



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Reevaluación taxonómica de *Batrachyla nibaldoi*: integración de datos
moleculares y morfológicos para evaluar su sinonimia con *Batrachyla*
taeniata

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

Marco Antonio Melo Henríquez

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

Dra. Angie Díaz

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, marzo de 2025

AGRADECIMIENTOS

En este fragmento de texto me gustaría hablar de las personas que me han acompañado en este trayecto por mi vida universitaria. En primer lugar, mi familia, quienes me han apoyado de más de una manera del día cero, siempre dispuestos a ayudarme con lo que puedan, son el mejor padre, madre y hermano, y les agradezco de todo corazón. A mis amigas de Temuco, Jeshu y Antonia, por escucharme cada vez que tenía ganas de llorar por algo, por acompañarme y quererme incondicionalmente, las amo con toda mi vida. A mis amigos a la distancia, Catalina, Camila, Bruno, Manne y Vane por demostrarme que no necesito estar cerca de alguien para sentirme acompañado y comprendido, espero pronto poder agradecerles personalmente a todos. A mis amigas universitarias Anastassia, Lefney y Mandy, por apoyarme, impulsarme a ser mejor y hacerme ver lo que valgo cada vez que yo creí que era menos. A los integrantes del LAGA, a la profesora Teresa por recibirme con los brazos abiertos, impulsarme a ser más y enseñarme que soy más importante que “una placa de células”, a Felipe, Jaime y Mayi, por enseñarme con cariño y hacerme ver que soy más que los resultados que obtengo. A todos y cada uno de ustedes les agradezco intensamente, y les aseguro que los llevaré conmigo eternamente en mi corazón.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
INDICE.....	3
INDICE DE FIGURAS	4
INDICE DE TABLAS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCION.....	8
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS.....	13
METODOLOGÍA.....	14
RESULTADOS	22
DISCUSION.....	32
CONCLUSION	36
BIBLIOGRAFIA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Localidades de *B. taeniata* y *B. nibaldoi* incluidas para la red de haplotipos y calcular distancias genéticas.....19

- **Figura 2.** Localidades de *B. nibaldoi* incluidas en los análisis moleculares.....20

- **Figura 3.** Localidades de ejemplares de colección utilizados en los análisis morfológicos.....23

- **Figura 4.** Árbol de consenso de inferencia bayesiana (regla de mayoría del 50%) mostrando las relaciones entre cuatro especies de Batrachyla e Hylorina (grupo externo). La barra debajo del árbol representa las sustituciones esperadas por sitio a lo largo de las ramas.24

- **Figura 5.** Red de haplotipos de las secuencias del citocromo b de *B. taeniata* y *B. nibaldoi* obtenida con el método median-joining. El óvalo celeste indica el primer haplogrupo y el violeta, el segundo.....26

- **Figura 6.** Distribución de las medidas de las patas de *B. nibaldoi*, a la izquierda, y *B. taeniata*, a la derecha. Cada caja del gráfico concentra el 50% central de los datos; el borde inferior y superior de la caja representan el primer y tercer cuartil respectivamente. La línea negra horizontal dentro de la caja representa la mediana de los datos.....29

- **Figura 7.** Distribución de los valores de la distancia hocico-cloaca de *B. nibaldoi*, a la izquierda, y *B. taeniata*, a la derecha. Cada caja del gráfico concentra el 50% central

de los datos; el borde inferior y superior de la caja representan el primer y tercer cuartil respectivamente. La línea negra horizontal dentro de la caja representa la mediana de los datos.....30

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 3.** Localidades de especies incluidas en análisis moleculares.....15
- **Tabla 4.** Localidades y número de muestras utilizadas para construir la red de haplotipos y calcular las distancias genéticas. *Batrachyla leptopus* se utilizó solamente como referencia para estimar el grado de divergencia genética entre especies del género.....18
- **Tabla 3.** Localidades y número de muestras utilizadas para los análisis morfológicos.....22
- **Tabla 4.** Distancias genéticas de Tamura-Nei entre poblaciones del género *Batrachyla* calculadas con el programa MEGA 1127
- **Tabla 5.** ANOVA para el largo de las patas de *B. taeniata* y *B. nibaldoi*.....30
- **Tabla 6.** Distribución de la presencia del tubérculo palmar externo según especie.....32
- **Tabla 7.** Distribución de la presencia del tubérculo metatarsal externo según especie.....32
- **Tabla 8.** Distribución del grosor de la membrana interdigital según especie.....32
- **Tabla 9.** Valores de p de las pruebas de Fisher para cada variable.....33

RESUMEN

El bosque templado del centro-sur de Chile presenta un alto grado de endemismo de anfibios, debido a la formación de barreras geográficas como lo son la cordillera de los Andes. La relevancia de estos bosques es que proveen recursos y servicios ecosistémicos, y, debido a su extracción y explotación, estos ecosistemas han ido menguando a lo largo del tiempo. Esto resulta perjudicial para las especies que habitan en los bosques, particularmente los anfibios, los cuales, debido a su bajo grado de dispersión, se encuentran particularmente restringidos a estos ambientes. Las ranas del género *Batrachyla* son características de estos bosques templados, por lo que los individuos pertenecientes a este género podrían verse afectados por la disminución de su hábitat. Una de las especies de este género, *B. nibaldoi*, se encuentra distribuida fragmentariamente en estos bosques en las regiones de Los Lagos y Aysén. Sin embargo, algunos trabajos permiten poner en duda la existencia de esta especie, debido al parecido que posee con *B. taeniata*, tanto en aspectos morfológicos, ecológicos y etológicos (vocalizaciones). Además, la distribución geográfica de *B. nibaldoi* se encuentra casi completamente contenida dentro de la de *B. taeniata*. En este estudio se realizaron análisis filogenéticos moleculares y morfológicos para determinar si es que ambos taxa nominales corresponden a la misma especie, lo cual es relevante para su conservación, considerando la alteración constante de los ambientes donde habitan. Los estudios moleculares realizados situaron a *B. nibaldoi* dentro del grupo de *B. taeniata*, a la vez que los estudios morfológicos indicaron que no existe una diferencia significativa que permita diferenciarlas entre sí. Este conjunto de resultados apunta a que *B. nibaldoi* es conespecífica con *B. taeniata*.

Palabras clave: Simpatría, sinonimia, haplotipo.

ABSTRACT

The temperate forest of central-southern Chile has a high degree of amphibian endemism, due to the formation of geographic barriers such as the Andes Mountains. The relevance of these forests is that they provide resources and ecosystem services, and, due to their extraction and exploitation, these ecosystems have been diminishing over time. This is detrimental to forest-dwelling species, particularly amphibians, which, due to their low degree of dispersal, are particularly restricted to these environments. Frogs of the genus *Batrachyla* are characteristic of these temperate forests, so individuals belonging to this genus could be affected by the decrease in their habitat. One of the species of this genus, *B. nibaldoi*, is fragmentarily distributed in these forests in the regions of Los Lagos and Aysén. However, some studies cast doubt on the existence of this species, due to its resemblance to *B. taeniata*, both in morphological, ecological and ethological aspects (vocalizations). In addition, the geographic distribution of *B. nibaldoi* is completely contained within that of *B. taeniata*. In this study, molecular and morphological phylogenetic analyses were carried out to determine if both nominal taxa correspond to the same species, which is relevant for their conservation, considering the constant alteration of the environments they inhabit. The molecular studies carried out placed *B. nibaldoi* within the group of *B. taeniata*, while the morphological studies indicated that there is no significant difference between them. These results suggest that *B. nibaldoi* is conspecific with *B. taeniata*.

Key words: Sympatry, synonymy, haplotype.

Introducción

Los bosques templados del sur de Sudamérica se distribuyen entre los 35° y 55° S, en el centro-sur de Chile (Armesto *et al.* 1998) y marginalmente en Argentina. Estos bosques presentan una gran relevancia para el ser humano, en términos de los recursos, servicios y energía que proveen (Celis-Diez, *et al.* 2011). Por esto la superficie de estos bosques se ha ido reduciendo con el paso de los años, debido a la expansión de plantaciones comerciales y la tala producida por la extracción de madera para suplir la demanda global creciente de este recurso (Echeverría, *et al.* 2006). Esto constituye una creciente amenaza para las especies que habitan estos bosques. Una de las principales características de estos bosques es el alto grado de endemismo que se genera en ellos, como consecuencia del aislamiento geográfico, principalmente el levantamiento de la Cordillera de los Andes (Celis-Diez, *et al.* 2011). Debido a esta creciente deforestación de la región y por la exclusividad de sus especies, los bosques templados húmedos de Sudamérica están entre los ecosistemas con mayor necesidad de conservación (Armesto, *et al.* 1992).

