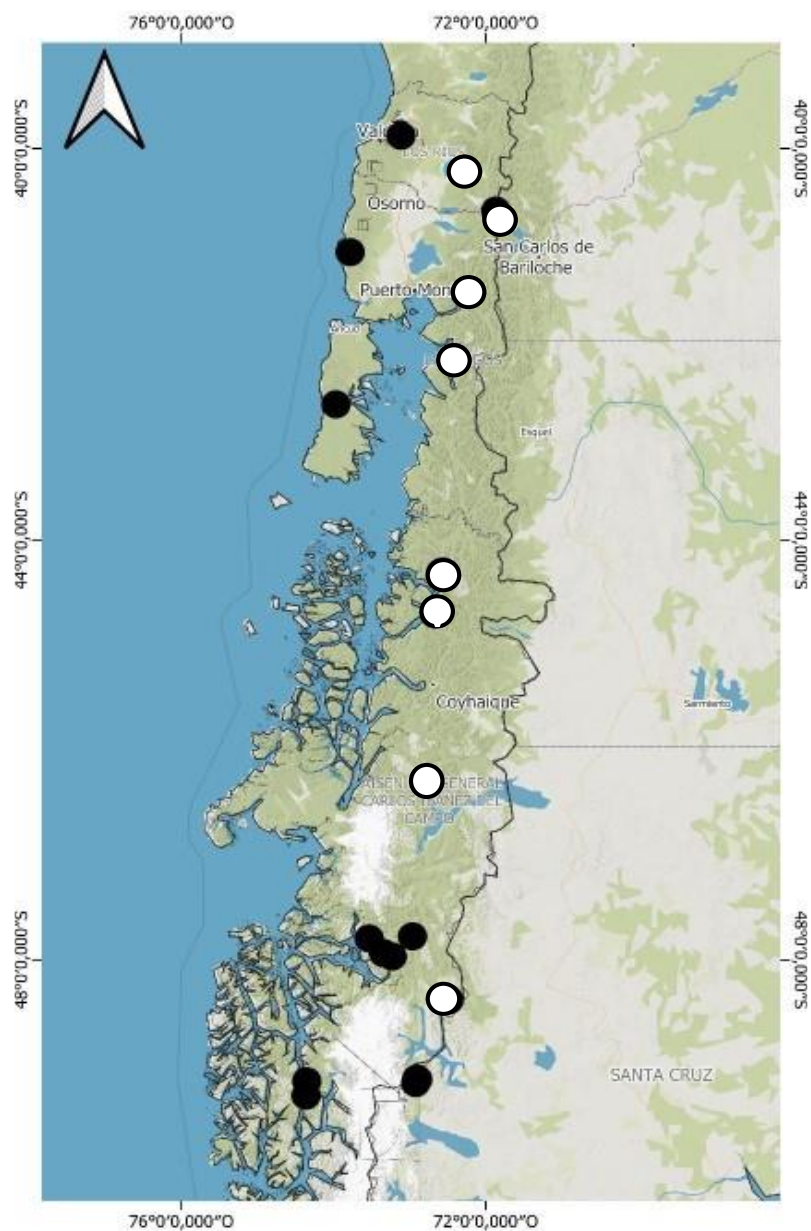


Figura 2. Nuevo mapa de distribución de *Alzodes* australes

Mapa de la distribución geográfica de todas las poblaciones de los *Alzodes* australes (Círculos negros) incluidas en el análisis filogenético; los círculos de color blanco representan localidades nuevas.

6.2. Marcadores moleculares y extracción de ADN

Para reconstruir la historia filogenética de este grupo, se utilizaron fragmentos de tres genes mitocondriales con diferentes grados de variación, el gen citocromo b (Cytb) y un fragmento que abarca entre los genes 12S y 16S y que incluye el gen tRNAVal.

El ADN de mucosa bucal fue extraído con el kit Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System. Los tres genes mitocondriales se amplificaron vía PCR bajo el siguiente perfil térmico: un paso inicial de 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. Los fragmentos fueron secuenciados en ambas direcciones en un secuenciador automático ABI3730XVL.

6.3. Análisis molecular

Las secuencias se editaron utilizando el programa BioEdit v7.2 (Hall, 1999). Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias con el programa MUSCLE (Robert, 2004). El grado de saturación de las secuencias fue evaluado con el test de Xia, utilizando el programa DAMBE v7.3.32 (Xia & Xie, 2001)

Con el fin de evaluar las afinidades filogenéticas y la posible identidad taxonómica de los especímenes de las nuevas poblaciones de *Alsodes*, se realizó un análisis filogenético de inferencia bayesiana con el programa MrBayes v3.2.1 (Ronquist et al., 2012). Para ello, como se mencionó anteriormente, se incluyeron secuencias de 16 de las 19 especies descritas dentro del género *Alsodes* (Blotto et al., 2013; Charrier et al., 2015; Correa et al., 2020; Barrasso et al., 2022; Rabanal et al., 2022). El árbol fue enraizado con un representante del género hermano de *Alsodes*, *Eupsophus calcaratus* (Blotto et al., 2013). Para este análisis se utilizaron cuatro particiones, tres de ellas aplicadas al gen citocromo b (cada posición de los codones se trató como una partición diferente). Para cada

partición se utilizó el modelo “General Time-Reversible”, más parámetro gamma y proporción de sitios invariables (GTR+G+I). Además, se aplicó el método reversible-jump Markov Chain Monte Carlo (MCMC) con el fin de explorar el espacio de los submodelos del modelo GTR+G+I.

