



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Departamento de Zoología



**RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *BATRACHYLA* (ANURA:
BATRACHYLIDAE) BASADAS EN EVIDENCIA MOLECULAR**

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Bióloga

Valeria Millaray Soto Bravo

Concepción, marzo de 2025



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.



Prof. Guía

Dr. Claudio Correa Quezada

Prof. Evaluadores

Dr. Juan Carlos Ortiz Zapata

Dra. Angie Díaz Lorca

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, marzo de 2025

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que formaron parte de este largo proceso y me apoyaron de una u otra manera.

En primer lugar, agradezco a mi profesor guía, el Dr. Claudio Correa, por su buena onda y disposición, así como por acogerme durante estos dos últimos años de carrera y hacer que este proceso fuera más ameno, incluso cuando tuve que asumir nuevos desafíos y aprendizajes.

También quiero agradecer a mis compañeros y amigos, quienes hicieron que esta etapa fuera más llevadera. A mis amigas Leo, Javi y Coni, por su apoyo, motivación y por compartir conmigo risas y buenos momentos a lo largo de estos años. De igual manera, a mi amigo Javier, quien me acompañó en gran parte del proceso y quien estuvo presente especialmente en los momentos más difíciles, cuando todo costaba un poco más. Gracias por darme ánimo, ser un apoyo constante y motivarme siempre para continuar.

Extiendo el agradecimiento a mi familia, que, de una u otra forma, me brindó su apoyo y me ayudaron sin saberlo, dándome las facilidades necesarias para estudiar y terminar de la mejor manera esta importante etapa.

Finalmente, un agradecimiento muy especial a Zack, quien estuvo conmigo desde el comienzo en pandemia, acompañándome incluso en las madrugadas. Sin saberlo, su presencia fue más que suficiente para motivarme y alegrarme. Espero siempre me acompañes.

A todas las personas que, de algún modo, contribuyeron a mi formación académica con su apoyo, consejos y ánimo, les agradezco profundamente.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	18
<i>Objetivo general</i>	18
<i>Objetivos específicos</i>	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. Obtención de secuencias de ADN de las especies de <i>Batrachyla</i>	19
2. Reconstrucciones filogenéticas del género <i>Batrachyla</i>	26
3. Comparación del árbol filogenético reconstruido con las hipótesis propuestas previamente	27
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	40
LITERATURA CITADA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies del género *Batrachyla*. (a) *B. taeniata*, (b) *B. nibaldoi*, (c) *B. antartandica*, (d) *B. leptopus*, (e) *B. fitzroya*. Fotografías: (a) Eduardo Millares, (b) Vicente Valdés, (c) Matías Gargiulo, (d) Ernesto Guzmán, (e) Hernán Pastore. ... **12**

Figura 2. Hipótesis filogenéticas para el género *Batrachyla* propuestas por distintos autores. (a) Cladograma obtenido del análisis de máxima parsimonia a partir de caracteres morfológicos, con valores de bootstrap (sobre las ramas) e índices de Bremer (debajo) (Rabanal 2005), (b) Árbol de máxima parsimonia basado en genes 12S y 16S, con bootstrap de 89 en el nodo principal (Correa *et al.* 2006), (c) Filograma de máxima verosimilitud basado en los mismos genes, con probabilidad posterior en un análisis bayesiano (Correa *et al.* 2006), (d) Árbol de consenso basado en evidencia morfológica (Basso 1994), (e) Árbol de máxima parsimonia con datos moleculares combinados, con soporte Jackknife (sobre las ramas) y probabilidades posteriores bayesianas (debajo) (Basso *et al.* 2011), (f) Filogenia de máxima verosimilitud basada en elementos ultraconservados (UCEs), con soporte de bootstrap (izquierda) y probabilidad posterior local (derecha) (Streicher *et al.* 2018), (g) Filogenia basada en UCEs más una supermatriz expandida de genes diversos, con soporte bootstrap en máxima verosimilitud (Portik *et al.* 2023). **15**

Figura 3. Distribución geográfica y localidades de muestreo de *Batrachyla taeniata*. En rosado se indica el rango de distribución de la especie según la IUCN, mientras que los puntos rojos representan las localidades de muestreo de *B. taeniata*. Además, se incluyen las localidades de muestreo de las especies utilizadas como grupos externos en el análisis filogenético: *Hylorina sylvatica* (estrellas naranjas), *Atelognathus nitoi* (estrella azul) y *Chaltenobatrachus grandisonae* (estrella amarilla)..... **20**

Figura 4. Distribución geográfica y localidades de muestreo de *Batrachyla leptopus*. En celeste se indica el rango de distribución de la especie según la IUCN, mientras que los puntos azules representan las localidades de muestreo de *B. leptopus*... **21**

Figura 5. Distribución geográfica y localidades de muestreo de *Batrachyla antartandica*. En verde se indica el rango de distribución de la especie según la IUCN, mientras que los puntos verdes representan las localidades de muestreo de *B. antartandica*. **22**

Figura 6. Distribución geográfica y localidades de muestreo de *Batrachyla nibaldoi*. Las flechas indican la distribución fragmentada de *B. nibaldoi* según la IUCN, mientras que los puntos morados representan sus localidades de muestreo. Además, se señala con un círculo la distribución localizada de *B. fitzroya*. **23**

Figura 7. Árbol filogenético de la familia Batrachylidae basado en las secuencias concatenadas de fragmentos mitocondriales (12S-16S) y citocromo b de siete taxones, obtenido mediante inferencia bayesiana. Los números sobre los nodos corresponden a valores de probabilidad posterior. El valor en rojo (0,596) indica un menor soporte estadístico para esa relación filogenética. **28**

Figura 8. Topología simplificada de las relaciones filogenéticas de la familia Batrachylidae, basada en la hipótesis bayesiana (Fig. 7). **28**

Figura 9. Comparación entre *Hylorina sylvatica* y especies del género *Batrachyla*. (a) *H. sylvatica*, (b) *B. taeniata*, (c) *B. leptopus*, (d) *B. antartandica*. Fotografías: (a) Eduardo Muñoz, (b) Edgardo Flores, (c) Javier Gross, (d) Matías Gargiulo. **39**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de las muestras de la familia Batrachylidae utilizadas, incluyendo localidades y genes mitocondriales obtenidos. Las abreviaciones utilizadas son: C = Completo; I = Incompleto (secuencia más corta que el resto); ND = No disponible. **24**

RESUMEN

En Chile, los anfibios (Clase Lissamphibia) están representados por 58 especies nativas de anuros, pertenecientes a siete familias y 14 géneros. Uno de estos géneros, *Batrachyla*, cuenta con cinco especies endémicas del cono sur de Sudamérica: *B. taeniata*, *B. leptopus*, *B. antartandica*, *B. nivaldoi* y *B. fitzroya*. Mientras que las tres primeras tienen una distribución amplia en Chile y más reducida en Argentina, *B. nivaldoi* y *B. fitzroya* son endémicas de áreas específicas de Chile y Argentina, respectivamente. La filogenia del género ha sido debatida debido a resultados inconsistentes en estudios previos. Para esclarecer estas relaciones, se obtuvieron secuencias de los genes mitocondriales 12S, tRNA-Val intermedio, 16S y citocromo b de poblaciones representativas de *B. leptopus*, *B. antartandica*, *B. taeniata* y *B. nivaldoi*. A través de inferencia bayesiana, se determinó que *B. antartandica* y *B. leptopus* forman un clado bien sustentado. En contraste, *B. nivaldoi* se encuentra anidada dentro de *B. taeniata*, con probabilidad posterior máxima, lo que sugiere que la primera no constituye una especie válida. Además, si se acepta la propuesta basada en evidencia morfológica de que *B. fitzroya* corresponde a una población de *B. leptopus*, la diversidad del género quedaría reducida a solo tres especies. Finalmente, el clado *B. antartandica* + *B. leptopus* se relaciona más con *Hylorina sylvatica* que con las otras especies de su mismo género (aunque con bajo soporte), lo que sugiere que *Batrachyla* no es un grupo natural. Este estudio tiene implicancias importantes para la diversidad, sistemática y taxonomía de los géneros *Batrachyla* e *Hylorina*, por lo que se resalta la necesidad de análisis con enfoques filogenómicos y un muestreo geográfico más extenso para esclarecer las relaciones evolutivas dentro de la familia Batrachylidae.

Palabras clave: Distribución geográfica, inferencia bayesiana, relaciones evolutivas.

ABSTRACT

In Chile, amphibians (Class Lissamphibia) are represented by 58 native species of anurans, belonging to seven families and 14 genera. One of these genera, *Batrachyla*, includes five species endemic to the southern cone of South America: *B. taeniata*, *B. leptopus*, *B. antartandica*, *B. nibaldoi*, and *B. fitzroya*. While the first three species have a broad distribution in Chile and a more restricted range in Argentina, *B. nibaldoi* and *B. fitzroya* are endemic to specific areas in Chile and Argentina, respectively. The phylogeny of the genus has been debated due to inconsistent results in previous studies. To clarify these relationships, sequences of the mitochondrial genes *12S*, intermediate *tRNA-Val*, *16S*, and *cytochrome b* were obtained from representative populations of *B. leptopus*, *B. antartandica*, *B. taeniata*, and *B. nibaldoi*. Through Bayesian inference, it was determined that *B. antartandica* and *B. leptopus* form a well-supported clade. In contrast, *B. nibaldoi* is nested within *B. taeniata* with maximum posterior probability, suggesting that the former does not constitute a valid species. Additionally, if the morphological evidence-based proposal that *B. fitzroya* corresponds to a population of *B. leptopus* is accepted, the diversity of the genus would be reduced to only three species. Finally, the *B. antartandica* + *B. leptopus* clade is more closely related to *Hylorina sylvatica* than to other species within its genus (albeit with low support), suggesting that *Batrachyla* is not a natural group. This study has important implications for the diversity, systematics, and taxonomy of the genera *Batrachyla* and *Hylorina*, highlighting the need for phylogenomic approaches and broader geographic sampling to clarify evolutionary relationships within the family *Batrachylidae*.

Keywords: Geographic distribution, bayesian inference, evolutionary relationships.

INTRODUCCIÓN

Los anfibios (Clase Lissamphibia) son un grupo de vertebrados tetrápodos con tres órdenes descritos: Gymnophiona (cecilias), Caudata (salamandras y tritones) y Anura (ranas y sapos), siendo este último el más diverso en especies y conocido (Lobos *et al.* 2013). A nivel global, se han descrito aproximadamente 8.750 especies (Frost 2024), lo que convierte a los anfibios en uno de los grupos con una de las radiaciones más diversas entre los vertebrados terrestres (Pyron & Wiens 2011). Esta diversidad se ve reflejada en su capacidad para adaptarse a una amplia variedad de hábitats, mayormente asociados a climas tropicales húmedos. Entre estos diversos hábitats, los anfibios ocupan desde bosques templados y humedales, hasta zonas de alta montaña y regiones áridas a semiáridas (Lobos *et al.* 2013). Además, su presencia es fundamental en las tramas tróficas, debido a que regulan las dinámicas de los ecosistemas (Gardner 2001) y constituyen importantes indicadores de calidad ambiental (Lobos *et al.* 2013).