Entre los vertebrados que es posible encontrar en estos bosques destacan los anfibios, los cuales poseen una importante cantidad de especies, géneros e incluso familias endémicas de estos ecosistemas, debido probablemente a su limitada capacidad de dispersión (Celis-Diez, *et al.* 2011, Rodríguez *et al.* 2022). Sin embargo, estos organismos se encuentran amenazados principalmente por la susceptibilidad a los cambios ambientales, dependencia al agua, sensibilidad a la contaminación, productos químicos y radiación UV, enfermedades emergentes, la vulnerabilidad a la perturbación de sus hábitats y a otros factores relacionados con el cambio climático (Lobos *et al.* 2013).

El género *Batrachyla* (Anura, Batrachylidae) se distribuye principalmente, aunque no exclusivamente, en los bosques templados de *Nothofagus* de la zona sur de Chile y Argentina (Basso, 1994). Este género incluye actualmente cinco especies, *Batrachyla antartandica*, *Batrachyla leptopus* y *Batrachyla taeniata*, compartidas entre los dos países, *Batrachyla fitzroya*, endémica de Argentina, y por último *Batrachyla nibaldoi*, una especie descrita únicamente para Chile (Rabanal 2010).

Batrachyla nibaldoi, también denominada rana de antifaz de Bahía Murta, fue descrita por Formas (1997). Esta especie se puede distinguir de las otras especies del género por una distancia hocico-cloaca de 35,4-40,8 mm, dedos delgados con puntas moderadamente puntiagudas, tubérculos metatarsales externos ausentes, articulación tibiotarsal del miembro posterior alcanzando el borde posterior del tímpano al estirar la pata junto al cuerpo y membranas interdigitales de los pies reducidas, delgadas y transparentes. Sin embargo, *Batrachyla nibaldoi* es muy similar a otra especie del mismo género, *B. taeniata*, ya que según la descripción realizada por Formas (1997) estas solo difieren en características externas: *B. taeniata* tendría tubérculos metatarsales externos y tubérculos palmares externos presentes (en contraste a *B. nibaldoi* que los tendría ausentes y rudimentarios, respectivamente), dedos más gruesos con puntas más redondeadas, membranas interdigitales más gruesas y opacas, y patas traseras más largas.

La distribución geográfica de *Batrachyla nibaldoi* conocida hasta ahora es fragmentaria. Originalmente, fue descrita por Formas (1997) en el Puente Traihuanca, 190 km al sur de Coihaique, Provincia General Carrera, Región de Aysén. Posteriormente, se amplió varias veces su distribución: se reportó en el Parque Nacional Laguna San Rafael (Díaz-Páez *et al.* 2002), en la isla Kent (Díaz-Páez & Carreño 2002), en la isla Alao, Región de Los Lagos (Pincheira-Donoso & Díaz-Páez 2003), y a un kilómetro al norte de Villa O'Higgins (Rabanal 2010), lo cual implicó ampliaciones de 360 km al noroeste y de 240 km al sur de la localidad tipo. Posteriormente, González *et al.* (2015) reportó la presencia de la especie en el fiordo Témpanos, situada a unos 108 km al suroeste de Villa O'Higgins, el cual sería su límite sur actual. Estas dos últimas ampliaciones son las únicas publicaciones sobre la especie en los últimos 15 años.

La distribución descrita para *B. nibaldoi* implica que se solapa completamente con la distribución de *B. taeniata*, la cual es mucho más amplia y se extiende desde Zapallar en la Región de Valparaíso hasta el Río Mosco en la Región de Aysén, además de incluir el archipiélago de Chiloé e isla Mocha (Celis-Diez, *et al.* 2011, Charrier 2019). Sin embargo, se conocen unas pocas poblaciones aisladas de *B. taeniata* al norte del río Biobío, por lo que se asume que su distribución es fragmentada entre Zapallar y Concepción (Correa *et al.*

2014).

Charrier (2019) menciona que *B. nibaldoi* habita en la misma área geográfica que otras especies del mismo género, como *B. antartandica* en el Puente Traihuanca y la Reserva Nacional Las Guaitecas, y en la Laguna San Rafael con *B. antartandica*. Sin embargo, el solapamiento de las distribuciones de *B. nibaldoi* y *B. taeniata* en toda la extensión de la distribución de *B. nibaldoi* implica la simpatria entre ambas especies, pero hasta ahora solo se ha reportado su coexistencia en dos localidades de la Laguna San Rafael (Díaz- Páez, *et al.* 2002).

En el trabajo de Díaz-Páez *et al.* (2002), además, se comenta que las características de las poblaciones de *B. nibaldoi* de la Laguna San Rafael concuerdan con descripciones fenotípicas realizadas previamente para ejemplares de *B. taeniata* que habitan en la provincia de Aysén y que las vocalizaciones de ambas especies no permiten diferenciarlas, poniendo en duda la validez taxonómica de *B. nibaldoi*.

Como se expuso con anterioridad, la descripción *B. nibaldoi* por Formas (1997) fue realizada únicamente considerando caracteres morfológicos y osteológicos. En este contexto, estudios moleculares permitirían obtener más información en cuanto a las relaciones filogenéticas y la taxonomía de esta especie, pero hasta ahora no se ha incluido en ningún estudio filogenético molecular, lo cual resulta relevante, considerando que una especie definida con una perspectiva holística constituye una hipótesis más robusta (Benítez 2019).

En síntesis, considerando la alta similitud morfológica entre *Batrachyla nibaldoi* y *B. taeniata* (Formas 1997), que las vocalizaciones de estas dos especies son prácticamente indistinguibles (Díaz- Páez *et al.* 2002) y el extenso solapamiento de distribuciones que presentan ambas especies (Correa *et al.* 2014), en este proyecto se plantea la hipótesis de que *B. nibaldoi* corresponde a la misma especie que *B. taeniata*. Para someter a prueba esta hipótesis se realizó una reconstrucción filogenética molecular y se compararon genéticamente poblaciones de *B. taeniata* con ejemplares de la localidad tipo de *B. nibaldoi* (Puente Traihuanca). Además, se comparó la morfología externa (los principales caracteres

diagnósticos) de ejemplares de la localidad tipo de *B. nibaldoi* con ejemplares de varias poblaciones de *B. taeniata*.

HIPÓTESIS

Planteamiento de la hipótesis:

Actualmente se desconocen muchos aspectos sobre *Batrachyla nibaldoi*, como por ejemplo, sus relaciones filogenéticas con las otras especies del género. Debido a esto y considerando los antecedentes expuestos con anterioridad (la alta similitud morfológica y en las vocalizaciones entre esta especie y *B. taeniata* y que la distribución geográfica de *B. nibaldoi* se encuentra completamente dentro del rango de extensión de *B. taeniata*), resulta relevante dilucidar si la especie denominada ranita de antifaz de Bahía Murta corresponde en realidad a poblaciones de la ranita de antifaz.

Hipótesis:

Batrachyla nibaldoi y *Batrachyla taeniata* corresponden a la misma especie.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la posible sinonimia de *B. nibaldoi* con *B. taeniata*.

Objetivos específicos

1. Reconstruir las relaciones filogenéticas entre las cuatro especies del género *Batrachyla* presentes en Chile.
2. Establecer la afinidad genética entre poblaciones de *B. taeniata* y *B. nibaldoi*.
3. Comparar la morfología externa de *B. taeniata* y *B. nibaldoi*, con énfasis en los caracteres diagnósticos de esta última especie.