El análisis consistió en cuatro cadenas independientes ejecutadas durante 15 millones de iteraciones, muestreadas cada 1000 generaciones. El primer 25% de los árboles se descartó como burn-in y posteriormente se utilizó el programa TRACER v1.7.2 (Rambaut et al., 2018), para evaluar la convergencia y la mezcla de cadenas, examinando el valor del tamaño efectivo de muestreo (ESS) de todos los parámetros. Finalmente, el árbol consenso fue visualizado en el programa FigTree v1.3.1.

6.4. Análisis de delimitación de especies

Se evaluó el estatus taxonómico de las poblaciones de los *Alsodes* australes incluidas en el análisis filogenético aplicando el método de delimitación de especies Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre et al., 2012). El ABGD divide estadísticamente las muestras en especies candidatas basándose en un “espacio” (el Barcode Gap) en la distribución de distancias genéticas entre pares, presumiblemente entre distancias intra e interespecíficas. Se ensayó un rango entre 0,001 y 0,25 de valores previos de divergencia intraespecífica (en diez pasos), aplicando un ancho de espacio relativo (X) de 1.5. Este análisis se realizó a través del servidor web de ABGD (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>).

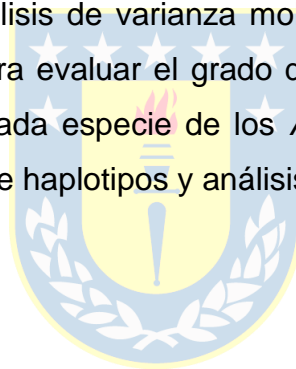
6.5. Estructura genética y análisis demográfico

Para realizar los siguientes análisis se utilizó el criterio de especie, con el fin de dar el ordenamiento y estructura de los grupos a analizar de las especies representantes de los *Alsodes* australes incluidas en el análisis a excepción de *A. gargola*.

La diversidad de haplotipos (H_d), el número de haplotipos (h), la diversidad de nucleótidos (π) y la media de diferencias entre nucleótidos (K) se calcularon con el programa DNASP 5.10 (Rozas et al., 2017).

Para estimar las relaciones genealógicas entre cada población se realizó un análisis de red de haplotipos mediante POPART v1.7 (Leigh & Bryant, 2015). Desde el alineamiento genético se extrajeron los haplotipos del gen mitocondrial Cytb de las especies representantes de los *Alsodes* australes, a excepción de la especie *A. gargola*, posterior a esto los datos se convirtieron en un nexfile utilizando el software DNASP, y se construyó la red de haplotipos con el método Median-Joining (MJ).

Finalmente se utilizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) a través del programa POPART v1.7, para evaluar el grado de varianza genética entre los grupos de poblaciones de cada especie de los *Alsodes* australes, que fueron definidos a través de la red de haplotipos y análisis filogenético.



7. RESULTADOS

7.1. Alineamiento de las secuencias

El alineamiento de los tres genes mitocondriales, que incluyó 60 individuos de *Alsodes*, fue de 3433 sitios nucleotídicos (incluyendo gaps). El número total de sitios variables (S) fue de 816. El resultado de la prueba de Xia realizado con DAMBE indicó ausencia de saturación en los tres genes.

7.2. Análisis filogenético

El análisis bayesiano es totalmente congruente con los resultados de otros análisis previos del género, realizados con solo el gen mitocondrial citocromo b o con los tres genes que se utilizaron en este estudio (Blotto et al., 2013; Charrier et al., 2015; Correa et al., 2018, 2020; Mella-Romero et al., 2022; Rabanal et al., 2022; Barrasso et al., 2022). Los mismos grupos de especies fueron recuperados con alto soporte de probabilidad, así como la mayoría de las especies reconocidas del género.

La topología del árbol consenso del análisis filogenético bayesiano muestra dos clados principales, uno compuesto por *A. vanzolinii* + *A. nodosus* + *A. cantillanensis*, y otro que incluye todas las demás especies del género. En este último clado existe un grupo compuesto por las especies nominales *A. coppingeri*, *A. australis*, *A. valdiviensis* y *A. verrucosus*. Entre estas especies, se destaca el grupo parafilético que forman los individuos incluidos de la especie *A. valdiviensis*, donde puede apreciarse que las poblaciones de Cordillera Pelada y Llicaldad están más emparentadas filogenéticamente con *A. verrucosus* y *A. coppingeri*, que con la población de Puente La Herradura, la cual se encuentra geográficamente entre Cordillera Pelada y Llicaldad (Figura 3).

Con respecto a las secuencias generadas en este estudio, todos los especímenes desde Cochamó hasta Puente Traihuanca forman un clado bien

soportado en conjunto con las muestras de referencia de *A. coppingeri* (Blotto et al., 2013). Además, se relacionan con una de las muestras provenientes de Riñihue, localidad que se encuentra mucho más al norte de Cochamó. Sin embargo, las demás muestras de la localidad de Riñihue mantienen una posición no resuelta en la filogenia (Figura 3). Por otro lado, se destaca que las muestras provenientes de la localidad tipo de *A. australis* (Puente Traihuanca), que era la única localidad atribuible a esta especie en Chile (Correa, 2022), también se agruparon junto a las muestras de referencia de *A. coppingeri* (Figura 3). Además, los ejemplares provenientes de Lago Constancia se agruparon con las muestras de referencia de *A. verrucosus*, por lo que esta localidad constituiría un registro nuevo para esta especie.