A pesar de su importancia ecológica, la biodiversidad global está en declive y los anfibios son representativos de esta pérdida, tanto en el número de especies como en sus tamaños poblacionales (Houlahan *et al.* 2000). Las causas de ello han sido clasificadas por Collins & Storfer (2003) en dos categorías. La primera, relacionada con la introducción de especies exóticas, la sobreexplotación y cambios en el uso de suelo; y la segunda, relacionada con el cambio global, enfermedades infecciosas y sustancias químicas. Frente a estos desafíos, el uso de enfoques filogenéticos es crucial para el avance del conocimiento, la gestión de acciones y preservación de la diversidad de anfibios existentes, puesto que las reconstrucciones filogenéticas proporcionan una visión integral de cómo ha ocurrido la diversificación y cómo esta ha influido en la distribución global de las especies (Jetz & Pyron 2018). Comprender esto es crucial para entender cómo se ha dado la evolución y distribución geográfica de las especies, lo que permite contextualizar su presencia y diversidad en regiones específicas.

En el caso de Chile, el único orden presente corresponde a Anura (Lobos *et al.* 2013) y, a diferencia de otros países de Sudamérica, el número de especies de anfibios nativos en Chile es reducido (58 especies), siendo la familia Alsodidae la que comprende la mayoría de las especies, y, en segundo lugar, la familia Batrachylidae, que incluye a los géneros *Atelognathus*, *Chaltenobatrachus*, *Hylorina* y *Batrachyla* (Correa 2022).

El género *Batrachyla* comprende cinco especies: *B. taeniata* (Girard, 1855); *B. leptopus* Bell, 1843; *B. antartandica* Barrio 1967; *B. nibaldi* Formas, 1997 y *B. fitzroya* Basso, 1994 (Cuevas & Cifuentes 2010) (Fig. 1). Estas son endémicas de los bosques templados de *Nothofagus* del sur de Chile y Argentina (Formas 1997), pero también se puede encontrar a *B. taeniata* en la zona mediterránea de Chile central (Formas 1979, Sallaberry *et al.* 1981).

En Chile, las especies más conocidas de *Batrachyla* y que presentan un rango de distribución más amplio son *B. taeniata*, *B. leptopus* y *B. antartandica* (Correa *et al.* 2014). La rana de antifaz, *B. taeniata*, se distribuye en Chile desde Zapallar (32,5° S) a Río Mosco (48,483° S, 72,583° O) (Correa *et al.* 2014). En este rango, habita en los bosques lluviosos del sur y en la estepa de Chile central (Formas 1979; Sallaberry *et al.* 1981), mientras que en Argentina se encuentra desde Neuquén hasta la parte baja de la provincia de Río Negro, asociada al bosque austral de *Nothofagus* (Ceï 1980). En cuanto a su morfología, presenta una coloración dorsal que varía entre café oscuro y claro, terracota y beige, probablemente en función del sustrato en el que se encuentre (Charrier 2019). Además, puede presentar puntos o manchas más oscuras o claras en los costados y una banda negra que se extiende desde el hocico, atravesando los ojos y el tímpano hasta la axila (Fig. 1a). Ventralmente, su coloración es café-grisácea o amarillenta (Ceï 1962, 1980; Charrier 2019).

Por otra parte *B. leptopus*, o rana moteada, se encuentra presente en Chile desde la Reserva Nacional Los Queules (35° 59' 19" S, 72° 41' 25" O) (Cuevas & Cifuentes 2010) hasta Sector río Bravo (48° 11' 07" S, 72° 45' 33" O) (Ortiz & Domínguez 2021). En Argentina se distribuye en los bosques templados de las provincias de

Neuquén, Río Negro y Chubut (Charrier 2019), abarcando localidades como el Parque Nacional Lanín y el P.N. Nahuel Huapi (Barrio 1967a). Con relación a su patrón de coloración, la zona dorsal es de un tono gris con manchas irregulares más oscuras de color café, gris o terracota (Charrier 2019). Asimismo, posee una mancha entre el tímpano y el ojo, junto con bandas transversales en los miembros (Ceí 1962) (Fig. 1d). La coloración ventral es jaspeada con retículos blancos y marrones, y su piel exhibe una textura finamente granular, con gránulos más prominentes en la parte inferior de los muslos (Ceí 1962, 1980).

La rana jaspeada (*B. antartandica*) tiene una distribución desde Mehuín (37° S, 72° 15' O) (Garrido *et al.* 1989) hasta la Isla Riesco (Stipicic *et al.* 2020) y en Argentina se encuentra presente en la zona de Puerto Blest y Lago Frías en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Río Negro (Barrio 1967a). Morfológicamente, la superficie dorsal es de color amarillento intenso (Charrier 2019), jaspeada con manchas oscuras e irregulares, con una banda interocular marrón (Ceí 1980), así como franjas marrones en las extremidades. Además, el cuerpo muestra una discreta granulación tanto dorsal como ventral, siendo más notoria en la superficie inferior de los muslos (Barrio 1967a) (Fig. 1c). En la zona ventral, cuenta con notables puntos circulares o manchas de color castaño oscuro sobre un fondo amarillo yema (Barrio 1967a; Ceí 1980).

Mientras que las tres especies mencionadas anteriormente son endémicas de los bosques templados de *Nothofagus* del sur de Chile y Argentina (Formas 1997), *B. nivaldo* es endémica del sur de Chile, presentando una distribución fragmentada desde la Isla Alao (Chiloé) hasta el fiordo Témpanos (Pincheira-Donoso & Díaz-Páez 2003; González *et al.* 2015). Su coloración dorsal es café claro o café amarillento, con manchas marrones en la zona facial e inguinal (Fig. 1b), mientras que ventralmente presenta zonas blancas (Formas 1997). Por otra parte, *Batrachyla fitzroya* es endémica de Argentina y hasta ahora solo se conoce en la Isla Grande del lago Menéndez (42° 40' S, 71° 51' O) dentro del Parque Nacional Los Alerces (Basso 1994, Vaira *et al.* 2012). Morfológicamente, la coloración de su dorso es café con manchas difusas oscuras y bandas transversales de color café oscuro en las

extremidades (Fig. 1e). Ventralmente exhibe punteado café claro con pequeñas áreas despigmentadas dispersas. Su piel es lisa y sin granulaciones (Basso 1994).



Figura 1. Especies del género *Batrachyla*. (a) *B. taeniata*, (b) *B. nibaldoi*, (c) *B. antartandica*, (d) *B. leptopus*, (e) *B. fitzroya*. Fotografías: (a) Eduardo Millares, (b) Vicente Valdés, (c) Matías Gargiulo, (d) Ernesto Guzmán, (e) Hernán Pastore.

En términos de las relaciones filogenéticas dentro del género, los estudios realizados hasta ahora muestran resultados inconsistentes. Por ejemplo, la morfología del esperma sugiere una estrecha relación entre *B. antartandica* y *B. taeniata*, estando *B. leptopus* más distante (Garrido *et al.* 1989). Por otra parte, en cuanto a su morfología, *B. nibaldoi* es más similar a *B. taeniata*, dada su apariencia general y coloración dorsal, además de presentar una piel dorsal lisa sin granulaciones, al igual que en *B. fitzroya*; mientras que *B. leptopus* y *B. antartandica* sí las presentan. Además, estas últimas tienen un vientre de color crema con manchas oscuras (*B. leptopus*) o amarillento con manchas redondeadas de color marrón (*B. antartandica*) (Formas 1997). Esta relación morfológica también es abordada por Vallejos (1994) en Rabanal (2005), hipotetizando la existencia de dos grupos fenéticos, considerando caracteres osteológicos y morfométricos externos. Estos grupos corresponden al constituido por *B. leptopus* y *B. antartandica*, y al segundo formado por *B. taeniata* y *B. nibaldoi*. Estas similitudes también coinciden

con los hallazgos del mismo estudio de Rabanal (2005) sobre las relaciones filogenéticas basadas en morfología. En este, se menciona que *B. leptopus* y *B. antartandica* tienen aspecto de rana arborícola, mientras que la apariencia de *B. taeniata* y *B. nibaldoi* corresponde a sapos de vida más bien terrestre. Sus resultados señalan que existen dos clados en el género, uno es *leptopus*, compuesto por las especies *B. leptopus* y *B. antartandica*, las cuales comparten un ancestro común, y el segundo clado es *taeniata*, formado por *B. taeniata* y *B. nibaldoi*, que, de igual forma, comparten un ancestro común (Fig. 2a). Además, el autor descarta a *B. fitzroya* como especie válida y la considera sinónima de *B. leptopus*.

Posteriormente, Correa *et al.* (2006), basándose en evidencia molecular, incluyeron tres de las cinco especies, pero no hubo consenso entre los árboles de máxima parsimonia (MP) (Fig. 2b) y máxima verosimilitud (ML) (Fig. 2c), obteniendo en este último una politomía entre *B. taeniata*, *B. antartandica* y *B. leptopus*. Lo mismo había ocurrido tiempo antes en un estudio de Basso (1994), donde se estudiaron las relaciones con caracteres morfológicos entre cuatro de las cinco especies (dado que para la fecha no había sido descrita *B. nibaldoi*). En este último estudio se obtuvo una politomía entre *B. taeniata*, *B. leptopus* y *B. antartandica* + *B. fitzroya* (las cuales conformaron un grupo monofilético) (Fig. 2d).

Trabajos más recientes, también basados en evidencia molecular, han relacionado a *B. antartandica* con *B. fitzroya* (Basso *et al.* 2011) (Fig. 2e) y *B. leptopus* con *B. taeniata* (Streicher *et al.* 2018) (Fig. 2f). Finalmente, uno de los estudios más recientes muestra una relación cercana entre *B. antartandica* y *B. taeniata*, separando a *B. leptopus* (Portik *et al.* 2023) (Fig. 2g).

En síntesis, aún no se cuenta con una hipótesis filogenética bien resuelta y robusta para las especies del género *Batrachyla*. Sin embargo, de acuerdo con los antecedentes expuestos, es posible que estas especies se agrupen en dos clados: uno compuesto por *B. antartandica* y *B. leptopus* y otro por *B. taeniata* y *B. nibaldoi*. Las especies del primer grupo podrían estar más relacionadas entre sí debido a su similitud morfológica. Además, la especie *B. fitzroya* ha sido considerada como una

población de *B. leptopus* por Rabanal (2005), a partir de análisis de datos morfométricos y una reevaluación de los caracteres diagnósticos descritos por Basso (1994). Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, las especies *B. taeniata* y *B. nibaldoi* podrían estar estrechamente relacionadas entre sí, dado que exhiben gran similitud en su coloración, morfología externa y vocalización, además de presentar una superposición de sus distribuciones geográficas (Correa *et al.* 2014).