METODOLOGÍA

Extracción de ADN y PCR

Se obtuvieron tejidos de cuatro especies del género *Batrachyla* para extraer ADN (*B. nibaldoi*, *B. taeniata*, *B. leptopus* y *B. antartandica*). Para los análisis filogenéticos se incluyeron cinco o seis ejemplares de cada especie (uno por localidad), a excepción de *B. nibaldoi*, debido a que solo se dispuso de dos ejemplares de la localidad tipo (Puente Traihuanca, Región de Aysén) y uno de 2 km al sur de esta localidad (Tabla 1). En el caso de las otras tres especies, se incluyeron especímenes de distintas localidades de Chile, abarcando gran parte de su rango de distribución. Para la comparación genética de *B. nibaldoi* y *B. taeniata*, se incluyeron muestras de esta última especie de la mayor parte de su distribución geográfica.

<i>Especie</i>	<i>Localidad</i>
<i>Hylorina sylvatica</i>	Lagunas Gemelas
<i>Batrachyla antartandica</i>	Río Huenteleufú
<i>Batrachyla antartandica</i>	Arroyo Puente Roto
<i>Batrachyla antartandica</i>	La Arena
<i>Batrachyla antartandica</i>	Anay (Chiloé)
<i>Batrachyla antartandica</i>	Puerto Edén (ca. antenna)
<i>Batrachyla leptopus</i>	Puringue
<i>Batrachyla leptopus</i>	Río Huenteleufú
<i>Batrachyla leptopus</i>	Senda Darwin
<i>Batrachyla leptopus</i>	Cushamen, Lago Puelo (Chubut)
<i>Batrachyla leptopus</i>	Parque Cucao
<i>Batrachyla nibaldoi</i>	Puente Traihuanca
<i>Batrachyla nibaldoi</i>	2 km al sur del Puente Traihuanca
<i>Batrachyla taeniata</i>	Bosque las petras, Quintero
<i>Batrachyla taeniata</i>	Ucúquer
<i>Batrachyla taeniata</i>	Junquillar
<i>Batrachyla taeniata</i>	Río Pillanleufú (Puerto Maihue)
<i>Batrachyla taeniata</i>	Pauldeo
<i>Batrachyla taeniata</i>	Río Mosco
<i>Batrachyla taeniata</i>	Pantano La Barra

Tabla 1. Localidades por especie incluidas en los análisis moleculares.

En el caso de los ejemplares recolectados y de colección, el ADN fue extraído de tejidos preservados en alcohol, específicamente de lengua (para adultos y juveniles) y de musculatura de la cola (en larvas de *B. antartandica*). Además, se utilizaron muestras de mucosa oral obtenidas con tómulas Copan 516CS01 (secadas inmediatamente con sílica gel) de individuos que fueron liberados en el sitio de captura.

Las muestras de ADN fueron obtenidas con el kit Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN mitocondrial que se amplificaron fueron: 12S con los partidores H1478 (5'-TGACT GCAGA GGGTG ACGGG CGGTG TGT-3') y L1091 (5'-AAAAA GCTTC AACT GGGAT TAGAT ACCCC ACTAT-3'), 16S con los partidores 16Sbr-H (5'-CCGGT CTGAA CTCAG ATCAC GT-3') y 16Sar-L (5'-CGCCT GTTTA TCAAA AACAT-3'), y el fragmento intermedio entre los dos genes anteriores, con los partidores 1216H (TGATTACGCTACCTTYGCACGGT) y 1216LN (CCAAYACGTCAGGTCAAGGTG). Además, se amplificó un fragmento del citocromo b (cytb) con los partidores MVZ15-L (GAACTAATGGCCACACWWTACGNAA) y CytbAR-H (TAWAAGGGTCTTCTACTGGTTG). Para los PCRs de todos esos fragmentos se utilizó el siguiente programa: denaturación inicial a 94°C por 60 segundos, denaturación a 94°C por 40 segundos, annealing a 52°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 50 segundos, todo esto repetido durante 40 ciclos. Para la extensión final se sometieron las muestras a 72°C durante 10 minutos, para finalmente aplicar reposo a 10°C.

Los productos de PCR fueron chequeados por electroforesis en geles de agarosa (1,5%). Posteriormente, las muestras fueron enviadas a secuenciar en ambas direcciones en la empresa MacroGen Inc.

Análisis filogenéticos y genéticos

Las secuencias de ADN de cada individuo fueron editadas con el programa BioEdit v.7.1. Para realizar el alineamiento múltiple de las secuencias editadas se utilizó el programa MUSCLE, incluido en el programa MEGA 11 (Kumar *et al.* 2018).

Se realizó un análisis filogenético con el método de inferencia bayesiana con el programa MrBayes v3.2.7a (Ronquist *et al.* 2012), siguiendo las especificaciones de von Tschirnhaus & Correa (2021), para reconstruir las relaciones entre las cuatro especies de *Batrachyla*. Como grupo externo, se incluyó un ejemplar de *Hylorina sylvatica*, único representante del género hermano de *Batrachyla* (según la hipótesis filogenética de Basso *et al.* 2011). El modelo de substitución nucleotídica de cada fragmento génico para este análisis se seleccionó con el programa jModelTest v2.1.10 (Darriba *et al.* 2012). Para este análisis se incluyeron en total 20 ejemplares (Tabla 1), con información de los genes mitocondriales cytb, 12S, 16S y tARN de valina (el cual se ubica entre los dos anteriores). Para el análisis, los dos fragmentos (cytb y 12S-16S) fueron concatenados.

Además, las relaciones genealógicas entre los ejemplares de *B. nibaldoi*, con respecto a las poblaciones de *B. taeniata*, se analizaron por medio de una red de haplotipos con el gen citocromo b. Los haplotipos se obtuvieron con el programa DnaSP v6.12.03 (Rozas *et al.* 2017) y la red se construyó con las secuencias utilizando el método median-joining con el programa PopART v1.7 (Leigh & Bryant 2015). En este análisis se incluyeron ejemplares de siete localidades (Tabla 2): para *B. nibaldoi* se incluyeron dos procedentes del puente Traihuanca y uno proveniente de una zona cercana 2 kilómetros al sur (Figura 2), mientras que para *B. taeniata* se incluyeron especímenes provenientes de río Mosco, el río Pillanleufú, Pauldeo, pantano La Barra, Quintero y Ucúquer (Figura 1). Para la interpretación de las distancias genéticas obtenidas a partir de las secuencias del gen mitocondrial cytb, se utilizaron valores de referencia basados en estudios comparativos realizados en anfibios y otros vertebrados. De esta manera, los valores de distancia genética inferiores al 0,01 corresponden a individuos con haplotipos idénticos o a poblaciones muy próximas dentro de una misma especie. Valores entre 0,01 y 0,03 reflejan divergencia entre poblaciones geográficamente separadas. Distancias entre 0,03 y 0,1 se consideran indicativas de linajes divergentes, mientras que valores superiores a 0,1 pueden reflejar relaciones más distantes, en este caso especies diferentes, según el contexto taxonómico (Fouquet *et al.* 2007, Kartavtsev & Lee 2006, Koroiva & Santana 2022). Este análisis incluyó muestras de *B. nibaldoi* recolectadas en el Puente Traihuanca y muestras de *B. taeniata* de zonas cercanas a esta localidad y del extremo norte de su distribución (Quintero y Ucúquer) (Tabla 2).

Igualmente se incorporó una muestra de *Batrachyla leptopus* proveniente de Puringue, para comparar con los valores de distancia genética entre dos especies totalmente diferentes.

Especie	Localidad	Muestras
<i>B. taeniata</i>	Quintero	1
<i>B. taeniata</i>	Ucúquer	1
<i>B. taeniata</i>	Pantano La Barra	2
<i>B. taeniata</i>	Río Pillanleufú	1
<i>B. taeniata</i>	Pauldeo	1
<i>B. nibaldi</i>	Puente Traihuanca	2
<i>B. nibaldi</i>	2 km al sur del puente Traihuanca	1
<i>B. taeniata</i>	Río Mosco	1
<i>B. leptopus</i>	Puringue	1

Tabla 2. Localidades y número de muestras utilizadas para construir la red de haplotipos y calcular las distancias genéticas. *Batrachyla leptopus* se utilizó solamente como referencia para estimar el grado de divergencia genética entre especies del género.