7.3. Red de haplotipos

La red de haplotipos ilustra las relaciones genealógicas de los 11 haplotipos (A-K) del gen citocromo b (Figura 4), encontrados en los 34 individuos de todas las especies del grupo focal de este estudio. Se aprecia un haplotipo más frecuente que representa a todas las poblaciones incluidas en el análisis que se encuentran al sur de Cochamó, a excepción de uno de los haplotipos proveniente de la localidad de Puyuhuapi (Figura 4). Además, se destaca la baja distancia genética que presenta el haplotipo proveniente de la localidad de Puyehue con respecto al haplotipo más frecuente mencionado anteriormente y los haplotipos de Riñihue. Por otro lado, más distante de los haplotipos mencionados, se encuentran los haplotipos provenientes de las localidades representativas de *A. valdiviensis*. Es destacable mencionar que algunos de estos haplotipos, como los B, G y H, provenientes de Cordillera Pelada y Llicaldad respectivamente, se encuentran más emparentados con el Haplotipo "I" proveniente de Riñihue que con los demás haplotipos provenientes de Puente la Herradura, localidad que compone parte de la distribución de esta especie (Figura 4).

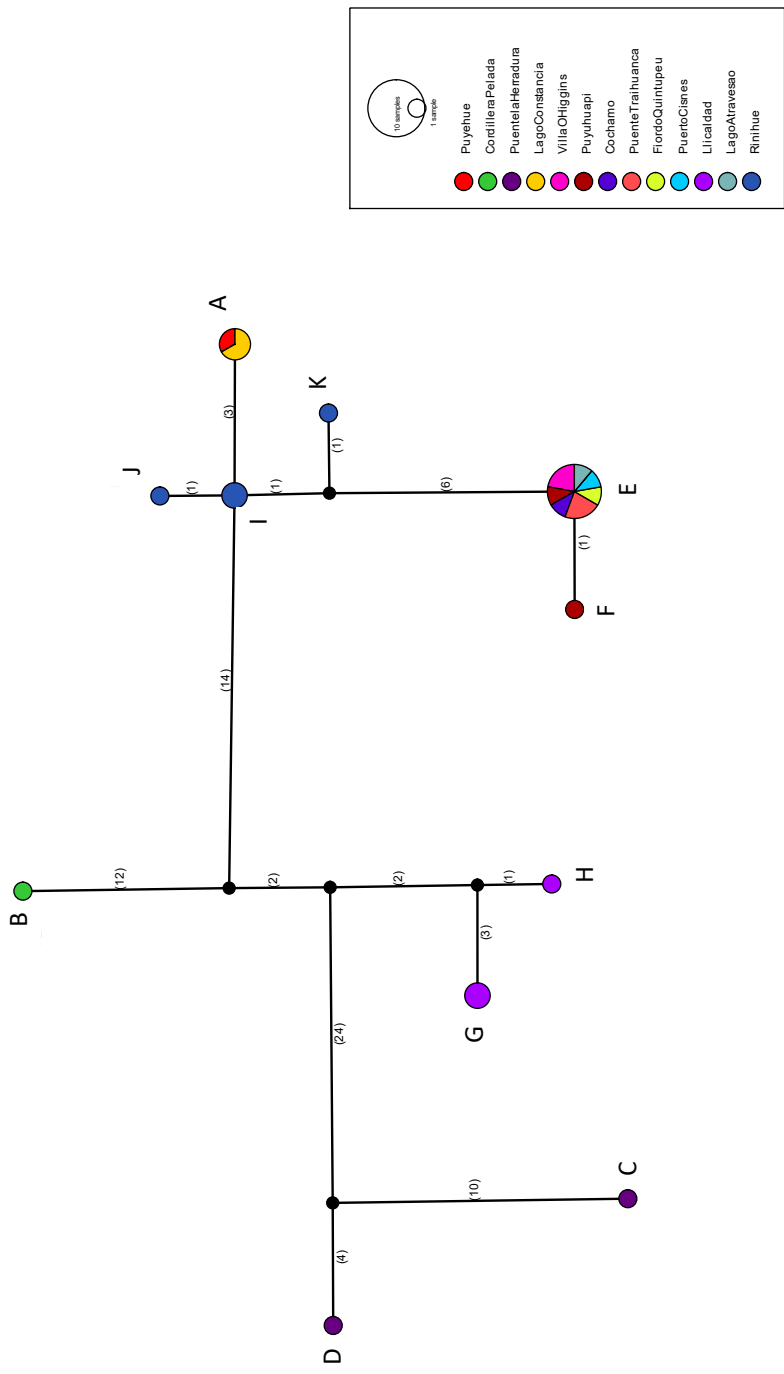


Figura 4. Red de haplotipos del gen citocromo b

Red de haplotipos del gen citocromo b obtenida para las poblaciones representativas (esquina inferior derecha) de los A/sodes australes. Cada color representa la localidad correspondiente; los números representan pasos mutacionales y las letras de la A hasta la K representan cada uno de los 11 haplotipos observados.

7.4. Diversidad genética

Las muestras fueron agrupadas por criterio de especie: *A. verrucosus*, *A. coppingeri* y *A. valdiviensis*. Para *A. verrucosus*, se analizaron un total de siete individuos, incluyendo las muestras de Riñihue. Se identificaron cuatro haplotipos diferentes de los siete individuos, con una diversidad haplotípica de 0,81 y 6 sitios polimórficos, lo que sugiere una moderada variabilidad genética.

Para *A. coppingeri*, se analizaron diez individuos en total. Se encontraron dos haplotipos diferentes en la población. La diversidad haplotípica promedio fue de 0,2 y solo se encontró un sitio polimórfico para esta agrupación indicando una baja variabilidad genética.

En el caso de *A. valdiviensis*, se utilizaron muestras de los seis individuos incluidos en los análisis. Se identificaron cinco haplotipos diferentes, la diversidad haplotípica promedio fue de 0,93 y se encontraron 54 sitios polimórficos, sugiriendo una diversidad genética muy alta en comparación con las otras especies.