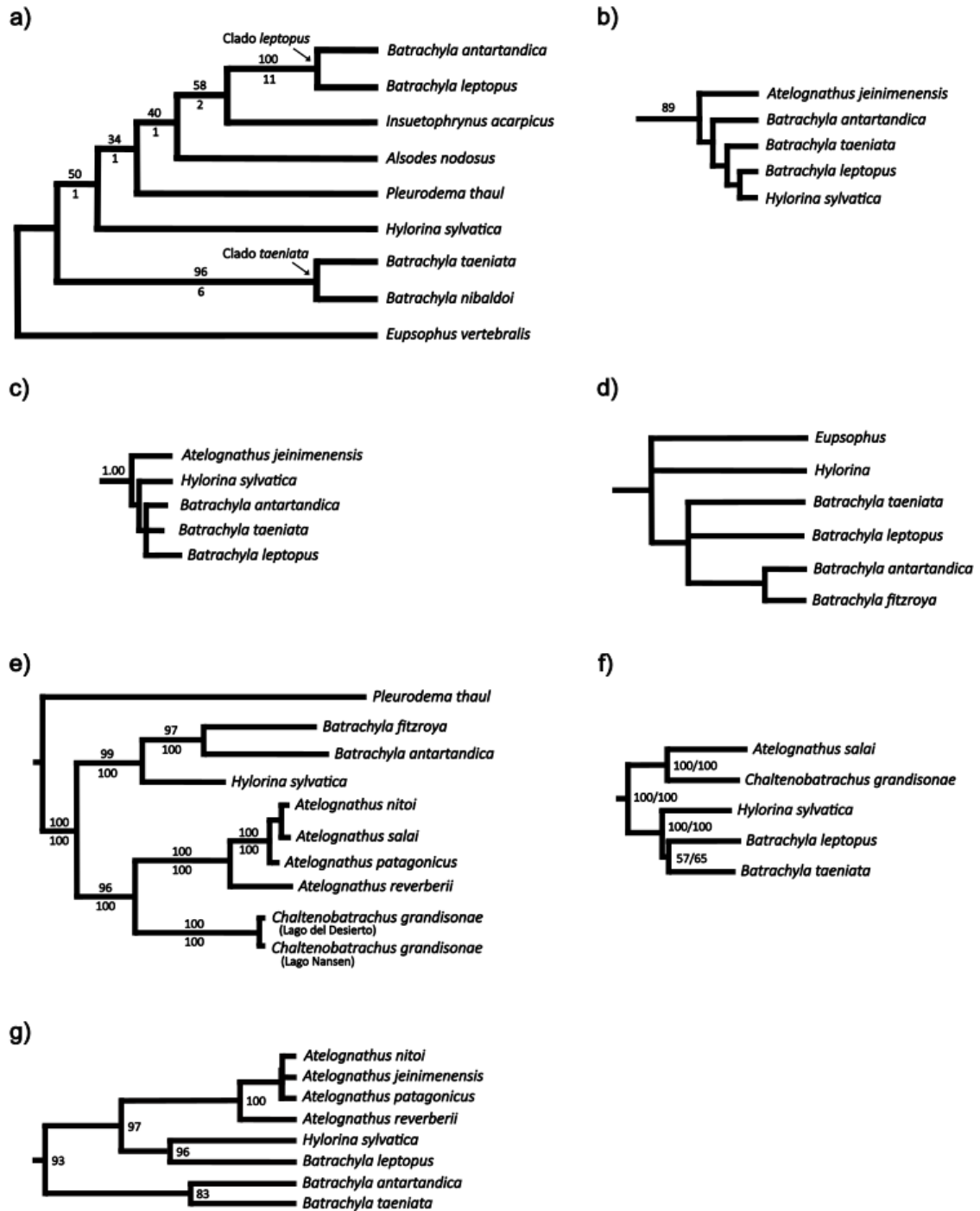


Figura 2. Hipótesis filogenéticas para el género *Batrachyla* propuestas por distintos autores. (a) Cladograma obtenido del análisis de máxima parsimonia a partir de caracteres morfológicos, con valores de bootstrap (sobre las ramas) e índices de Bremer (debajo) (Rabanal 2005), (b) Árbol de máxima parsimonia basado en genes 12S y 16S, con bootstrap de 89 en el nodo principal (Correa *et al.* 2006), (c)

Filograma de máxima verosimilitud basado en los mismos genes, con probabilidad posterior en un análisis bayesiano (Correa *et al.* 2006), (d) Árbol de consenso basado en evidencia morfológica (Basso 1994), (e) Árbol de máxima parsimonia con datos moleculares combinados, con soporte Jackknife (sobre las ramas) y probabilidades posteriores bayesianas (debajo) (Basso *et al.* 2011), (f) Filogenia de máxima verosimilitud basada en elementos ultraconservados (UCEs), con soporte de bootstrap (izquierda) y probabilidad posterior local (derecha) (Streicher *et al.* 2018), (g) Filogenia basada en UCEs más una supermatriz expandida de genes diversos, con soporte bootstrap en máxima verosimilitud (Portik *et al.* 2023).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

Dado que no existe una hipótesis filogenética robusta sobre las relaciones del género *Batrachyla*, se busca responder a la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Batrachyla*? Se plantea la hipótesis de que el género *Batrachyla* se divide en dos clados, *leptopus-antartandica* y *taeniata-nibaldoi*.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de anfibios del género *Batrachyla* utilizando evidencia molecular.

Objetivos específicos:

1. Obtener secuencias de ADN mitocondrial de poblaciones representativas de la distribución de cuatro especies de *Batrachyla* (*B. leptopus*, *B. antartandica*, *B. taeniata* y *B. nibaldoi*).
2. Realizar reconstrucciones filogenéticas para el género *Batrachyla* utilizando el método de inferencia bayesiana (IB).
3. Comparar el árbol filogenético obtenido con las hipótesis previas basadas en evidencia morfológica y molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se detalla el enfoque metodológico en función de los objetivos específicos planteados:

1. Obtención de secuencias de ADN de las especies de *Batrachyla*

Se obtuvieron tejidos de 19 individuos de cuatro especies del género *Batrachyla* (*B. taeniata*, *B. leptopus*, *B. antartandica* y *B. nibaldoi*) para extraer ADN. Para *B. leptopus* y *B. antartandica* se utilizaron cinco individuos, mientras que para *B. taeniata* fueron seis, cada uno procedente de distintas localidades de Chile, abarcando gran parte de sus rangos de distribución (Figs. 3, 4, 5 y 6). La excepción fue *B. nibaldoi*, de la cual se utilizaron tres ejemplares, dos de la localidad tipo y otro cercano a esta. Para los análisis filogenéticos, se utilizaron como grupos externos un ejemplar de *Atelognathus nitoi*, uno de *Chaltenobatrachus grandisonae* y tres de *Hylorina sylvatica*, único representante del género hermano de *Batrachyla* (Basso *et al.* 2011).

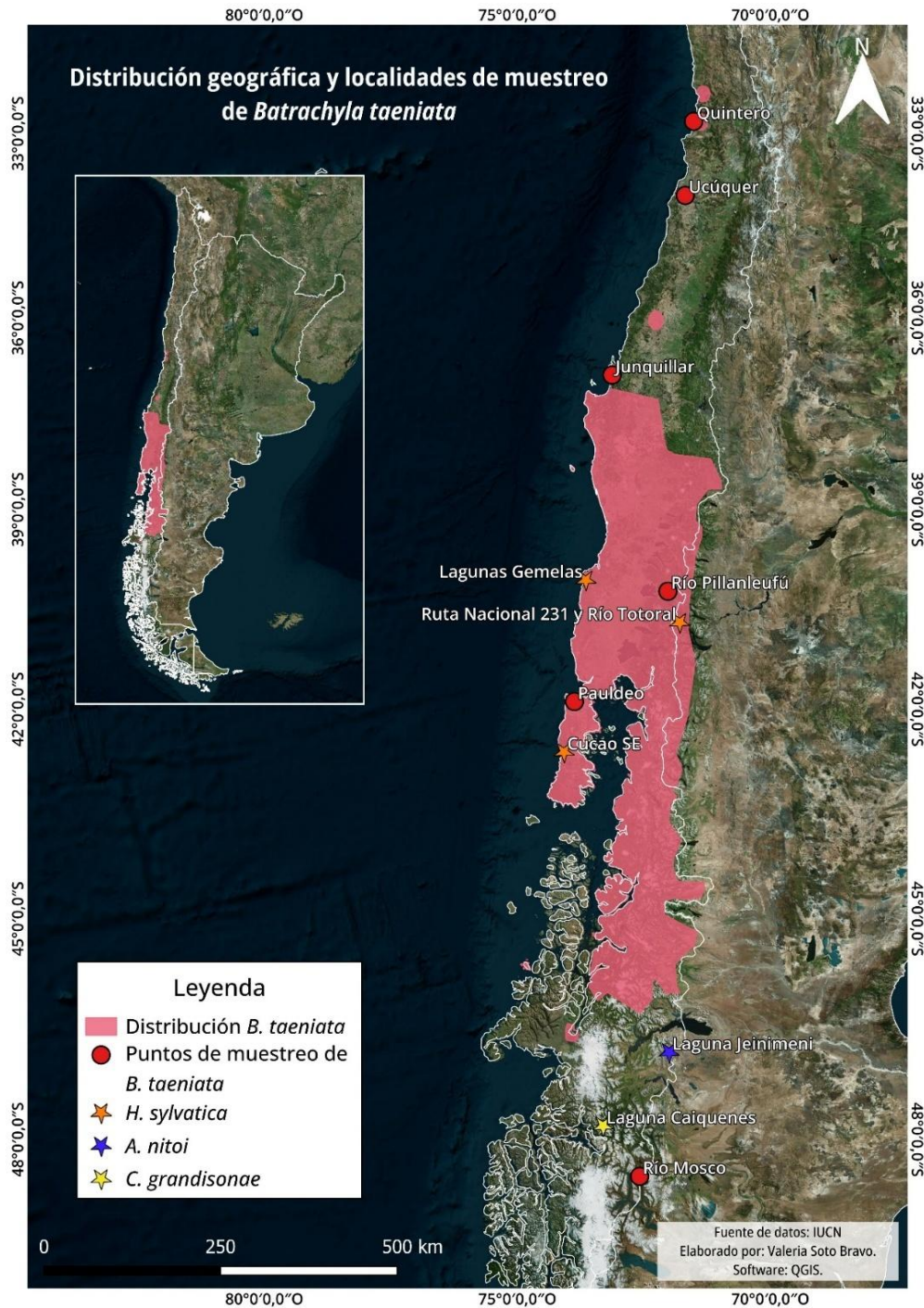


Figura 3. Distribución geográfica y localidades de muestreo de *Batrachyla taeniata*. En rosado se indica el rango de distribución de la especie según la IUCN, mientras que los puntos rojos representan las localidades de muestreo de *B. taeniata*. Además, se incluyen las localidades de muestreo de las especies utilizadas como grupos externos en el análisis filogenético: *Hylorina sylvatica* (estrellas naranjas), *Atelognathus nitoi* (estrella azul) y *Chaltenobatrachus grandisonae* (estrella amarilla).



Figura 4. Distribución geográfica y localidades de muestreo de *Batrachyla leptopus*. En celeste se indica el rango de distribución de la especie según la IUCN, mientras que los puntos azules representan las localidades de muestreo de *B. leptopus*.