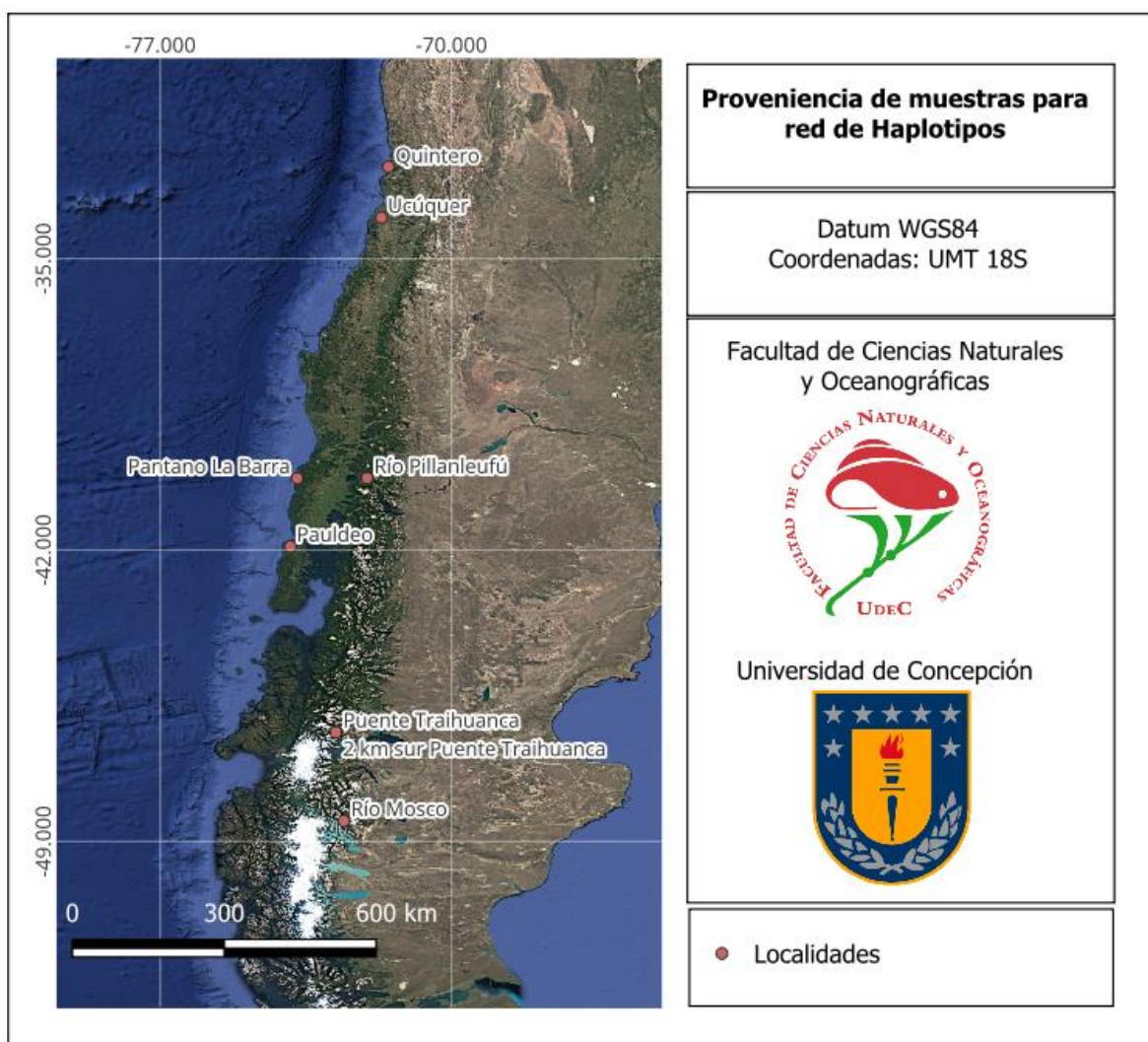


Figura 1. Localidades de *Batrachyla taeniata* y *B. nivaldoi* incluidas para construir la red de haplotipos y calcular las distancias genéticas.

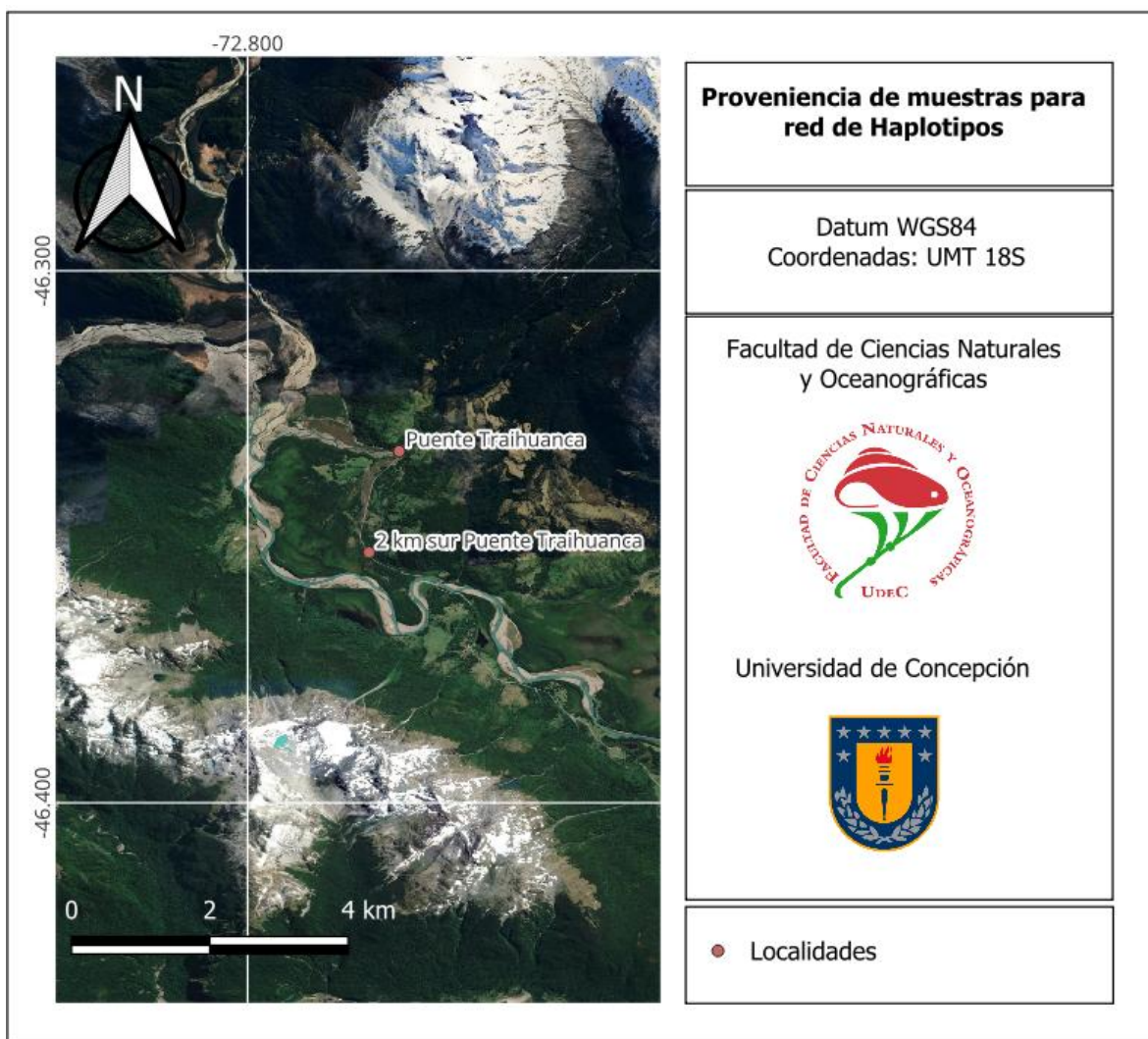


Figura 2. Localidades de *Batrachyla nibaldoi* incluidas en los análisis moleculares.

Análisis morfológicos

Se examinó y comparó la morfología externa de *B. nibaldoi* y *B. taeniata*, específicamente los caracteres que se incluyeron en la diagnosis de *B. nibaldoi*. Para estos análisis, se contó con solo tres ejemplares de *B. nibaldoi* de la localidad tipo, fijados en etanol absoluto, que se encuentran actualmente en el laboratorio de Sistemática y Conservación de Herpetozoos de la Universidad de Concepción. En cuanto a *B. taeniata*, se utilizaron ejemplares depositados en el Museo de Zoología del Departamento de Zoología de la Universidad de Concepción. Se revisaron en total 95 ejemplares, 92 de *B. taeniata* y los tres de *B. nibaldoi*.