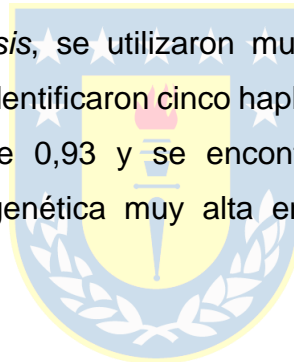


Tabla 3. Diversidad genética. Especie: Nombre de la especie analizada; N: Tamaño de la muestra; K: Número de haplotipos; H: diversidad haplotípica; S: Número de sitios polimórficos; π : Diversidad nucleotídica promedio.

Especie	N	K	H	S	π
<i>A. verrucosus</i>	7	4	0.81	6	0.00276
<i>A. coppingeri</i>	10	2	0.2	1	0.00021
<i>A. valdiviensis</i>	6	5	0.93	54	0.02601
total	23	11	0.838	70	0.01706



7.5. Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Los resultados de la tabla AMOVA revelan patrones significativos de estructura genética en las poblaciones estudiadas. El porcentaje de varianza entre los grupos definidos representó el 26,17% de la variación genética total que concuerda con el valor entregado por el coeficiente Φ_{CT} ; si bien no es significativo, representa una baja diferenciación genética entre los grupos definidos para este análisis (Tabla 4). Por otro lado, se observó un aporte en la varianza genética mucho más alta entre las poblaciones individuales que componen los grupos, con un 67,03% y un Φ_{SC} significativo de 0,90792.

La varianza genética dentro de las poblaciones de los grupos fue relativamente baja, contribuyendo solo con el 6,8%. Por último, el coeficiente Φ_{ST} de 0,93 nos indica una diferencia significativa entre todas las poblaciones.

En resumen, estos resultados indican una estructura genética significativa en las poblaciones estudiadas, con mucha más varianza dentro de los grupos y entre todas las poblaciones.

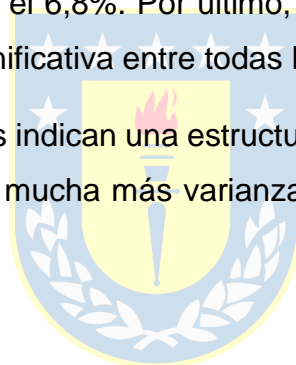


Tabla 4. Resultados tabla AMOVA, * indica un valor significativo ($P < 0,005$)

Fuente de variación	g. de l	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	1716.336	106.520	26.17284
Entre poblaciones dentro de los grupos	4	1665.633	272.801	67.02925
Dentro de las poblaciones de los grupos	4	110.667	27.667	6.79790
Total	10	3492.636	406.988	
Phi_ST	0.93202*			
Phi_SC	0.90792*			
Phi_CT	0.26173			



7.6. Análisis de delimitación de especies

El análisis de delimitación de especies utilizando el método ABGD reveló la presencia de dos grupos genéticamente distintos, enfocándonos solo en el grupo focal. El primer grupo, congruentemente con los demás análisis, reúne todas las muestras de *A. coppingeri* junto a *A. australis*, pero además agrupa las secuencias de los individuos representantes de *A. verrucosus* y dos poblaciones de la distribución de *A. valdiviensis* (Llicaldad y Cordillera Pelada). Por otro lado, el segundo grupo contiene exclusivamente dos secuencias identificadas como *Alsodes valdiviensis* de Puente la Herradura. El resto de las especies del género *Alsodes* incluidas en el análisis fueron recuperadas como especies distintas (Figura 5).





Figura 5. Análisis de delimitación de especies

Análisis de delimitación de especies ABGD; la barra marrón representa los grupos obtenidos.

8. DISCUSIÓN

En este estudio, se realizó el análisis genético y filogenético del género *Alsodes* más actualizado hasta la fecha, en el cual se incluyeron especímenes de nuevas poblaciones de la zona sur y austral de Chile que nunca habían sido estudiadas, lo que permitió redefinir los límites geográficos de los *Alsodes* australes y ahondar en su estructura genética. Además, se reportan nuevas localidades de dos especies representantes de este grupo. Estos hallazgos se suman a una serie de estudios filogenéticos y reportes de nuevas localidades de este grupo de *Alsodes* (Blotto et al., 2013; Alveal et al., 2015; Correa et al., 2018; Mella-Romero & Lamilla-Maulén, 2019; Barrasso et al., 2022; Rabanal et al., 2022). A continuación, se discuten las implicancias de estos hallazgos a nivel biogeográfico y taxonómico.

Las secuencias de ADN utilizadas en este estudio confirmaron la presencia de *A. coppingeri* en la localidad de Cochamó, además de localidades intermedias entre este nuevo registro y Caleta Tortel, lo cual aumentó su rango de distribución geográfica alrededor de 700 km hacia el norte de Caleta Tortel, que era la población más septentrional de *A. coppingeri* conocida previamente (Blotto et al., 2013). Una de las localidades intermedias entre Cochamó y Caleta Tortel es Puyuhuapi, la cual corresponde a uno de los registros históricos más antiguos de *A. coppingeri*, que en ese entonces correspondía a la especie *Eupsophus coppingeri* (Codoceo, 1957). Sin embargo, este registro no había sido mencionado en la literatura por más de 60 años y su identidad taxonómica requería confirmación (Barrasso et al., 2022). Con los resultados obtenidos se corroboró la presencia de *A. coppingeri* en la localidad de Puyuhuapi.