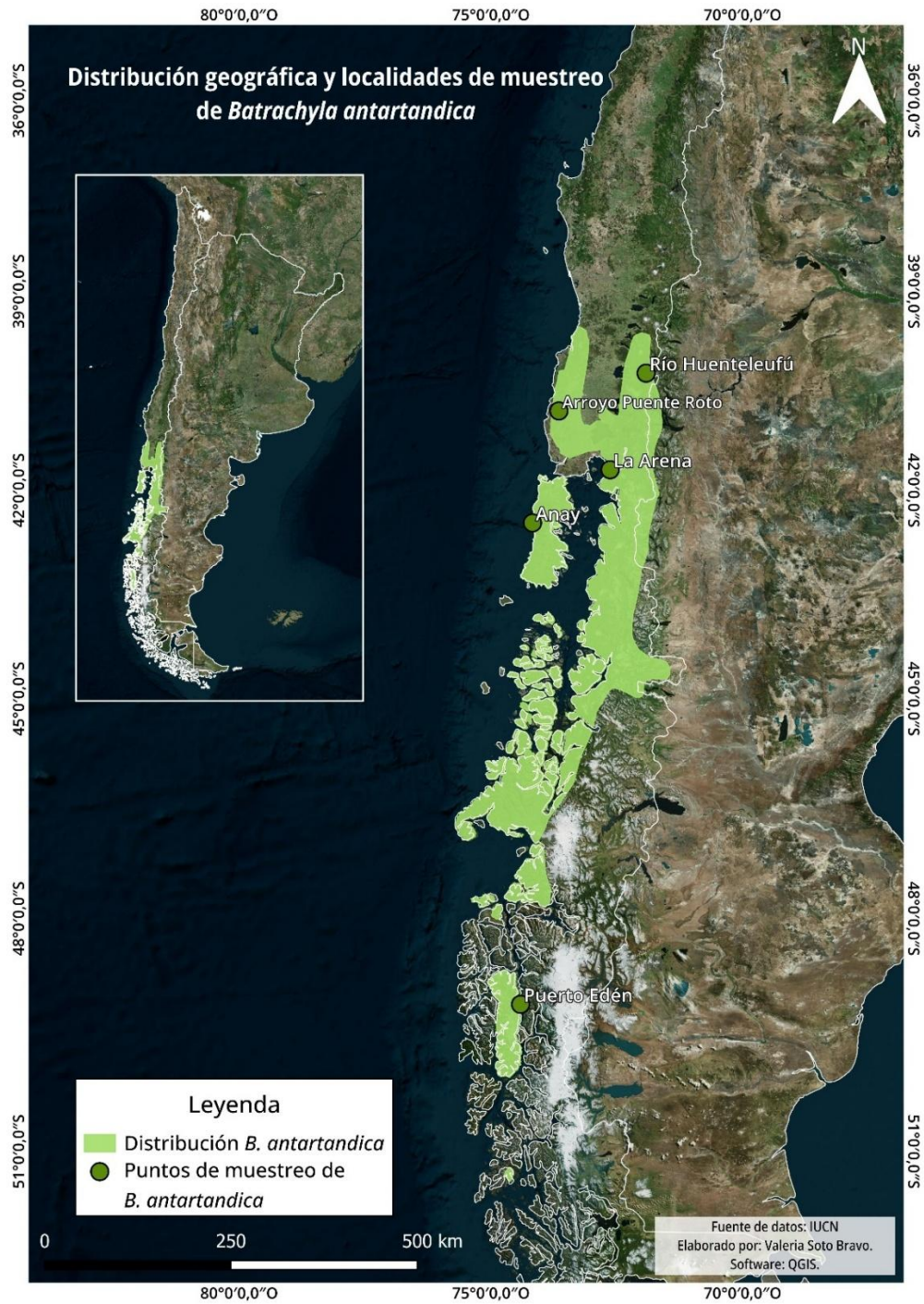


Figura 5. Distribución geográfica y localidades de muestreo de *Batrachyla antartandica*. En verde se indica el rango de distribución de la especie según la IUCN, mientras que los puntos verdes representan las localidades de muestreo de *B. antartandica*.

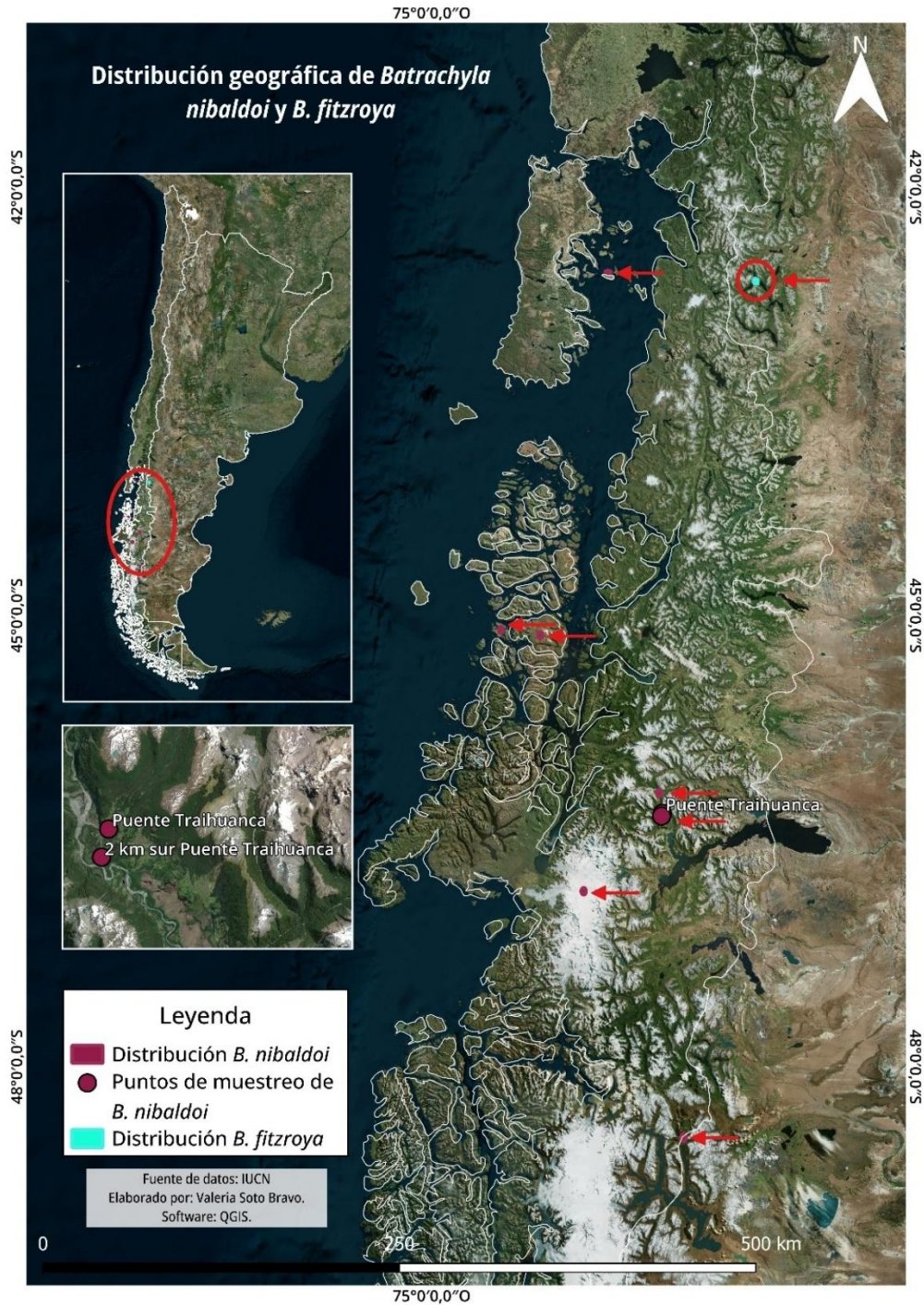


Figura 6. Distribución geográfica y localidades de muestreo de *Batrachyla nivaldoi*. Las flechas indican la distribución fragmentada de *B. nivaldoi* según la IUCN, mientras que los puntos morados representan sus localidades de muestreo. Además, se señala con un círculo la distribución localizada de *B. fitzroya*.

Tabla 1. Información de las muestras de la familia Batrachylidae utilizadas, incluyendo localidades y genes mitocondriales obtenidos. Las abreviaciones utilizadas son: C = Completo; I = Incompleto (secuencia más corta que el resto); ND = No disponible.

Especie	Localidad	Coordenadas	12S	tRNA-Val intermedio	16S	Cytb
<i>A. nitoi</i>	Laguna Jeinimeni	46°49'59.60"S 71°59'57.30"O	C	C	C	C
<i>C. grandisonae</i>	Laguna Caiquenes	47°49'10.56"S 73°18'18.99"O	C	C	C	C
<i>H. sylvatica</i>	Lagunas Gemelas	40°4'28.35"S 73°38'47.87"O	C	C	C	C
<i>H. sylvatica</i>	Ruta Nacional 231 y Río Totoral (Neuquén)	40°42'41.20"S 71°47'24.23"O	C	C	C	ND
<i>H. sylvatica</i>	Cucao SE	42°37'28.82"S 74°4'39.35"O	C	ND	C	C
<i>B. antartandica</i>	Río Huenteleufú	40°15'0.87"S 71°55'1.87"O	C	C	C	ND
<i>B. antartandica</i>	Arroyo Puente Roto	40°49'11.01"S 73°38'56.29"O	C	C	C	ND
<i>B. antartandica</i>	La Arena	41°41'46.33"S 72°37'53.28"O	C	C	C	ND
<i>B. antartandica</i>	Anay (Chiloé)	42°28'45.03"S 74°10'26.95"O	C	C	C	ND
<i>B. antartandica</i>	Puerto Edén (ca. antena)	49° 7'31.76"S 74°24'37.52"O	C	C	C	ND
<i>B. leptopus</i>	Puringue	39°28'18.10"S 72°58'59.00"O	C	C	I	C
<i>B. leptopus</i>	Río Huenteleufú	40°14'54.23"S 71°55'14.43"O	C	C	C	C
<i>B. leptopus</i>	Senda Darwin	41°52'58.01"S 73°40'9.95"O	C	C	C	C
<i>B. leptopus</i>	Cushamen, Lago Puelo (Chubut)	42° 5'29.65"S 71°36'40.43"O	C	C	C	I

<i>B. leptopus</i>	Cucao (Parque)	42°37'20.07"S 74° 6'35.66"O	C	C	C	C
<i>B. nibaldi</i>	Puente Traihuanca	46°20'4.09"S 72°46'13.58"O	C	C	C	C
<i>B. nibaldi</i>	Puente Traihuanca	46°20'4.09"S 72°46'13.58"O	C	C	C	C
<i>B. nibaldi</i>	2 km S Puente Traihuanca	46°21'11.09"S 72°46'37.91"O	C	C	C	C
<i>B. taeniata</i>	Quintero (bosque de petras)	32°47'46.67"S 71°30'50.09"O	C	C	C	C
<i>B. taeniata</i>	Ucúquer	34°1'2.83"S 71°40'49.73"O	C	C	C	C
<i>B. taeniata</i>	Junquillar (sitio 2)	36°54'20.00"S 73°7'36.13"O	C	C	C	ND
<i>B. taeniata</i>	Río Pillanleufú (Puerto Maihue)	40°14'33.45"S 72°1'27.00"O	C	C	C	C
<i>B. taeniata</i>	Pauldeo	41°53'8.69"S 73°52'16.25"O	C	C	C	C
<i>B. taeniata</i>	Río Mosco	48°28'59.05"S 72°34'58.83"O	C	C	C	I

El ADN fue extraído de distintos tejidos preservados en etanol P.A., lengua en el caso de adultos y juveniles y musculatura de la cola en el caso de larvas (*B. antartandica*). Además, se utilizaron muestras de mucosa oral obtenidas con tórulas Copan 516CS01 (secadas inmediatamente con sílica gel) de individuos que fueron liberados en el sitio de captura.