Los caracteres evaluados fueron los utilizados para diferenciar a las dos especies: distancia hocico-cloaca, tubérculos metatarsal y palmar externo, largo de las patas, características de los dedos y de las membranas interdigitales. Los caracteres de las patas fueron examinados con una lupa estereoscópica, mientras que las medidas cuantitativas fueron tomadas con un pie de metro digital (0,01 mm de precisión).

Primero se examinó si existen diferencias en el largo de la pata entre las dos especies, para lo cual se realizó un análisis de varianza o ANOVA con el software R (R Core Team 2025). Para este análisis se midió independientemente el largo de muslo, tibia, tarso y pie, y luego se siguieron las especificaciones de Watters *et al.* (2016) para reconstruir el largo de la pata. Previamente, se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para evaluar la distribución de los datos y una prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas.

Segundo, se evaluó si existen diferencias significativas en el tamaño corporal (distancia hocico-cloaca) entre las especies. Para ello se evaluó primero la homogeneidad de varianzas con una prueba de Levene, seguido de una prueba normalidad de Shapiro-Wilk, la cual no se cumplió en el caso *B. taeniata*, por lo que se optó por una transformación logarítmica de los datos. Al evaluar nuevamente la normalidad se vio que esta no mejoró para *B. taeniata*, por lo que se optó por utilizar una prueba no paramétrica, que en este caso fue un ANOVA de Kruskal-Wallis realizado en el software R (R Core Team 2025).

Finalmente, se analizó si hay diferencias consistentes en las variables cualitativas de presencia o ausencia del tubérculo palmar externo y el tubérculo metatarsal externo, forma de los dedos de las patas y características de las membranas interdigitales entre las especies. En el caso de los tubérculos, fueron clasificados en base a su presencia/ausencia, agregando una categoría en el caso de que se viera una estructura rudimentaria, como la presencia de una mancha o una protuberancia incolora. De igual manera la categoría de indeterminada indica ejemplares juveniles que no demostraban un desarrollo completo. Para las membranas interdigitales se utilizaron categorías de presencia/ausencia e indeterminable para la reducción de la membrana, mientras tanto que para la transparencia o también interpretada como “grosor” de la membrana se utilizaron las categorías de más gruesa, opaca (indicando que la membrana no es tan gruesa, pero si pigmentada), transparente e indeterminable. Para

ello se obtuvieron tablas de contingencia, a las cuales se aplicaron pruebas de aleatorización de Fisher para evaluar la asociación entre las variables, teniendo en cuenta el desbalance de las muestras.

Especie	Localidad	Muestras
<i>B. nibaldoi</i>	Puente Traihuanca	3
<i>B. taeniata</i>	Quintero	17
<i>B. taeniata</i>	Concepción, Las escaleras	2
<i>B. taeniata</i>	Concepción, Estación Biológica de Hualpén	19
<i>B. taeniata</i>	Provincia de Arauco, sector La Cal	5
<i>B. taeniata</i>	Malleco, Collipulli	1
<i>B. taeniata</i>	Provincia de Valdivia	3
<i>B. taeniata</i>	Puerto Montt, Las Quemadas	8
<i>B. taeniata</i>	Llanquihue, Puente Los Palos	33
<i>B. taeniata</i>	Caleta Tortel	1
<i>B. taeniata</i>	Aysén, Bahía Eugenia	2
<i>B. taeniata</i>	Río Mosco	1

Tabla 3. Localidades y número de muestras utilizadas para los análisis morfológicos.

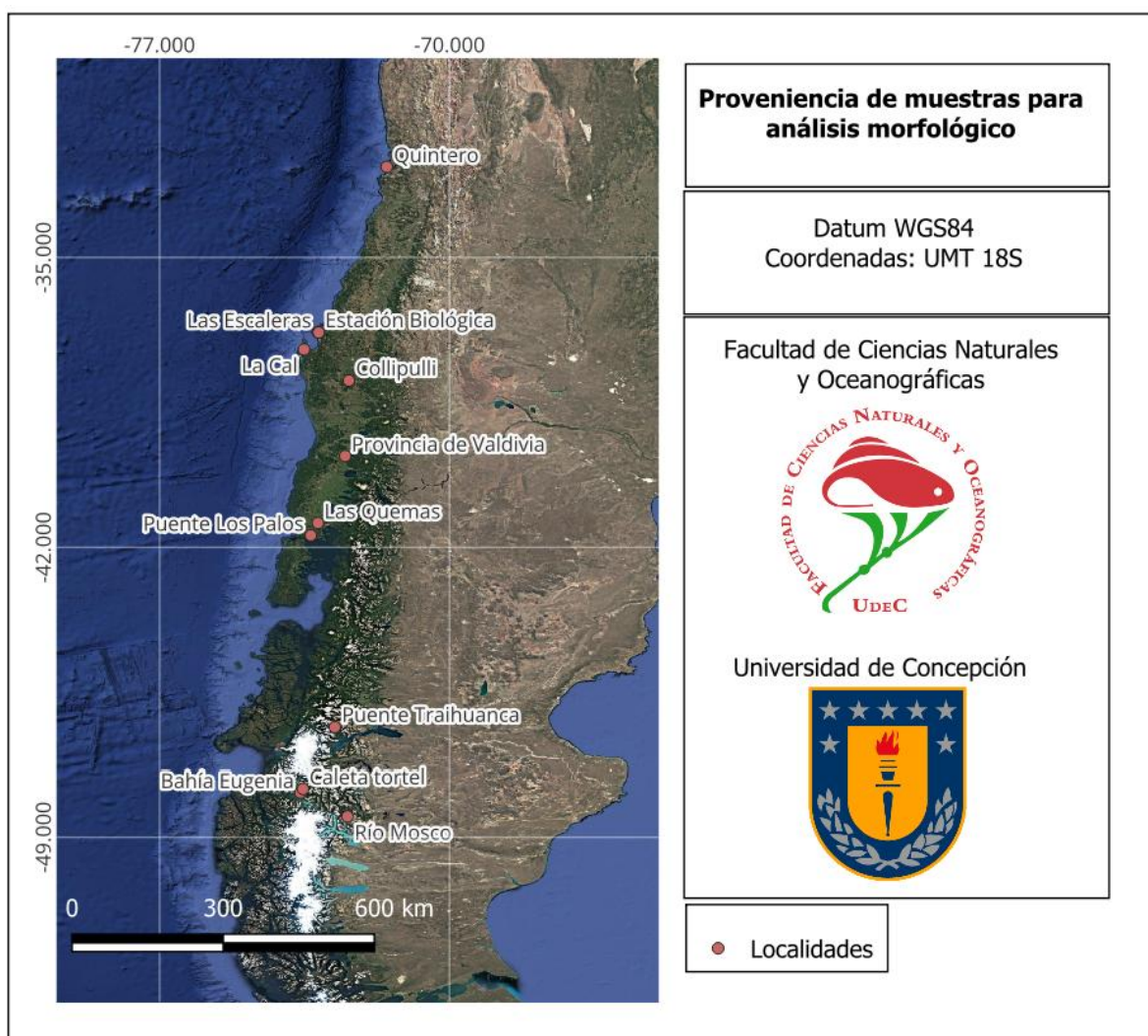


Figura 3. Localidades de los ejemplares de colección utilizados en los análisis morfológicos.

RESULTADOS

Análisis moleculares

Análisis filogenético

La Figura 4 muestra la hipótesis filogenética obtenida con el método de inferencia bayesiana, concatenando el fragmento que incluye los genes 12S, 16S y el tRNA_{Val} intermedio y el citocromo b.