La localidad de Puente Traihuanca corresponde a la localidad tipo de *A. australis*, especie descrita por Formas et al. (1997). Como se mencionó anteriormente, Puente Traihuanca es la única localidad que se atribuye con seguridad a *A. australis* en Chile (Correa, 2022). Los resultados muestran que el ejemplar de *A.*

australis proveniente de esta localidad no se diferencia filogenéticamente de las muestras de referencia de *A. coppingeri*, lo cual es congruente con los resultados de la red de haplotipos, donde se observa que no existe diferencia genética entre las poblaciones de *A. coppingeri* reportadas en literatura (Blotto et al., 2013) y la localidad tipo de *A. australis*, Puente Traihuanca. Todas estas poblaciones comparten un haplotipo, que es el más representado en todas las poblaciones al sur de Cochamó incluidas en este estudio, a excepción de uno de los individuos de Puyuhuapi que se diferenció haplotípicamente por un paso mutacional. Además, el análisis de delimitación de especies ABGD también agrupó a estas dos especies en el mismo grupo genético, respaldando los resultados de los otros análisis.

Con respecto a lo reportado en literatura, los únicos criterios fenotípicos utilizados para diferenciar a estas dos especies son: tamaño corporal y fórmula cromosómica. El tamaño corporal perdió relevancia como carácter diagnóstico en estas especies en el año 2022 debido a que la población de *A. coppingeri* encontrada en Argentina presenta un tamaño corporal similar al holotipo de *A. australis* (Barrasso et al., 2022, Formas et al. 1997). Por otro lado, ambas especies comparten el mismo número de cromosomas ($2n = 26$) y Número Fundamental (NF 52), por lo que estas solo se diferencian en la fórmula cromosómica, donde *A. coppingeri* tiene ocho pares metacéntricos + dos submetacéntricos + tres subtlocéntricos y *A. australis* posee en su cariotipo siete pares metacéntricos + tres submetacéntricos + tres subtlocéntricos (Formas et al., 1997). Sin embargo, la diferenciación por cariotipo no es fiable, ya que el método utilizado para obtener los cromosomas y su fórmula cromosómica es sensible a la concentración de colchicina que se utiliza en la técnica, a tal nivel que los cromosomas de una misma especie pueden presentar distinta fórmula cromosómica (Formas & Vera, 1983; Formas et al., 2003). Por todo lo descrito anteriormente, aparentemente *A. coppingeri* y *A. australis* son conoespecíficas.

Hasta ahora, la presencia de *A. verrucosus* en Chile se reconoce en tres localidades: la localidad tipo, en los Andes de la Provincia de Cautín, actual Región de La Araucanía, la cual no tiene una ubicación geográfica exacta (38°50'S según Díaz & Núñez 1988); el Parque Nacional Puyehue (Formas & Brieva, 2004); y finalmente, Cayutué, Provincia de Llanquihue (Mella-Romero & Lamilla-Maulén, 2019). Existe un reporte en la literatura sobre la presencia en la Reserva Nacional Futaleufú (Elgueta et al., 2006), pero este perdió validez debido al análisis filogenético realizado por Blotto et al. (2013), quienes asignaron esa población a otra especie llamada *Alsodes gargola* (Blotto et al., 2013).

En este estudio, se añadieron más poblaciones a la distribución de *A. verrucosus*: Lago Constanza, ubicada al noreste del Parque Nacional Puyehue, muy cerca de la frontera con Argentina, y Riñihue. Estos registros se analizaron junto a la población de Puyehue, ya que es la única con evidencia filogenética molecular en la literatura, mostrando una estrecha afinidad filogenética con ambas poblaciones. Si bien una de las poblaciones de Riñihue mantiene una posición poco resuelta en la filogenia, la red de haplotipos aclara la afinidad con la población de Puyehue. Por otro lado, en la red de haplotipos se puede apreciar la corta distancia genética que tiene esta agrupación de poblaciones con los haplotipos de *A. coppingeri* (de 6 a 10 pasos mutacionales, dependiendo de la población). Sin embargo, estas diferencias no influyen en los resultados del análisis de delimitación de especies ABGD, que agrupa a *A. coppingeri*, *A. australis* y las poblaciones correspondientes a *A. verrucosus* como una sola unidad.

La población de *A. verrucosus* proveniente de Puyehue (Formas & Vera, 1983) fue el segundo registro posterior a su descripción como especie y se reconoce como parte de su distribución. Esta población se encuentra aproximadamente a 132 km al sur de su localidad tipo, los Andes de la provincia de Cautín (actual Región de la Araucanía) (Philippi, 1902). Además de estar reportada mucho más al sur, en esa publicación no se fundamenta ni se discute cómo se reconoció a

los individuos analizados en la investigación, la cual corresponde a la primera descripción de sus cromosomas. Por lo tanto, la información publicada no es suficiente para afirmar realmente que la población de Puyehue corresponde al *Borborocoetes verrucosus* (actualmente *A. verrucosus*). La literatura ambigua sobre las localidades históricas de *A. verrucosus*, sumado a la baja divergencia genética obtenida entre las poblaciones estudiadas y *A. coppingeri*, pone en duda la identidad taxonómica de la población de Puyehue. Nuestros análisis, como mencionamos anteriormente, sugieren que podría corresponder a *A. coppingeri*. Respecto a las relaciones filogenéticas de las poblaciones asignadas a *A. valdiviensis*, los resultados son congruentes con el último estudio que analizó estas poblaciones (Rabanal et al., 2022). Sin embargo, en dicho estudio se hace hincapié en las complejas relaciones filogenéticas que presentan las poblaciones representantes de la distribución de *A. valdiviensis*. En aquel estudio, las poblaciones de Chiloé y Cordillera Pelada (la localidad tipo de *A. valdiviensis*), están más emparentadas con una especie andina (*A. verrucosus*) y otra austral (*A. coppingeri*) que con la población de *A. valdiviensis* de la Cordillera de la Costa (Puente La Herradura), la cual está ubicada geográficamente entre Chiloé y Cordillera Pelada. Sin embargo, según los resultados obtenidos en este estudio, la distribución de *A. coppingeri* no está restringida exclusivamente a la zona austral de Chile, sino que se distribuye hasta Cochamó, en la zona sur de Chile, que se encuentra en latitudes similares a Chiloé y alrededor de 21 km al sur de Cayutué (el límite sur de la especie *A. verrucosus*). Esta cercanía geográfica disipa las dudas sobre la relación filogenética de estas especies. Además, el análisis de la red de haplotipos converge con el análisis filogenético y muestra lo distantes que son los haplotipos de la población de Puente La Herradura con respecto a los haplotipos de Chiloé y Cordillera Pelada (mínimo 24 pasos mutacionales) y que estas dos poblaciones son más cercanas a los haplotipos de Riñihue, que aquí se atribuyen a *A. verrucosus*.