Se extrajo ADN utilizando el kit de extracción Wizard SV genomic DNA purification system de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dos fragmentos mitocondriales (cuatro reacciones en total): uno que abarca entre los genes ribosomales 12S y 16S, incluyendo el tRNA-Val intermedio (fragmento 12S-16S), y otro que incluye parte del gen citocromo b. Se utilizaron los partidores H1478 (5'-

TGACT GCAGA GGGTG ACGGG CGGTG TGT-3') y L1091 (5'-AAAAA GCTTC AACT GGGAT TAGAT ACCCC ACTAT-3') para 12S (Kocher *et al.* 1989), 16Sbr-H (5'-CCGGT CTGAA CTCAG ATCAC GT-3') y 16Sar-L (5'-CGCCT GTTTA TCAAA AACAT-3') para 16S (Palumbi *et al.* 1991), 1216H (5'-TGATT ACGCT ACCTT YGCAC GGT-3') y 1216LN (5'-CCAAY ACGTC AGGTC AAGGT G-3') para el fragmento 12S-16S (Goebel *et al.* 1999) y CytbAR-H (5'-TAWAA GGGTC TTCTA CTGGT TG-3') y MVZ15-L (5'-GAACT AATGG CCCAC ACWWT ACGNA A-3') para el citocromo b (Goebel *et al.* 1999). La mezcla de reacción de PCR consistió en: 3 mM de MgCl₂, 117 µM de dNTPs, 83 nM de cada partidor, 1 U de Taq polimerasa y 1 µL de ADN (~10-200 ng/uL), con un volumen final de 30 µL. En cuanto al ciclo térmico, este consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 minuto, seguido de 38 ciclos de 40 segundos de desnaturalización a 94 °C, 45 segundos de alineación variando entre 52-56 °C y 50 segundos de extensión a 72 °C, acabando con 10 minutos de extensión final a 72 °C y reposo a 10 °C. Por último, los productos de PCR se verificaron por electroforesis y fueron secuenciados en Macrogen Inc., Chile.

No fue posible obtener la información genética de *B. fitzroya* (Basso *et al.* 2011), ya que no se encuentra disponible en GenBank. No obstante, se obtuvieron las secuencias de los 19 ejemplares pertenecientes a las otras cuatro especies de *Batrachyla*, con la excepción del citocromo b de *B. antartandica*, que no amplificó en esta especie (Tabla 1). Estas secuencias fueron editadas utilizando el programa BioEdit. Posteriormente, las secuencias de todas las especies, incluyendo las de los grupos externos (*H. sylvatica*, *A. nitoi* y *C. grandisonae*), se alinearon con el software MUSCLE (Edgar 2004) y los alineamientos fueron inspeccionados visualmente.

2. Reconstrucciones filogenéticas del género *Batrachyla*

El análisis filogenético bayesiano se realizó con el programa MrBayes v3.2.7 (Ronquist *et al.* 2012). Los dos fragmentos se concatenaron, pero a cada fragmento se aplicó de forma independiente un método de Markov Chain Monte Carlo con salto de modelo para explorar el espacio de todos los modelos generales de tiempo

reversible (GTR), más parámetro gamma y proporción de sitios invariables. El análisis consistió en dos grupos de cuatro cadenas de Markov que se ejecutaron de forma independiente durante 20 millones de generaciones, tomando muestras cada 1.000 generaciones. El primer 25% de las generaciones se descartó conservativamente como quemado (burnin) después de observar la estacionariedad de los logaritmos de las probabilidades (ln-likelihoods) de los árboles en Tracer v1.7.1 (Rambaut *et al.* 2018). La convergencia y la mezcla de cadenas se evaluaron examinando los valores de la desviación estándar promedio de las frecuencias de división (ASDSF) y los tamaños de muestra esperados (ESS) y el factor de reducción de escala potencial (PSRF) para todos los parámetros.

3. Comparación del árbol filogenético reconstruido con las hipótesis propuestas previamente

Una vez obtenido el árbol filogenético de consenso basado en evidencia molecular, este fue comparado con la evidencia morfológica de las especies de *Batrachyla* descrita en los estudios de Garrido *et al.* (1989), Basso (1994), Formas (1997) y Rabanal (2005), así como también con la evidencia molecular de los estudios de Correa *et al.* (2006), Basso *et al.* (2011), Streicher *et al.* (2018) y Portik *et al.* (2023). Se contrastaron las topologías para identificar diferencias y/o similitudes en las relaciones de parentesco entre las especies según ambos enfoques metodológicos, proporcionando una comprensión más completa y precisa de las relaciones evolutivas dentro el género.

RESULTADOS

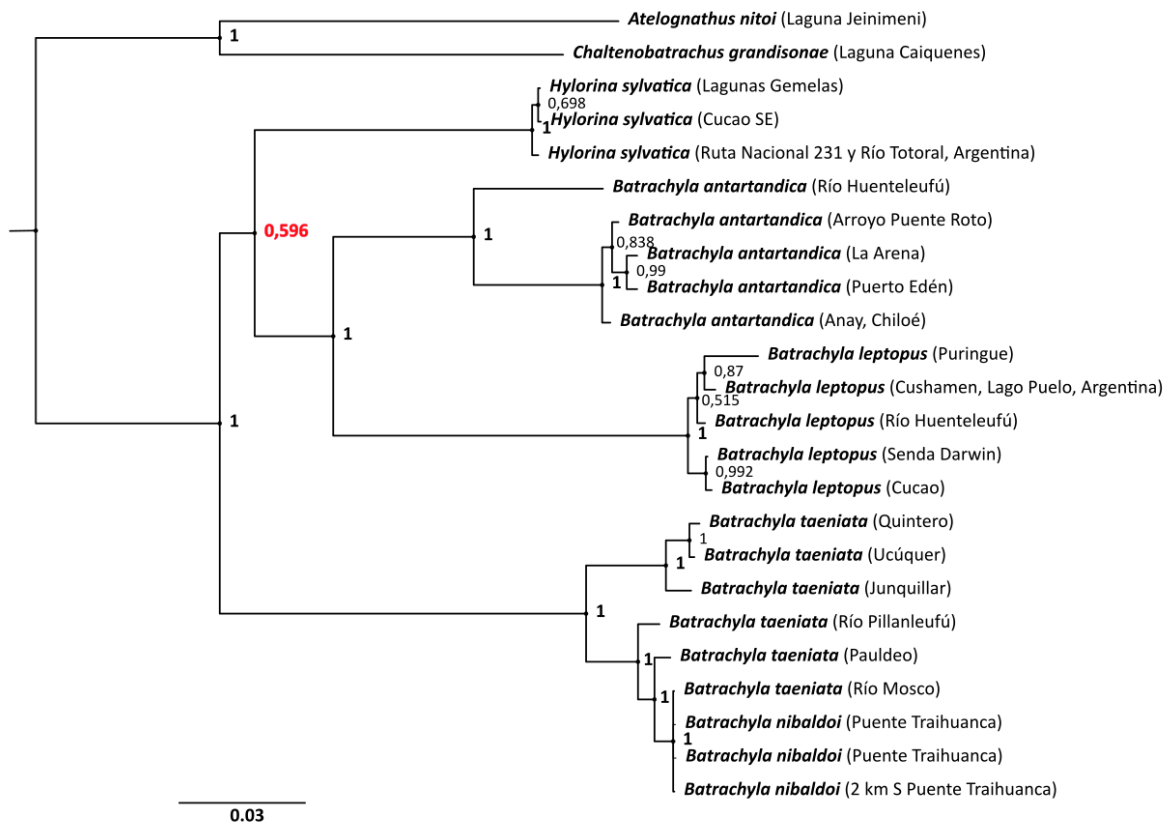


Figura 7. Árbol filogenético de la familia Batrachylidae basado en las secuencias concatenadas de fragmentos mitocondriales (12S-16S) y citocromo b de siete taxones, obtenido mediante inferencia bayesiana. Los números sobre los nodos corresponden a valores de probabilidad posterior. El valor en rojo (0,596) indica un menor soporte estadístico para esa relación filogenética.

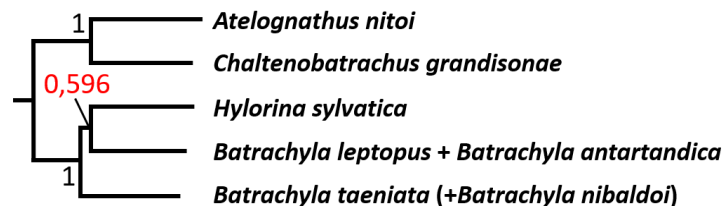


Figura 8. Topología simplificada de las relaciones filogenéticas de la familia Batrachylidae, basada en la hipótesis bayesiana (Fig. 7).

La topología del análisis bayesiano (Figs. 7 y 8) muestra que las cuatro especies del género *Batrachyla* incluidas no forman un grupo exclusivo y se distribuyen en clados diferentes, con una alta probabilidad posterior. En este contexto, *Hylorina sylvatica* se anida dentro de *Batrachyla*, agrupándose estrechamente con algunas especies de este género (*B. antartandica* y *B. leptopus*), por lo que *Batrachyla* conformaría un grupo parafilético con respecto a *Hylorina* (Fig. 8). Sin embargo, este nodo tiene un soporte bajo (probabilidad posterior = 0,596), lo que indica cierta incertidumbre en la resolución de las relaciones entre *Hylorina* y *Batrachyla*.

Las especies *B. antartandica* y *B. leptopus* están más cercanas genéticamente formando un clado bien sustentado, con poblaciones agrupadas en subclados definidos, existiendo una diferenciación genética clara entre ambas especies (monofilia recíproca). Por el contrario, *B. nibaldi*, se encuentra anidada dentro de *B. taeniata*, y dado que los nodos están bien sustentados con probabilidad posterior máxima (1), los resultados sugieren que *B. nibaldi* no es una especie válida y podría corresponder a una población diferenciada de *B. taeniata*, pero no lo suficientemente distinta para ser otra especie.

Por otro lado, los géneros *Atelognathus* y *Chaltenobatrachus* se separan del resto de los taxones, lo que indica que ambos se encuentran evolutivamente más relacionados entre sí. Además, presentan una mayor distancia filogenética con respecto a los otros géneros, lo que refleja una divergencia evolutiva más antigua en comparación con las especies de *Batrachyla*.

Contraste de hipótesis filogenéticas

El clado *B. leptopus* + *B. antartandica*, recuperado en este estudio con probabilidad posterior máxima (Fig. 7), coincide con el agrupamiento propuesto por Rabanal (2005) (Fig. 2a), basado en evidencia morfológica, y por Formas (1997), desde un enfoque fenético.