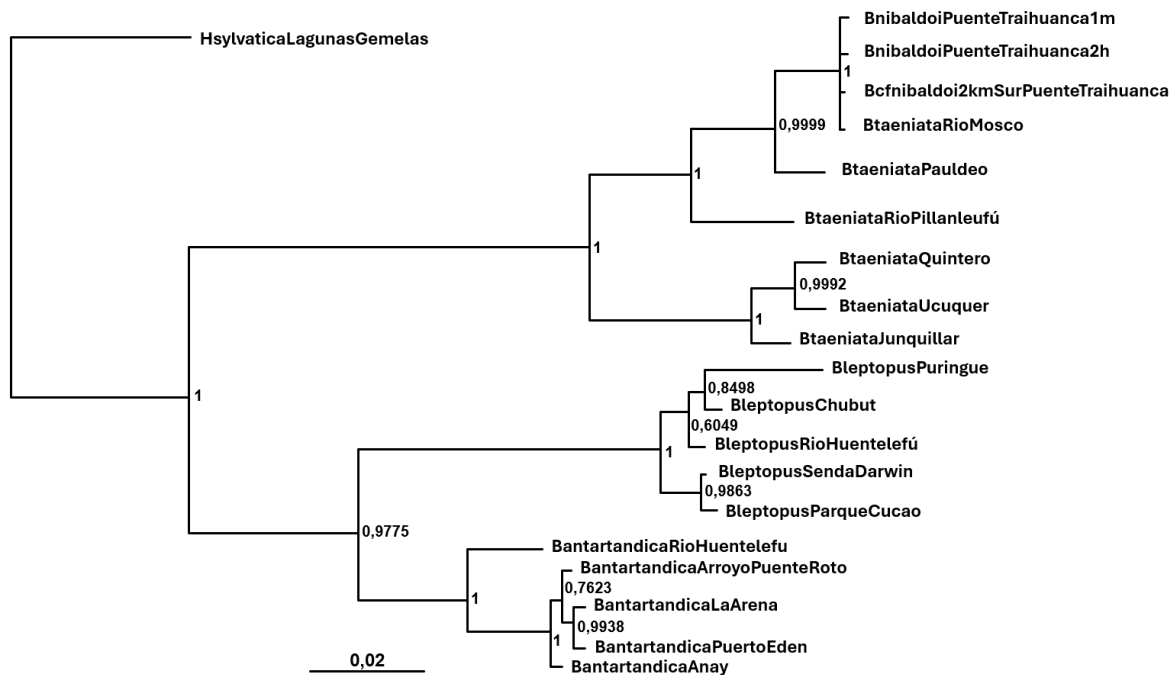


Figura 4. Árbol de consenso de inferencia bayesiana (regla de mayoría del 50%) mostrando las relaciones entre cuatro especies de *Batrachyla* e *Hylorina* (grupo externo). La barra debajo del árbol representa las sustituciones esperadas por sitio a lo largo de las ramas.

En el árbol de la Figura 4 se observa que las cuatro especies de *Batrachyla* forman un clado bien sustentado (probabilidad posterior, pp = 1), que a su vez se subdivide en dos clados con

probabilidad posterior alta: *B. taeniata*, incluyendo a *B. nibaldoi* (pp = 1), y *B. leptopus* + *B. antartandica* (pp = 0,98).

Dentro del clado que incluye a *B. taeniata* y *B. nibaldoi* se pueden apreciar dos agrupaciones, que indican una alta divergencia dentro de *B. taeniata*, asociada a distintas zonas geográficas de su distribución. Uno de estos clados contempla las muestras de la zona norte de su distribución, entre las regiones de Valparaíso y Biobío (Quintero, Ucúquer y Junquillar),

mientras que el otro incluye aquellas de la zona sur, entre las regiones de Los Ríos y Aysén (río Pillanleufú, Pauldeo y río Mosco). Sin embargo, los ejemplares de *B. nibaldoi* (Puente Traihuanca y 2 km al sur de esta localidad) se encuentran dentro del grupo de *B. taeniata* de la zona sur, relacionándose estrechamente (pp = 1) con el ejemplar de río Mosco (límite sur de la distribución de *B. taeniata*). Esto significa que, a diferencia de *B. leptopus* y *B. antartandica*, *B. taeniata* y *B. nibaldoi* no presentan una relación de monofilia recíproca con el ADN mitocondrial (es decir, *B. taeniata* es parafilética con respecto a *B. nibaldoi*).

Red de haplotipos

Entre las siete secuencias de citocromo b de *B. taeniata* (seis localidades) y las tres de *B. nibaldoi* (dos localidades) (Tabla 2), se obtuvieron ocho haplotipos.

Los ocho haplotipos forman dos haplogrupos, separados por 39 pasos mutacionales (Figura 5). El primero está conformado por los haplotipos 5 y 6, que corresponden a las muestras de la zona norte de la distribución de *B. taeniata*, Quintero y Ucúquer (en este análisis no se pudo incluir el ejemplar de Junquillar).

El segundo haplogrupo está formado por los seis haplotipos restantes, que corresponden a los ejemplares de *B. taeniata* de la zona sur de su distribución (río Pillanleufú, Pantano La Barra, Pauldeo y río Mosco) y a los de *B. nibaldoi* (Puente Traihuanca y 2 km al S de Puente Traihuanca). Dentro de este haplogrupo, no hay una separación entre los haplotipos de *B. taeniata* y *B. nibaldoi*, ya que el haplotipo 3 es compartido entre muestras de tres localidades: una de *B. taeniata*, procedente de río Mosco, y dos de *B. nibaldoi*, una del Puente Traihuanca y otra de 2 kilómetros al sur de éste. El otro ejemplar de *B. nibaldoi* de Puente Traihuanca está representado por el haplotipo 4, que se separa por un paso mutacional del haplotipo 3

(Figura 5). La alta divergencia entre los dos haplogrupos y la falta de separación entre los haplotipos de *B. taeniata* y *B. nibaldi* son congruentes con la topología dentro del clado que incluye a estas dos especies en el árbol de inferencia bayesiana (Figura 4).

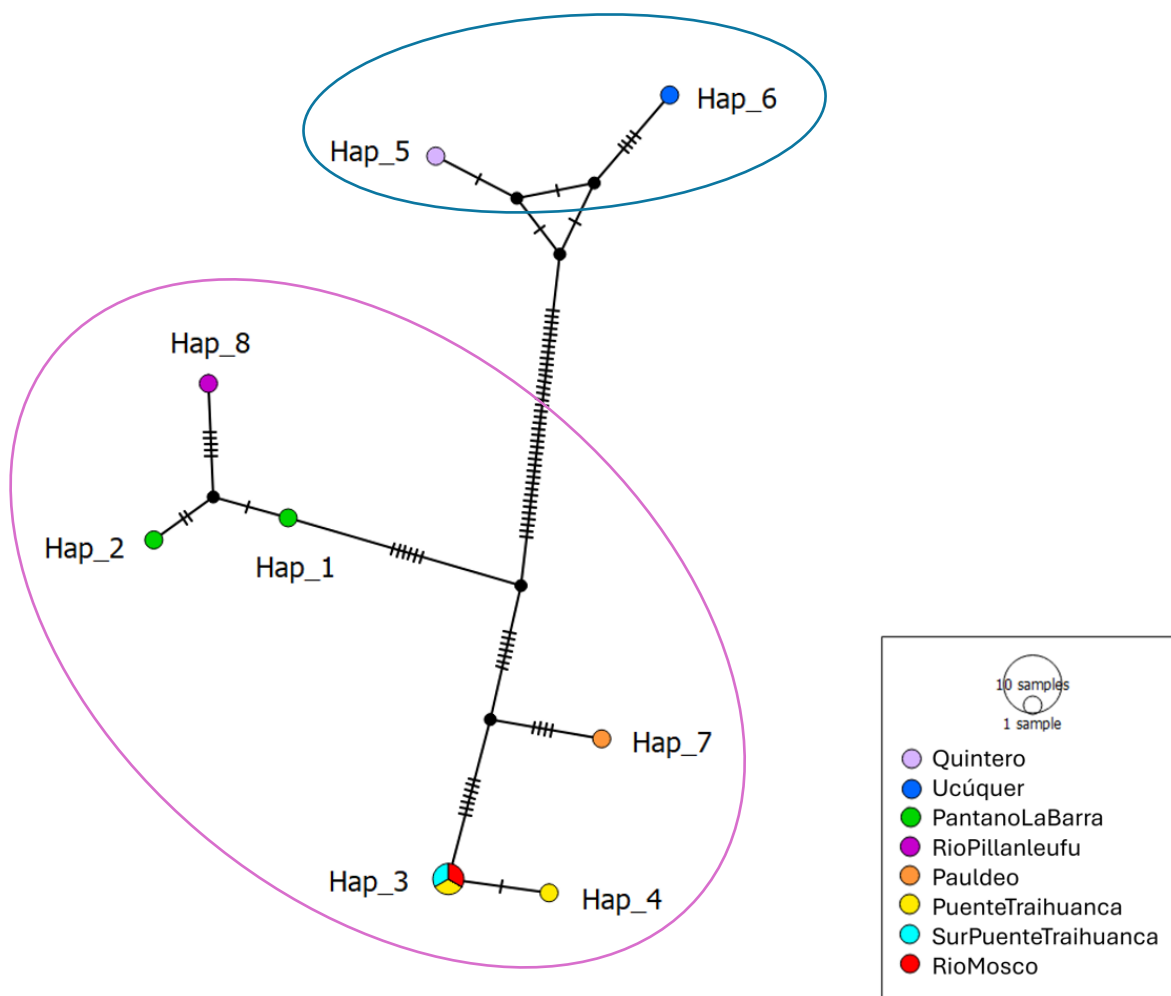


Figura 5. Red de haplotipos de las secuencias del citocromo b de *B. taeniata* y *B. nibaldi* obtenida con el método median-joining. El óvalo celeste indica el primer haplogrupo y el violeta, el segundo.