El análisis ABGD agrupó a las poblaciones de *A. coppingeri*, *A. verrucosus* y *A. valdiviensis*, excepto a la localidad de Puente La Herradura, presumiblemente por la alta distancia genética que esta presenta con respecto a las otras poblaciones que representan la distribución total de *A. valdiviensis*, como se mencionó anteriormente. Otro aspecto que conviene aclarar en futuras investigaciones es la relación de las poblaciones de Chiloé y Cordillera Pelada con respecto a la población de Reumén, que se encuentra cerca del extremo norte de la distribución de *A. valdiviensis* (Olivares et al., 2014). Estos autores utilizaron secuencias del gen citocromo b para mostrar que esta población pertenece a *A. valdiviensis*, pero lamentablemente estas secuencias no están disponibles en GenBank.

Con respecto al resultado entregado por el análisis ABGD, que considera a *A. coppingeri*, *A. verrucosus* y poblaciones de *A. valdiviensis* parte del mismo grupo específico, el patrón de diversidad genética que esta agrupación presenta es similar a los resultados del estudio filogeográfico de una especie del género hermano de *Alsodes*, *Eupsophus*. El estudio de la especie *Eupsophus calcaratus* abarcó una zona de muestreo amplia entre los 39°S y 48°S (un rango geográfico cercano al abarcado en este estudio), en donde se observaron seis linajes fuertemente sustentados y un patrón general de mayor diversidad genética a lo largo de las regiones costeras de Chile, junto con linajes poblacionales distribuidos ampliamente y más homogéneos genéticamente a medida que se acercaban a latitudes más australes (Nuñez et al., 2011). Este patrón también se refleja en los resultados del presente estudio si consideramos al grupo entregado por el análisis ABGD como una sola unidad.

Los resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) proporcionan información valiosa y complementaria a lo discutido sobre los resultados anteriores, sobre la estructura genética y la diferenciación poblacional dentro de las especies estudiadas. La tabla AMOVA revela patrones significativos de variación genética dentro de los grupos de poblaciones. El coeficiente Φ_{ST}

indica una marcada diferenciación genética entre el total de poblaciones utilizadas en el análisis, lo que podría atribuirse en mayor parte a la variación genética que aportan las poblaciones de la especie *A. valdiviensis*. Por otro lado, si bien existen diferencias entre los grupos determinados para el análisis, estas no serían significativas de acuerdo con el valor de Phi_CT; lo que más aporta variación a todo el conjunto de grupos, es la varianza entre poblaciones que componen los grupos (67% aproximadamente), complementada por la significancia del índice Phi_SC.

Los resultados de diversidad genética muestran una marcada diferencia entre la alta diversidad interpoblacional dentro de *A. valdiviensis* con respecto a los otros dos grupos de especies. En seis individuos de esta especie se observaron cinco haplotipos muy divergentes, con un total de 54 sitios polimórficos (S), lo cual representa una diversidad genética muy alta entre las poblaciones de esta especie en comparación a los otros dos grupos. Para *A. verrucosus* se analizaron las siete muestras, incluyendo la población de Riñihue, pero se recuperaron cuatro haplotipos y un total de 6 sitios polimórficos. Por último, las diez muestras de *A. coppingeri* que fueron incorporadas a este análisis, representan el grupo con más individuos y el conjunto de muestras que abarca un mayor rango geográfico. Sin embargo, se obtuvieron dos haplotipos y solo un sitio polimórfico, como también se puede concluir de la red de haplotipos. Es destacable la baja divergencia genética que se puede encontrar entre las poblaciones de esta última especie en la zona sur y austral de Chile, así como la alta divergencia genética que muestra la especie *A. valdiviensis* entre sus poblaciones.

Finalmente, a pesar del extenso rango geográfico abarcado en la zona austral de Chile en este estudio, no se pudieron detectar poblaciones atribuibles a *A. kaweshkari*, que fue descrita en la localidad de Puerto Edén, Isla Wellington (Formas et al., 1998), la cual se encuentra alrededor de 7 km al norte de la localidad tipo de *A. coppingeri*. Cabe destacar que en la literatura no existe una comparación formal que permita distinguir entre estas dos especies (Formas et

al., 1998, Formas et al., 2008). Además, uno de los individuos de *Alsodes* provenientes de Lago del Desierto, Argentina, un macho adulto, presentaba características atribuibles a *A. kaweshkari*. A pesar de esto, los datos moleculares confirmaron que este último espécimen correspondía a *A. coppingeri* (Barraso et al., 2022).