Al comparar las relaciones obtenidas en este estudio (Figs. 7 y 8) con estudios previos (Fig. 2), se identificaron diferencias topológicas. Algunos trabajos basados en morfología o datos moleculares (Garrido *et al.* 1989; Correa *et al.* 2006; Basso *et al.* 2011; Streicher *et al.* 2018; Portik *et al.* 2023) presentan agrupamientos alternativos, incluyendo una politomía entre especies en Correa *et al.* (2006) (su análisis de ML) (Fig. 2c) o la relación entre *B. antartandica* con *B. taeniata* en Garrido *et al.* (1989). Además, difiere de la topología de Portik *et al.* (2023) (Fig. 2g), la cual sugiere que *Batrachyla* es un género polifilético.

Por otra parte, se observó que *B. nivaldoi* se encuentra anidada dentro de *B. taeniata*. Dicha relación ya había sido planteada por Rabanal (2005), quien obtuvo una estrecha relación filogenética entre ambas especies. No obstante, otros estudios, que no incluyeron a *B. nivaldoi*, han relacionado a *B. taeniata* con *B. antartandica* (Portik *et al.* 2023) (Fig. 2g) o con *B. leptopus* (Streicher *et al.* 2018) (Fig. 2f), o no han podido resolver las relaciones dentro del género, como en la politomía obtenida por Correa *et al.* (2006) en su análisis de ML (Fig. 2c).

En cuanto a la relación entre *Batrachyla* e *Hylorina*, Rabanal (2005) propuso la polifilia de *Batrachyla* basándose en evidencia morfológica (Fig. 2a). En el presente estudio, *H. sylvatica* se encuentra anidada dentro de *Batrachyla*, lo que sugiere que este último género podría ser parafilético o polifilético. Resultados similares fueron obtenidos en el análisis de máxima parsimonia de Correa *et al.* (2006) (Fig. 2b) y posteriormente en Portik *et al.* (2023), donde *Hylorina* también aparece más relacionado con una especie de *Batrachyla* (Fig. 2g). En contraste, otros estudios posicionan a *H. sylvatica* como grupo hermano de *Batrachyla*, como lo muestran los

análisis de máxima verosimilitud de Correa *et al.* (2006) (Fig. 2c), así como también Basso *et al.* (2011) (Fig. 2e) y Streicher *et al.* (2018) (Fig. 2f).

DISCUSIÓN

Relaciones filogenéticas de las especies de *Batrachyla*

El análisis filogenético molecular realizado en este estudio muestra que las especies *B. antartandica* y *B. leptopus* están más relacionadas entre sí que con otras especies del género, formando el clado *B. leptopus* + *B. antartandica*, bien sustentado con probabilidad posterior máxima (1). Este resultado es consistente con otras líneas de evidencia, dada la similitud en morfología entre ambas especies, como también lo había planteado Formas (1997), quien señaló que, desde un enfoque fenético, ambas son más similares entre sí en comparación con el resto de las especies de *Batrachyla*. Asimismo, esto concuerda con el trabajo de Rabanal (2005), quien, a partir de una filogenia basada en evidencia morfológica y osteológica, concluyó que *B. leptopus* y *B. antartandica* comparten un ancestro común y forman el clado “*leptopus*” (Fig. 2a), respaldado con un valor de bootstrap de 100. Este resultado también se sustentó por el análisis de Bremer realizado por el autor, que refuerza la solidez de la relación, al indicar que serían necesarios 11 pasos adicionales para transformar su agrupamiento en politomías.

Sin embargo, también existen hipótesis filogenéticas alternativas que proponen agrupaciones distintas dentro del género *Batrachyla* y no relacionan directamente a *B. antartandica* y *B. leptopus* como especies hermanas, como se presenta en este estudio. Por ejemplo, la filogenia basada en máxima verosimilitud de Correa *et al.* (2006) presenta una politomía entre *B. antartandica*, *B. taeniata* y *B. leptopus* (Fig. 2c). En el mismo trabajo, el enfoque de máxima parsimonia sugiere que *B. antartandica* está más relacionada con *B. taeniata* que con *B. leptopus* (Fig. 2b), lo que coincide también con los resultados de Garrido *et al.* (1989) en base a la morfología del esperma de las especies.

Por otro lado, la filogenia de Streicher *et al.* (2018), agrupa a *B. leptopus* y *B. taeniata* con valores de soporte bajo (57 y 65), obtenidos a partir de dos metodologías diferentes. Sin embargo, este estudio no incluye otras especies del género (Fig. 2f). De manera similar, Basso *et al.* (2011) agrupan a *B. antartandica*

con *B. fitzroya*, pero tampoco considera otras especies del género (Fig. 2e). Finalmente, Portik *et al.* (2023), con un soporte de bootstrap moderado (83), muestran una relación cercana entre *B. antartandica* y *B. taeniata*, separando a *B. leptopus* (Fig. 2g), lo que es consistente con los hallazgos de Garrido *et al.* (1989).

Si bien hay trabajos que plantean relaciones distintas que no agrupan a *B. leptopus* y *B. antartandica*, estas hipótesis suelen estar poco sustentadas o no incluyen a todas las especies. Por otro lado, como se ha mencionado, existe evidencia tanto morfológica como molecular que indica que *B. antartandica* y *B. leptopus* están relacionadas cercanamente dentro del género *Batrachyla*.

Por otra parte, en este estudio se recuperó otro clado no relacionado directamente con las dos especies anteriores, compuesto por *B. taeniata* y *B. nivaldoi*. A partir del análisis filogenético, se obtiene que *B. nivaldoi* se anida dentro de *B. taeniata* con una probabilidad posterior máxima (1), por lo que se sugiere que no corresponde a una especie distinta de *B. taeniata*. Este resultado se justifica dada la gran similitud en la coloración, morfología externa y vocalización de ambas especies (Díaz-Páez *et al.* 2002), además de la superposición de sus rangos geográficos (Correa *et al.* 2014), siendo la distribución de *B. nivaldoi* completamente contenida dentro de la de *B. taeniata* y considerablemente más restringida en comparación con esta última. Por otro lado, los individuos de *B. nivaldoi* están más relacionados genéticamente con *B. taeniata* de Río Mosco y de otras poblaciones del sur de Chile, que estas últimas con aquellas de *B. taeniata* provenientes de las zonas más al norte de Chile (Quintero y Ucúquer). Si bien esta divergencia genética puede ser explicada por la distancia geográfica que separa las poblaciones del sur de aquellas que habitan en la estepa de Chile central, ambas adaptadas a regímenes climáticos distintos dentro de su rango distribucional (Sallaberry *et al.* 1981), también se respalda con evidencia filogeográfica, donde se ha encontrado una marcada diferenciación genética y estructuración poblacional dentro de *B. taeniata* (Cisternas, 2022).

A su vez, existen diferentes propuestas sobre las relaciones de *B. taeniata* con otras especies del género. Algunos estudios que no incluyen a todas las especies han relacionado a *B. taeniata* con *B. antartandica* (Portik *et al.* 2023) y con *B. leptopus*

(Streicher *et al.* 2018), e incluso una politomía entre *B. taeniata*, *B. leptopus* y *B. antartandica* (Correa *et al.* 2006), como se mencionó anteriormente. Por otro lado, el estudio de Rabanal (2005), basado en caracteres morfológicos, posiciona a *B. taeniata* y *B. nibaldi* en un mismo clado con un valor de bootstrap de 96, indicando una estrecha relación entre ambas (Fig. 2a). Esta evidencia coincide con la afinidad observada en el presente estudio y refuerza la hipótesis de la conespecificidad.

Validez taxonómica de *Batrachyla fitzroya* como especie

Batrachyla fitzroya fue descrita por Basso en 1994 basándose en ocho caracteres diagnósticos: tres osteológicos y cinco morfológicos. Sin embargo, Rabanal (2005) considera que *B. fitzroya* no es una especie válida, sino que una población de *B. leptopus*. Esta conclusión se basa en que los caracteres osteológicos utilizados para diagnosticar a *B. fitzroya*, no difieren significativamente de los descritos para *B. leptopus*. Este argumento concuerda con lo señalado por Lynch (1971), quien afirmó que los caracteres osteológicos no son suficientes para definir especies y son más útiles en diagnósticos genéricos.

En cuanto a otros caracteres, como el tamaño de los individuos, Rabanal (2005) menciona que el rango de *B. fitzroya* se encuentra dentro del rango de *B. leptopus*, lo que sugiere una posible superposición entre ambas especies. Además, el mismo autor señala que el único carácter distintivo aparente es la ausencia de granulación en la piel (descrito por Basso en 1994), pero considera que dicha característica es variable dentro del género, poniendo en duda su valor diagnóstico.

Por otro lado, los análisis de componentes principales (ACP) realizados por Rabanal (2005) indican que los especímenes de *B. fitzroya* se agrupan, desde el punto de vista morfométrico, dentro del rango de dispersión de *B. leptopus*, formando un grupo homogéneo. Esto indicaría la ausencia de diferencias fenotípicas relevantes que respalden la distinción entre ambas especies. Además, al comparar individuos de *B. leptopus*, el autor destaca una marcada diferencia morfométrica entre los grupos de Chile y Argentina, lo que indica que los especímenes descritos por Basso

como una nueva especie, podrían representar simplemente una población de *B. leptopus*.

En el árbol filogenético de consenso realizado por Basso (1994), con base en evidencia morfológica, se obtiene una politomía entre las especies *B. taeniata*, *B. leptopus* y *B. antartandica* + *B. fitzroya*, relacionando más cercanamente a estas últimas (Fig. 2d). Sin embargo, no deja resuelta la relación entre las especies. Más tarde, en Basso *et al.* (2011), con base en evidencia molecular, *B. fitzroya* fue incluida junto con una única especie adicional del género *Batrachyla*: *B. antartandica*. Utilizando los enfoques de máxima parsimonia (MP) e inferencia bayesiana, los resultados indicaron que ambas especies están genéticamente relacionadas, con un soporte alto (valores superiores a 95), lo que era de esperar al ser las únicas representantes del género incluidas en el análisis (Fig. 2e). Sin embargo, la exclusión de *B. leptopus* limita la interpretación de los resultados y deja abierta la posibilidad de que *B. fitzroya* sea una población de esta última.

Adicional a lo mencionado anteriormente, Rabanal (2005) señaló que el material colectado de *B. fitzroya* presentaba una fijación deficiente, lo que pudo alterar significativamente a los ejemplares. Asimismo, no se tienen registros adicionales de otros individuos, larvas, cantos o cariotipos de esta especie, lo que limita aún más su caracterización. Por último, el material genético utilizado en el árbol filogenético de Basso *et al.* (2011), donde se incluye a *B. fitzroya*, no se encuentra depositado en GenBank, lo cual además de generar cierta incertidumbre sobre la validez de los datos, también impidió que la especie fuera incluida en el análisis realizado en este estudio.

En conjunto, la información disponible sobre *B. fitzroya*, tanto morfológica como molecular, no es suficiente para considerarla como una especie distinta. Por el contrario, los datos apuntan a que podría tratarse de una población dentro de *B. leptopus*, como propuso Rabanal (2005).