Divergencia genética

En la Tabla 4 se muestran las distancias de Tamura-Nei entre las poblaciones de *Batrachyla taeniata*, *B. nibaldi* y una población de referencia de *B. leptopus*.

	<i>B. nibaldi</i> (puente Traihuanca 1)	<i>B. nibaldi</i> (puente Traihuanca 2)	<i>B. nibaldi</i> (2km sur puente Traihuanca a)	<i>B. taeniata</i> (río Mosco)	<i>B. taeniata</i> (río Pillanleufú)	<i>B. taeniata</i> (Pauldeo)	<i>B. taeniata</i> (Quintero)	<i>B. taeniata</i> (Ucúquer)
<i>B. nibaldi</i> (puente Traihuanca 2)	0,00113							
<i>B. nibaldi</i> (2km sur puente Traihuanca)	0,00113	0,00000						
<i>B. taeniata</i> (río Mosco)	0,00113	0,00000	0,00000					
<i>B. taeniata</i> (río Pillanleufú)	0,02669	0,02550	0,02550	0,02550				
<i>B. taeniata</i> (Pauldeo)	0,01375	0,01259	0,01259	0,01259	0,02433			
<i>B. taeniata</i> (Quintero)	0,06738	0,06611	0,06611	0,06611	0,06098	0,06231		
<i>B. taeniata</i> (Ucúquer)	0,07124	0,06995	0,06995	0,06995	0,06225	0,06357	0,00683	
<i>B. leptopus</i>	0,23892	0,23715	0,23715	0,23715	0,22191	0,23229	0,21515	0,22026

Tabla 4. Distancias genéticas de Tamura-Nei entre poblaciones del género *Batrachyla* calculadas con el programa MEGA 11.

Los valores de distancia más bajos, entre 0 y ~0,001, se observan entre los tres ejemplares de puente Traihuanca y alrededores (*B. nibaldi*) y el de río Mosco (*B. taeniata*). Las

comparaciones entre los ejemplares de *B. taeniata* de Pauldeo, río Pillanleufú, Quintero y Ucuquer presentaron valores intermedios, entre $\sim 0,01$ y $\sim 0,07$. El ejemplar de *Batrachyla leptopus* presentó los valores más altos, mayores a $\sim 0,2$, en comparación con cada uno de los ejemplares de las otras dos especies.

Los valores de distancia relativamente bajos entre los ejemplares de *B. nibaldoi* y el de *B. taeniata* de río Mosco, en comparación con los observados entre las poblaciones del norte y sur de *B. taeniata*, son congruentes con la **ausencia de monofilia recíproca** entre las dos especies que se obtuvo en la hipótesis filogenética (Figura 4) y los dos haplogrupos que se forman en la red de haplotipos (Figura 5).

Análisis morfológicos

- **Variables cuantitativas**

Largo de las patas

En el gráfico de la Figura 6 se resumen las medidas del largo de las patas de las dos especies. Para *B. nibaldoi*, la distribución de los datos centrales (50%) abarca entre 47 a 56 mm, mientras que para *B. taeniata* varían entre 44 y 63 mm. *Batrachyla nibaldoi* tiene una mediana ligeramente mayor que *B. taeniata*; sin embargo, esta última presenta una dispersión de datos mayor.

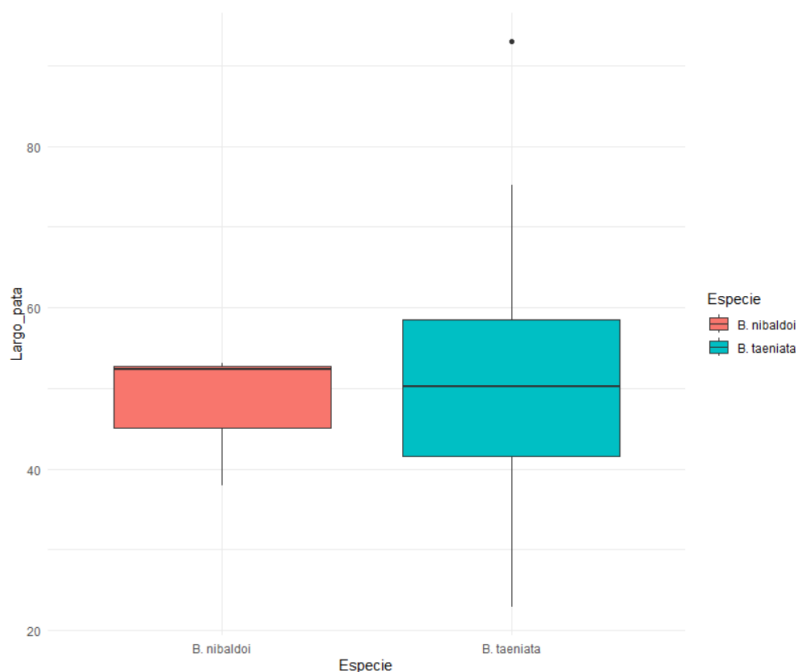


Figura 6. Distribución de las medidas de las patas de *B. nibaldoi*, a la izquierda, y *B. taeniata*, a la derecha. Cada caja del gráfico concentra el 50% central de los datos; el borde inferior y superior de la caja representan el primer y tercer cuartil respectivamente. La línea negra horizontal dentro de la caja representa la mediana de los datos.

Antes de aplicar la prueba estadística, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. La prueba de Levene arrojó un valor de $p = 0,26$, lo que indica que no se detectaron diferencias significativas entre las varianzas de las especies ($p > 0,05$), cumpliéndose así el supuesto de homogeneidad. En cuanto a la normalidad, la prueba de Shapiro-Wilk entregó valores de p de 0,079 para *B. nibaldoi* y 0,051 para *B. taeniata*. Aunque este último valor se encuentra muy próximo al umbral de significancia, no permite rechazar la normalidad, por lo que se consideró que el supuesto se cumple, si se considera como un caso límite para *B. taeniata*.

Dado que se cumplen los supuestos necesarios, se aplicó un ANOVA para evaluar diferencias en el largo de las patas entre las dos especies. El resultado fue un valor de $p = 0,771$, indicando que no existen diferencias significativas entre los grupos. Además, el valor de $F = 0,086$ sugiere que la variación interespecífica es baja en comparación con la variación intraespecífica (Tabla 5).

	Grados de libertad	Suma cuadrados	Media cuadrática	Valor de F	Pr(>F)
Especie	1	14	13,93	0,086	0,771
Residuales	93	15153	162,94		

Tabla 5. ANOVA realizado para el largo de las patas de *B. taeniata* y *B. nibaldoi*.

Distancia hocico-cloaca

En el gráfico de la Figura 7 se resumen las medidas de la distancia hocico-cloaca de las dos especies. Para *B. nibaldoi*, la distribución de los datos centrales (50%) abarca entre 22 a 27 mm, mientras que para *B. taeniata* los datos varían entre 23 a 31 mm. La mediana de *B. taeniata* es levemente mayor que la de *B. nibaldoi*.