Por otro lado, en GenBank solo hay una secuencia del gen mitocondrial citocromo b proveniente del holotipo de *A. kaweshkari*, pero al ser incluida en los análisis filogenéticos no presenta ninguna diferencia con la población de *A. gargola* de Futaleufú, Región de Los Lagos (Blotto et al., 2013, Barraso et al., 2022). Por todo lo mencionado anteriormente, es necesario realizar un muestreo más exhaustivo en la Isla Wellington que considere específicamente la localidad de Puerto Edén, localidad tipo de *A. kaweshkari*, y donde también está el registro de *A. australis* (Asencio et al., 2009). Sin embargo, nuestros resultados apuntan a la existencia de solo una especie de *Alsodes* en la Isla Wellington, *Alsodes coppingeri*.

Respecto a la coexistencia de *A. kaweshkari*, *A. verrucosus*, *A. australis* y *A. coppingeri* en la Isla Wellington expuesta por Formas et al. (2008), los autores atribuyeron la presencia de tres de estas especies (*A. australis*, *A. kaweshkari* y *A. verrucosus*) en áreas muy cercanas a la localidad típica de *Alsodes coppingeri* a la existencia de un centro de diferenciación específica en el límite distribucional austral del género. Por otro lado, Barraso et al. (2022) sugieren que tanto la presencia de *A. australis*, cuya localidad tipo, Puente Traihuanca, en la Región de Aysén, se encuentra a más de 300 km al norte, como la de *A. verrucosus* (cuya localidad tipo está aún más lejos), deben ser tomadas con cautela hasta obtener evidencia más sólida.

En resumen, los resultados de este estudio, donde se incluyeron individuos de la Isla Wellington y sus alrededores, además de otras poblaciones más al norte de la isla, sugieren que no existe una diferencia filogenética entre estas, lo cual pone

en duda la presencia de *A. australis* y *A. verrucosus* en la Isla Wellington y por ende, un centro de diferenciación específica de este género en la isla.



9. BIBLIOGRAFÍA

- Araya, S., & Riveros, E. (2008). Ampliación del rango de distribución geográfica de *Alsodes montanus* (Amphibia, Leptodactylidae) a la Región de O'Higgins. *Boletín Museo Nacional de Historia Natural*, 57(3), 117-123.
- Asencio, J., Kusch, A., Henríquez, J. M., & Cárcamo, J. (2009). Registros de anfibios en el bosque norpatagónico costero del Canal Messier, Chile. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 15(3), 42-55.
- Avise, J. C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 312(1154), 325-342.
- Barrasso, D. A., Úbeda, C. A., Cotichelli, L., & Basso, N. G. (2022). On the presence of *Alsodes coppingeri* (Anura, Alsodidae) in Argentina, with comments on other southern *Alsodes*. *Neotropical Biodiversity*, 8(1), 21-30.
- Beltrán-Torres, G., & Hernández-Fernández, J. (2018). Nuevos marcadores mitocondriales mejoran la filogenia de la tortuga carey *Eretmochelys imbricata* (Testudines: Cheloniidae). *BAG. Journal of Basic and applied Genetics*, 29(2), 21-31.
- Blotto, B. L., Nunez, J. J., Basso, N. G., Ubeda, C. A., Wheeler, W. C., & Faivovich, J. (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.

- Cardoso, Y. P. (2014). Filogenia molecular, biogeografía y procesos de diversificación de peces neotropicales, familia Loricariidae (Siluriformes), Universidad Nacional de La Plata, 34(6),114-121.
- Caterino, M. S., Cho, S., & Sperling, F. A. (2000). The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annual Review of Entomology, 45(1), 1-54.
- Cei, J. M. (1980). Amphibians of Argentina (Vol. 2). Università Degli studi di Firenze. 21(3): 209–272.
- Celis-Diez, J. L., Ippi, S., Charrier, A., & Garín, C. (2011). Fauna de los bosques templados de Chile. Guía de campo de los vertebrados terrestres. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile. 260 pp.
- Charrier, A., Correa, C., Castro, C., & Méndez, M. (2015). A new species of *Alsodes* (Anura: Alsodidae) from Altos de Cantillana, central Chile. Zootaxa 39(4): 540-550.
- Codoceo, M. (1957). Lista sistemática de batracios de Aysén y Magallanes. Noticiario Mensual del Museo Nacional de Historia Natural, 2(16), 3-4.
- Correa, C., Pastenes, L., Iturra, P., Calderón, P., Vásquez, D., Lam, N., Salinas, H., & Méndez, M. A. (2013). Confirmation of the presence of *Alsodes pehuenche* Cei, 1976 (Anura, Alsodidae) in Chile: morphological, chromosomal and molecular evidence. Gayana, 77(2), 125.

- Correa, C., Zepeda, P., Lagos, N., Salinas, H., Palma, R. E., & Vásquez, D. (2018). New populations of two threatened species of *Alsodes* (Anura, Alsodidae) reveal the scarce biogeographic knowledge of the genus in the Andes of central Chile. *Zoosystematics and Evolution*, *94*(2), 349-358.
- Cuevas, C. C. (2008). A new species of the genus *Alsodes* (Anura: Neobatrachia) from the Nothofagus forest, Coastal Range, Southern Chile, identified by its karyotype. *Zootaxa*, *1771*, 43-53.
- Cuevas, C. C., & Formas, J. R. (2003). Cytogenetic analysis of four species of the genus *Alsodes* (Anura: Leptodactylidae) with comments about the karyological evolution of the genus. *Hereditas*, *138*(2), 138-147.
- Elgueta, E., Reid, S., Plischoff, P., Méndez, M. A., Núñez, J., & Smith-Ramírez, C. (2006). Catastro de vertebrados terrestres y análisis en seis hábitats presentes en la Reserva Nacional Futaleufú, Provincia de Palena, X Región, Chile. *Gayana (Concepción)*, *70*(2), 195-205.
- Ford, L. S., & Cannatella, D. C. (1993). The major clades of frogs. *Herpetological Monographs*, 94-117.
- Formas, J., Cuevas, C., & Núñez, J. (1998). A new species of *Alsodes* (amphibia: anura: leptodactylidae) from southernchile. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, *111*(3), 521-530.
- Formas, J., Úbeda, C., Cuevas, C., & Núñez, J. (1997). *Alsodes australis*, a new species of leptodactylid frog from the temperate Nothofagus forest of southern Chile and Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, *32*(4), 200-211.