Relaciones filogenéticas de *Batrachyla* e *Hylorina*

Históricamente, desde que *B. taeniata* fue trasferida al género (Lynch 1972), se ha considerado a *Batrachyla* (incluyendo además a *B. leptopus* y *B. antartandica*) como monofilético (Lynch 1978; Basso 1994). Sin embargo, el análisis de las relaciones filogenéticas de *Batrachyla* basado en evidencia molecular en este estudio sugiere que el género no es monofilético, coincidiendo con lo propuesto por Rabanal (2005), quien basándose en caracteres morfológicos externos y osteológicos, descartó la monofilia y planteó que *Batrachyla* era polifilético.

En el trabajo de Rabanal (2005), *Batrachyla* se describe como un género polifilético, ya que agrupa en un clado a *B. antartandica* y *B. leptopus*, mientras que en otro clado se encuentran *B. taeniata* y *B. nivaldoi*, sugiriendo que el género reúne linajes evolutivos independientes. Por el contrario, en este estudio, se propone que *Batrachyla* puede ser parafilético, dado que *H. sylvatica* se encuentra anidada dentro del género, formando un grupo cercano a las especies *Batrachyla leptopus* y *B. antartandica*. No obstante, esta relación presenta un soporte bajo, con una probabilidad posterior de 0,596, lo que genera cierta incertidumbre.

Adicionalmente, el estudio de Correa *et al.* (2006), basado en los genes mitocondriales 12S y 16S, mostró resultados consistentes con esta propuesta. En uno de los árboles filogenéticos obtenidos mediante el análisis de máxima parsimonia (MP), *H. sylvatica* también aparece anidada dentro de *Batrachyla*, específicamente más relacionada con *B. leptopus* (Fig. 2b). Sin embargo, otro de los árboles filogenéticos obtenidos en el mismo estudio, mediante el análisis de máxima verosimilitud (ML), evidenció a *H. sylvatica* como grupo hermano de *Batrachyla*, aunque no se reportan los valores de soporte sobre los nodos (Fig. 2c).

Posteriormente y de manera similar, en el análisis realizado por Basso *et al.* (2011), se utilizaron datos moleculares combinados, incluyendo el gen ribosomal 12S completo, regiones parciales del gen 16S, citocromo b (*cytb*) y el gen nuclear que codifica para la proteína rodopsina. Empleando tanto el enfoque de máxima parsimonia (MP) como un análisis bayesiano (BI), *H. sylvatica* fue recuperada como

grupo hermano de *B. antartandica* y *B. fitzroya* (las únicas especies de *Batrachyla* incluidas en el análisis). Ese estudio indicó una alta confianza en las relaciones filogenéticas propuestas; en el análisis de MP, el índice de Jackknife proporcionó un soporte de 99, mientras que en IB, se muestra una probabilidad posterior de 100 para el nodo que conecta a *H. sylvatica* como grupo hermano de *Batrachyla* (Fig. 2e). Por una parte, estos resultados refuerzan la idea de que *H. sylvatica* constituye un linaje distinto e independiente de *Batrachyla*; sin embargo, cabe destacar que no se incluyeron todas las especies de *Batrachyla* en el análisis, por lo que no se puede determinar con certeza la verdadera relación entre ambos géneros. Incluir al resto de ellas puede alterar la posición filogenética de *H. sylvatica* dentro del árbol.

De manera complementaria, el estudio de Streicher *et al.* (2018), basado en elementos ultraconservados (UCEs) y en un enfoque de máxima verosimilitud (ML), recupera a *H. sylvatica* como el grupo hermano de *B. leptopus* y *B. taeniata*, con un valor de 100 de soporte de bootstrap y 100 de probabilidad posterior local (Fig. 2f). Este patrón filogenético refuerza la idea de que *Hylorina* constituye un grupo cercano a *Batrachyla*, pero evolutivamente distinto. Sin embargo, los valores de soporte del nodo *B. leptopus* + *B. taeniata* son notablemente bajos, lo cual significa un bajo sustento para reconocer al género como monofilético.

Más recientemente, Portik *et al.* (2023), presentaron una filogenia basada en una mezcla de datos filogenómicos (UCEs) con una supermatriz expandida de genes diversos. Este análisis, realizado mediante máxima verosimilitud (ML), mostró que *H. sylvatica* se relaciona más cercanamente con *B. leptopus*, con un valor de soporte de 96, y que las otras dos especies de *Batrachyla* incluidas, *B. antartandica* y *B. taeniata*, constituyen el grupo hermano del clado *H. sylvatica* + *B. leptopus* más las especies del género *Atelognathus* incluidas (Fig. 2g). Esto refuerza la idea que *Batrachyla* podría ser polifilético, aunque es importante señalar que uno de los clados estaría compuesto por *B. antartandica* y *B. taeniata*, difiriendo de las relaciones obtenidas en este estudio.

Si bien la filogenia de Portik *et al.* (2023) es una de las más completas del orden Anura realizadas hasta la fecha, muestra claramente que las relaciones dentro de

la familia Batrachylidae aún no están completamente resueltas. También, los estudios filogenéticos realizados hasta ahora presentan conflictos entre sí, lo que puede atribuirse, en parte, a las variaciones en el número de especies incluidas, los datos genéticos usados (bajo número de genes o aproximaciones genómicas) y las metodologías de reconstrucción filogenética empleadas en cada caso. Estas variaciones limitan la capacidad para esclarecer completamente sus relaciones filogenéticas.

En este contexto, la hipótesis filogenética molecular obtenida en este trabajo es la más completa hasta la fecha, ya que incluye a cuatro de las cinco especies del género, con una cobertura geográfica extensa y, por primera vez, incorpora ejemplares de *B. nibaldoi* provenientes de su localidad tipo. Además, dado que los resultados moleculares obtenidos en este estudio respaldan los hallazgos de Rabanal (2005) basados en caracteres morfológicos, se presentan dos líneas de evidencia independientes que convergen en la misma conclusión. Esto lleva a proponer una reestructuración taxonómica de *Batrachyla*, reduciendo el número de especies válidas de cinco a tres: *B. taeniata*, *B. leptopus* y *B. antartandica*.

En cuanto a la relación entre *Batrachyla* e *Hylorina sylvatica*, el hecho de que esta última aparezca anidada dentro de *Batrachyla*, plantea interrogantes sobre la clasificación actual del grupo. Sin embargo, la inclusión de *Hylorina* del género sería controversial, ya que presenta diferencias morfológicas significativas. Por ejemplo, *Hylorina* se caracteriza por su coloración verde esmeralda intensa, extremidades largas y un mayor tamaño (Charrier 2019), mientras que *Batrachyla* tiene tonalidades crípticas, cuerpos más compactos y un menor tamaño (Fig. 9). Por el contrario, los datos sugieren que *Batrachyla* podría representar dos linajes distintos, lo que implicaría una posible división a nivel de género. Este hallazgo representa un cambio importante en la taxonomía y sistemática del grupo.

Para validar esta hipótesis y precisar la clasificación del grupo, se resalta la necesidad de llevar a cabo análisis más exhaustivos, con un muestreo ampliado y geográficamente representativo, que permita obtener una perspectiva más completa sobre estos linajes.

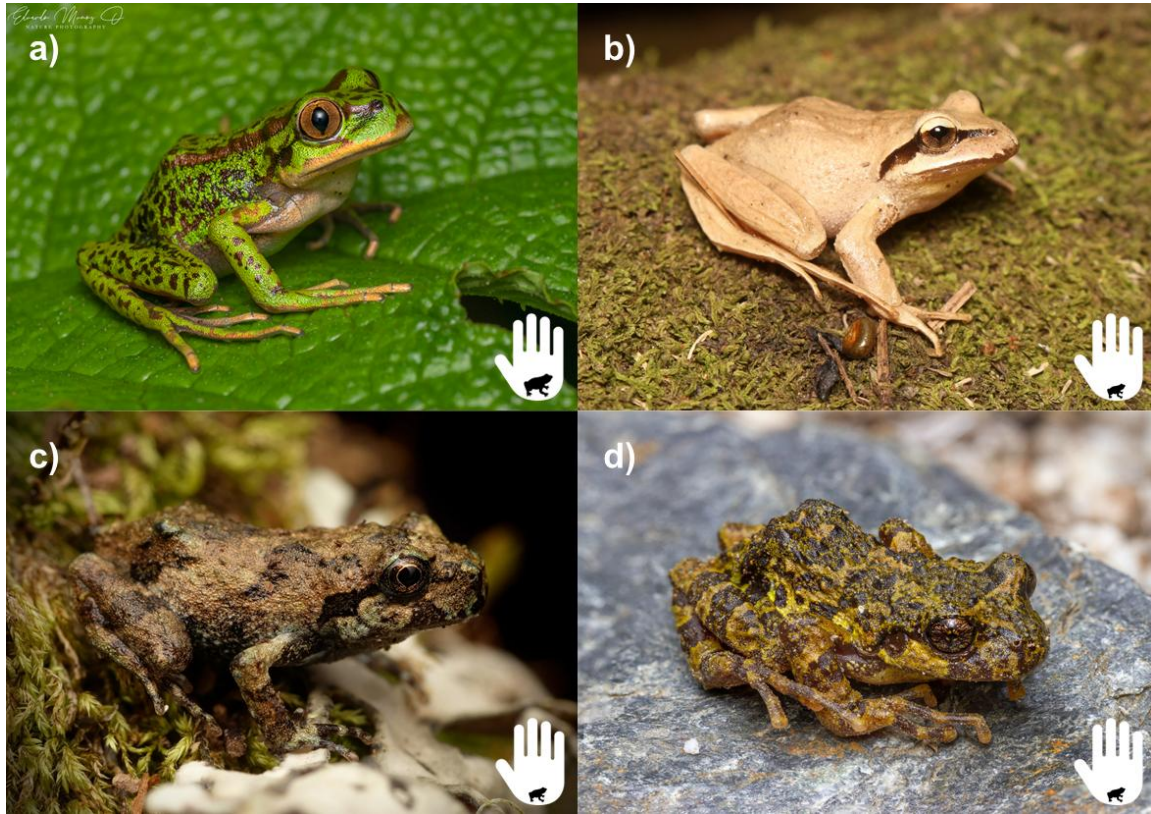


Figura 9. Comparación entre *Hylorina sylvatica* y especies del género *Batrachyla*. (a) *H. sylvatica*, (b) *B. taeniata*, (c) *B. leptopus*, (d) *B. antartandica*. Fotografías: (a) Eduardo Muñoz, (b) Edgardo Flores, (c) Javier Gross, (d) Matías Gargiulo.

CONCLUSIONES

Esta investigación analizó las relaciones filogenéticas del género *Batrachyla* utilizando evidencia molecular mitocondrial. Los resultados indican que *B. antartandica* y *B. leptopus* forman un clado bien sustentado con probabilidad posterior de 1, lo que confirma su estrecha relación y ancestría común. Por otra parte, se recuperó otro clado compuesto por *B. taeniata* y *B. nibaldoi*, no relacionado directamente con el anterior. Además, se obtuvo que *B. nibaldoi* se anida dentro de *B. taeniata*, con probabilidad posterior de 1, lo que sugiere que no corresponde a una especie distinta, sino a una población dentro de *B. taeniata*. Esta conclusión es respaldada por la gran similitud morfológica descrita entre ambas especies, la divergencia genética observada entre diferentes poblaciones de *B. taeniata* y la completa superposición de la distribución geográfica de *B. nibaldoi* dentro del rango de *B. taeniata*.