- Formas, J., & Vera, M. I. (1983). Karyological relationships among frogs of the genus *Alsodes*, with description of the karyotypes of *A. vanzolinii* and *A. verrucosus*. *Copeia*, 1983(4), 1104-1107.
- Formas, J.R., C.C, Cuevas., L.M, Brieva. (2002). A new species of *Alsodes* (Anura: Leptodactylidae) from Cerro Mirador, Cordillera Pelada, southern Chile. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115(4): 708-719.
- Formas, J. R., Nuñez, J., & Cuevas, C. (2008). Identidad de la rana austral chilena *Eupsophus coppingeri* (Amphibia, Anura, Neobatrachia): evidencias morfológicas, cromosómicas y moleculares. *Revista Chilena de Historia Natural*, 81(1), 3-20.
- Gallardo, J. M. A. F. (1970). A propósito de los Telmatobiinae (Anura, Leptodactylidae) patagónicos. 16(50): 73-85.
- Günther, A. (1881). Reptiles and batrachians collected during the survey of HMS Alert on the coast of Patagonia. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 81: 18–22.
- 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.
- Harvey, P. H., & Pagel, M. D. (1991). The comparative method in evolutionary biology (Vol. 239). Oxford University Press Oxford. 10(2), 100-132.

- Hillis, D. M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual review of Ecology and Systematics*, 18(1), 23-42.
- J. Burns, K., J. Hackett, S., & K. Klein, N. (2003). Phylogenetic relationships of Neotropical honeycreepers and the evolution of feeding morphology. *Journal of Avian Biology*, 34(4), 360-370.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in ecology and evolution*, 6(9), 1110-1116.
- Lobos, G., Vidal, M., Correa, C., Labra, A., Díaz-Páez, H., Charrier, A., Rabanal, F., Díaz, S., & Tala, C. (2013). Anfibios de Chile, un desafío para la conservación. Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y Red Chilena de Herpetología. Santiago. 125-136 pp.
- Lynch, J. D. (1973). The transition from archaic to advanced frogs. *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems*, 133, 182.
- Mayr, E. (1968). *Especies animales y evolución*. Ediciones de la Universidad de Chile. 3(10), 16-19.
- Mella-Romero, J., Mella, J., Muñoz, C., & Correa, C. (2022). Extensión de distribución de la rana de pecho espinoso del Catedral, *Alsodes gargola* Gallardo, 1970: un registro en una ruta desconocida de la Patagonia Chilena. *Gayana (Concepción)*, 86(1), 22-29.

- Montero, R., & Autino, A. G. (2009). Sistemática y filogenia de los Vertebrados. Con énfasis en la fauna argentina. 3(16), 20-24.
- Morrone, J. J. (2006). Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. Annual Review Entomology., 51(3), 467-494.
- Philippi, R. (1902). Suplemento a los batrachios Chilenos. Santiago. 4(12), 12-15.
- Pough, F. H., Janis, C., & Heiser, J. (2013). Vertebrate Life. 5(7),11-16.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. Molecular Ecology, 21(8), 1864-1877.
- Pyron, R. A., & Wiens, J. J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. Molecular phylogenetics and Evolution, 61(2), 543-583.
- Rabanal, F., Correa, C., & Gargiulo, M. (2022). Fin a la incertidumbre. Extensión de distribución de *Alsodes valdiviensis* Formas, Cuevas & Brieva, 2002 (Anura: Alsodidae) hacia el sur de Chile confirma la presencia del género en la Isla Grande de Chiloé. Revista Latinoamericana de Herpetología, 5(2), 54-64.

- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, *67*(5), 901-904.
- Ramírez Álvarez, D. (2015). Nueva localidad para *Alsodes tumultuosus* Veloso, Iturra & Galleguillos, 1979 (Amphibia, Alsodidae) en la Cordillera de los Andes, Region de O'Higgins, Chile. *Biodiversity & Natural History*, *1*(1)12-16.
- Robert, C. E. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, *32*(5), 1792-1797.
- 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*(3), 539-542.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(12), 3299-3302.
- Thomson, R. C., Wang, I. J., & Johnson, J. R. (2010). Genome-enabled development of DNA markers for ecology, Evolution and Conservation. *Molecular Ecology*, *19*(11), 2184-2195.
- Ubeda, C. A. (2000). Geographic distribution: *Alsodes australis*. *Herpetological Review*, *31*(4), 249.

- Veloso, A., & Navarro, J. (1988). Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. *Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino* 6: 481-593.
- Vidal, M. A. M., & Labra, A. L. (2008). Herpetología de Chile. *Science Verlag*.1(1), 186-192.
- Von Tschirnhaus, J., & Correa, C. (2021). The definitive rediscovery of *Telmatobiushalli* (Anura, Telmatobiidae) at its historic type locality and its synonymy with *T. dankoi* and *T. vilamensis*. *ZooKeys*, 10(7), 1-5.
- Wiley, E. O., & Lieberman, B. S. (2011). *Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics*. John Wiley & Sons. 10(2), 16-23.
- Xia, X., & Xie, Z. (2001). DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92(4), 371-373.