En cuanto a *B. fitzroya*, su inclusión en este estudio no fue posible debido a la falta de información genética disponible. Sin embargo, Rabanal (2005) ya había cuestionado su validez como especie, considerándola una población de *B. leptopus*, basándose en la falta de diferencias morfológicas significativas y que sus caracteres diagnósticos no difieren de los de *B. leptopus*. Además, los individuos examinados estaban fijados deficientemente y no existe información adicional sobre la especie, así como tampoco nuevos registros. En consecuencia, los resultados sugieren que solo deberían considerarse tres especies válidas para el género *Batrachyla*: *B. taeniata*, *B. leptopus* y *B. antartandica*.

Por otra parte, la recuperación de *Hylorina sylvatica* dentro del género *Batrachyla* sugiere que este último podría no ser un grupo natural. No obstante, el bajo soporte obtenido en esta relación, junto con la incongruencia entre estudios previos, dificulta el establecimiento de conclusiones definitivas. Aún así, los datos apuntan a que *Batrachyla* podría representar dos linajes distintos (es decir, constituye un taxón polifilético), un escenario que requiere ser investigado con mayor profundidad. En este contexto, se destaca la necesidad de llevar a cabo análisis con enfoques

filogenómicos y un muestreo extenso con el fin de resolver la clasificación de este grupo de anfibios.

En conjunto, los resultados de este trabajo proporcionan un aporte significativo y contribuyen a la comprensión de las relaciones filogenéticas del género. La inclusión de cuatro de las cinco especies descritas, junto con una amplia cobertura geográfica, convierte a esta filogenia molecular en la más completa realizada hasta la fecha. Además, sus resultados son consistentes con los hallazgos de Rabanal (2005), el estudio más exhaustivo basado en evidencia morfológica hasta ahora, lo que refuerza las conclusiones aquí planteadas y aporta una base para futuras revisiones taxonómicas del grupo.

LITERATURA CITADA

- BARRIO, A. 1967a. *Batrachyla antartandica* n. sp. (Anura: Leptodactylidae). Descripción y estudio comparativo con la especie genotípica, *B. leptopus* Bell. *Physis* 27(74):101-109.
- BASSO, N. 1994. Una nueva especie de *Batrachyla* (Anura: Leptodactylidae: Telmatobiinae) de Argentina. Relaciones filogenéticas interespecíficas. *Cuadernos de Herpetología* 8(1):51-56.
- BASSO, N., ÚBEDA, C., BUNGE, M. & MARTINAZZO, L. 2011. A new genus of neobatrachian frog from southern Patagonian forests, Argentina and Chile. *Zootaxa* 3002:31-44.
- CEI, J.M. 1962. *Batrachios de Chile*. Ediciones Universidad de Chile, Santiago. cviii + 128 pp.
- CEI, J.M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano*, N.S. Monografía 2. Italian Journal of Zoology. 312 pp.
- CHARRIER, A. 2019. *Guía de Campo Anfibios de los Bosques de la Zona Centro Sur y Patagonia de Chile*. Ed. Corporación Chilena de la Madera, Chile. 153 pp.
- CISTERNAS, I. 2022. Filogeografía de *Batrachyla taeniata* (Girard, 1855) e influencia del paisaje sobre la estructura genética de sus poblaciones. Tesis de Grado. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- COLLINS, J.P. & STORFER, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity Distributions* 9(2):89–98.
- CORREA, C., VELOSO, A., ITURRA, P. & MÉNDEZ, M.A. 2006. Phylogenetic relationships of Chilean leptodactylids: a molecular approach based on mitochondrial genes 12S and 16S. *Revista Chilena de Historia Natural* 79:435-450.
- CORREA, C., CISTERNAS, J., VELÁSQUEZ, N. & LOBOS, G. 2014. Distribution extension, new records and historical occurrence of *Batrachyla taeniata* (Girard, 1854) (Anura: Batrachylidae) in Chile. *Herpetology Notes* 7:703-706.

- CORREA, C. 2022. Lista viva de las especies de anfibios de Chile (Versión 2022.1). Ediciones de la Asociación Red Chilena de Herpetología, RECH. [www.herpetologiadechile.cl]. Revisado: 9 junio 2024.
- CUEVAS, C.C. & CIFUENTES, S.L. 2010. Amphibia, Anura, Ceratophryidae, *Batrachyla leptopus* Bell, 1843: New records updating and geographic distribution map, Chile. Check List 6(4):633-636.
- DÍAZ-PÁEZ, H., WILLIAMS, C. & GRIFFITHS, R. 2002. Diversidad y abundancia de anfibios en el Parque Nacional Laguna San Rafael (XI Región, Chile). Boletín del Museo Nacional de Historia Natural. 51:133-145.
- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32(5):1792–1797.
- FORMAS, J.R. 1979. La herpetofauna de los bosques temperados de Sudamérica. En: The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution, and Dispersal (Ed. Duellman, W.E.), pp. 341-379. Museum of Natural History, University of Kansas, Monograph 7, Lawrence, Kansas. 485 pp.
- FORMAS, J.R. 1997. A new species of *Batrachyla* (Anura: Leptodactylidae) from southern Chile. Herpetologica 53(1):6-13.
- FROST, D.R. 2024. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.1. Electronic database accessible at American Museum of Natural History. American Museum of Natural History, New York. [<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>]. Revisado: 10 junio 2024.
- GAMBLE, T., BERENDZEN, P., BRADLEY, H., STARKEY, D. & SIMONS, A. 2008. Species Limits and Phylogeography of North American Cricket Frogs (*Acris*: Hylidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 48(1):112–125.
- GARDNER, T. 2001. Declining amphibian populations: a global phenomenon in conservation biology. Animal Biodiversity and Conservation 24.2:25–44.
- GARRIDO, O., PUGÍN, E. & JORQUERA, B. 1989. Sperm morphology of *Batrachyla* (Anura: Leptodactylidae). Amphibia-Reptilia 10:141-149.
- GOEBEL, A. M., DONNELLY, J. M. & ATZ, M. E. 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11(1):163–199.
- GONZÁLEZ, N., ARÁNGUIZ, T., RODRÍGUEZ, R. & BARRIENTOS, M. 2015. Catastro de anfibios en el Parque Nacional Bernardo O'Higgins, Región de Magallanes y Antártica Chilena. *Biodiversidata* 3:87-90.
- HOULAHAN, J.E., FINDLAY, C.S., SCHMIDT, B.R., MEYER, A.H. & KUZMIN, S.L. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404:752–755.
- IUCN. 2024. *The IUCN Red List of Threatened Species – Spatial Data Download*. Version 2024-2. Datos espaciales de *Batrachyla taeniata*, *B. leptopus*, *B. antartandica* y *B. nibaldoi*. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/resources/spatial-data-download>
- JETZ, W. & PYRON, R.A. 2018. The interplay of past diversification and evolutionary isolation with present imperilment across the amphibian tree of life. *Nature Ecology & Evolution* 2(5):850–858.
- KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F.X. & WILSON, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 86(16):6196–6200.
- 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. Ministerio del Medio Ambiente, Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y Red Chilena de Herpetología. Santiago. 104 pp.
- LYNCH, J.D. 1971. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptodactyloid frogs. University of Kansas, Lawrence. 238 pp.
- LYNCH, J.D. 1972. Generic partitioning of the South American leptodactyloid frog genus *Eupsophus* Fitzinger, 1843 (*sensu lato*). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 71: 2–11.

- LYNCH, J. D. 1978. A re-assessment of the Telmatobinae leptodactylid frogs of Patagonia. Occasional Papers, Museum of Natural History, University of Kansas 72:1-57.
- NUÑEZ, J.J., SUÁREZ-VILLOTA, E.Y., QUERCIA, C.A., OLIVARES, A.P. & SITES, J.W. 2020. Phylogeographic analysis and species distribution modelling of the wood frog *Batrachyla leptopus* (Batrachylidae) reveal interglacial diversification in south western Patagonia. PeerJ 8:e9980.
- ORTIZ, J. & DOMÍNGUEZ, E. 2021. Anfibios de las turberas de *Sphagnum* de la región de Aysén, Chile. Cap. 9, pp. 233-237. En: Función y servicios ecosistémicos de las turberas de *Sphagnum* en la región de Aysén (Eds. Domínguez, E. & M.P. Martínez), Colección libros INIA N° 41, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Tamei Aike, Chile. Coyhaique. 344 pp.
- PALUMBI, S.R., MARTIN, A.P., ROMANO, S., McMILLAN, W.O., STICE, L. & GRABOWSKI, G. 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, USA. 44 pp.
- PINCHEIRA-DONOSO, D. & DÍAZ-PÁEZ, H. 2003. *Batrachyla nibaldoi*: Geographic Distribution. Herpetological Review 34:256.
- PORTIK, D.M., STREICHER, J.W. & WIENS, J.J. 2023. Frog phylogeny: A time-calibrated, species-level tree based on hundreds of loci and 5,242 species. Molecular Phylogenetics and Evolution 188:107907.
- PYRON, 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. 2005. Relaciones filogenéticas entre las especies de ranas del género *Batrachyla* (Leptodactylidae) basadas en caracteres morfológicos. Tesis de Grado. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- 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.

- 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.
- SALLABERRY, M., VALENCIA, J. & DÍAZ, N. 1981. Distribución y ambientes de *Batrachyla taeniata* (Girard) en Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural* 38:61-67.
- STIPICIC, G., SIMONETTI-GREZ, G., FORTES, S., MAGALLANES, C. & SIMONETTI, J. 2020. Hallazgo de *Batrachyla antartandica* Barrio 1967 en isla Riesco. *Anales del Instituto de la Patagonia* 48(2):49-51.
- STREICHER, J.W., MILLER, E.C., GUERRERO, P.C., CORREA, C., ORTIZ, J.C., CRAWFORD, A.J., PIE, M.R. & WIENS, J.J. 2018. Evaluating methods for phylogenomic analyses, and a new phylogeny for a major frog clade (Hyloidea) based on 2214 loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 119(1):128–143.
- VAIRA, M., AKMENTINS, M., ATTADEMO, M., BALDO, D., BARRASSO, D., BARRIONUEVO, S., BASSO, N., BLOTTO, B., CAIRO, S., CAJADE, R., CÉSPEDez, J., CORBALÁN, V., CHILOTE, P., DURÉ, M., FALCIONE, C., FERRARO, D., GUTIÉRREZ, F.R., INGARAMO, M.R., JUNGES, C., LAJMANOVICH, R., LESCOANO, J.N., MARANGONI, F., MARTINAZZO, L., MARTI, R., MORENO, L., NATALE, G.S., PÉREZ IGLESIAS, J.M., PELTZER, P., QUIROGA, L., ROSSET, S., SANABRIA, E., SANCHEZ, L., SCHAEFER, E., ÚBEDA, C. & ZARACHO, V. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26(1):131-159.