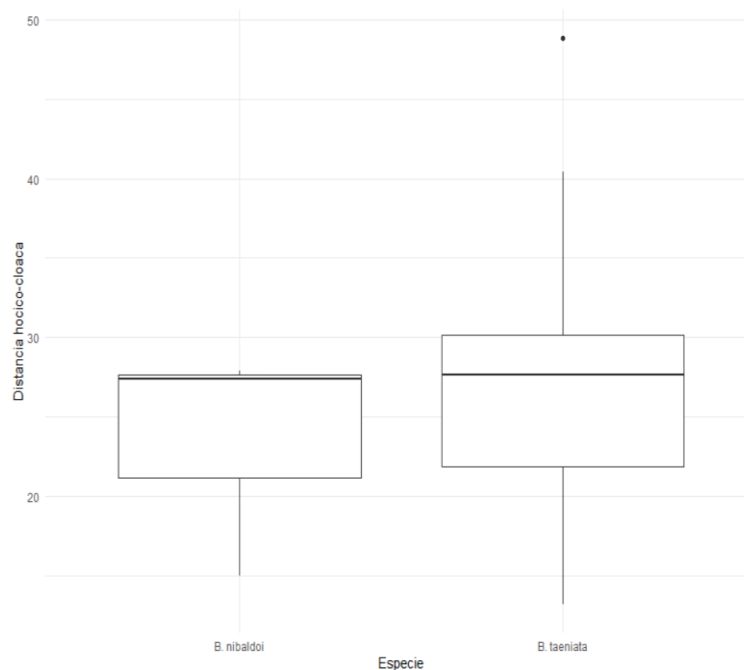


Figura 7. Distribución de los valores de la distancia hocico-cloaca de *B. nibaldoi*, a la izquierda, y *B.*

taeniata, a la derecha. Cada caja del gráfico concentra el 50% central de los datos; el borde inferior y superior de la caja representan el primer y tercer cuartil respectivamente. La línea negra horizontal dentro de la caja representa la mediana de los datos.

Se evaluaron los supuestos necesarios para aplicar una prueba paramétrica. En primer lugar, se aplicó la prueba de Levene para verificar la homogeneidad de varianzas, obteniéndose un valor de $p = 0,79$, lo que indica que las varianzas entre grupos son homogéneas ($p > 0,05$). Luego, se evaluó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, la cual entregó un valor de $p = 0,069$ para *B. nibaldoi* y de $0,0046$ para *B. taeniata*. Este último valor indica una distribución no normal en *B. taeniata*.

Se realizó una transformación logarítmica de los datos para corregir esta desviación, pero la distribución no cambió, por lo cual se procedió a realizar una prueba no paramétrica, un ANOVA de Kruskal-Wallis, ya que es una alternativa al ANOVA para comparar medianas entre grupos.

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis fueron: $\chi^2 = 0,69$, $gl = 1$, $p = 0,41$. Este resultado indica que no existen diferencias significativas en las medidas de distancia hocico-cloaca entre *B. nibaldoi* y *B. taeniata*.

- **Variables cualitativas**

Los estados observados de las variables cualitativas (presencia y ausencia del tubérculo palmar externo y metatarsal externo y grosor de la membrana interdigital) se resumieron en tablas de contingencia, a las cuales posteriormente se aplicaron pruebas de Fisher debido al desbalance de las muestras. De esta forma se pudo evaluar la asociación entre las variables.

Tubérculo palmar externo

	Ausente	Rudimentario	Presente	Indeterminable
<i>B. nibaldoi</i>	1	2	0	0

<i>B. taeniata</i>	11	0	78	3
--------------------	----	---	----	---

Tabla 6. Distribución de la presencia del tubérculo palmar externo según especie.

Tubérculo metatarsal externo

	Ausente	Ausente (con mancha)	Rudimentario	Presente	Indeterminable
<i>B. nibaldoi</i>	2	0	1	0	0
<i>B. taeniata</i>	3	4	0	84	1

Tabla 7. Distribución de la presencia del tubérculo metatarsal externo según especie.

Grosor de la membrana interdigital

	Más gruesa	Opaca	Transparente	Indeterminable
<i>B. nibaldoi</i>	0	0	3	0
<i>B. taeniata</i>	7	57	10	18

Tabla 8. Distribución del grosor de la membrana interdigital según especie.

La Tabla 9 muestra los resultados de la prueba de Fisher para las variables de tubérculo palmar externo, tubérculo metatarsal externo y grosor de la membrana.

Variable	Valor de p entregado
----------	----------------------

Tubérculo palmar	0,0001589
Tubérculo metatarsal	0,0003974
Grosor de la membrana	0,004291

Tabla 9. Valores de p de las pruebas de Fisher para cada variable.

Se evidencia una relación significativa a nivel de especie para todas las variables, debido a que los valores de p entregados son menores a 0,05. Sin embargo, los resultados de estas pruebas pueden estar influenciados por el desbalance de muestras debido a las pocas muestras de *B. nibaldoi*.

En cuanto las otras dos variables examinadas, el grosor de los dedos y la forma de las puntas de éstos, no se pudieron realizar pruebas estadísticas, ya que en la totalidad de las muestras de las dos especies se observaron dedos delgados y puntas redondeadas, indicando que no existe una relación entre estas características y la especie.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que presenta evidencia molecular (ADN mitocondrial) y morfológica (caracteres cualitativos y cuantitativos externos) para reevaluar la validez taxonómica de *Batrachyla nibaldoi* con respecto a *Batrachyla taeniata*. Para ello se obtuvieron por primera vez datos moleculares y de morfología externa de ejemplares de *B. nibaldoi* de su localidad tipo (Puente Traihuanca), que fueron comparados con información de poblaciones de *B. taeniata* representativas de gran parte de su rango de distribución. Los resultados del análisis filogenético y la red de haplotipos muestran que la población de *B. nibaldoi* de la localidad tipo está estrechamente relacionada con las poblaciones más sureñas de *B. taeniata*, lo cual es ratificado cuantitativamente por las distancias genéticas entre todas las poblaciones de ambas especies. Por otra parte, los análisis morfológicos indicaron que la mayor parte de los caracteres descritos como diagnósticos de *B. nibaldoi* no presentaron diferencias consistentes entre ambas especies y son polimórficos en *B. taeniata*. Todos estos resultados son congruentes entre sí, sugiriendo que *Batrachyla taeniata* y *Batrachyla nibaldoi* son conespecíficas.

El análisis filogenético (Figura 4) muestra que no existe una diferenciación genética entre *B. taeniata* y *B. nibaldoi*, ya que los ejemplares de Puente Traihuanca (y de una localidad muy cercana ubicada a 2 km al sur) no conforman el grupo hermano de *B. taeniata*, sino que se relacionan directamente con la localidad más austral de esta especie (río Mosco). Esta estrecha cercanía genética también se refleja en las longitudes cortas de las ramas del árbol correspondientes a las poblaciones de Puente Traihuanca y río Mosco. En otras palabras, la población de *B. nibaldoi* es equivalente a una población más de *B. taeniata*, por lo que se puede decir que esta última especie es parafilética con respecto a la primera. Dentro del clado de *B. taeniata* se pueden apreciar dos subclados principales, uno que agrupa a las poblaciones de la zona norte (Quintero, Ucúquer y Junquillar) y otro que agrupa a las poblaciones de la zona sur de su distribución (río Pillanleufú, Pauldeo y río Mosco, dónde además se encuentra contenido *B. nibaldoi*). Este patrón de divergencia profunda ya se había observado en un análisis filogeográfico de *B. taeniata* realizado previamente por Cisternas (2022) quien encontró dos clados principales dentro de la especie, uno que abarca su distribución norte y

otro la del sur, separados por el río Biobío. Este río ya se había propuesto como barrera geográfica para otras especies de vertebrados (Muñoz-Mendoza *et al.* 2017, Palma *et al.* 2012). Sin embargo, acá se detectó una diferencia importante con respecto al patrón de divergencia hallado por Cisternas (2022), ya que el ejemplar proveniente de la laguna Junquillar se ubica filogenéticamente en el clado norte de *B. taeniata* (Figura 4), a pesar de que esa localidad se encuentra al sur del río Biobío, lo que podría indicar que este límite biogeográfico planteado con anterioridad no es tan rígido.

En la red de haplotipos también se puede apreciar la profunda divergencia genética dentro de *B. taeniata*, que se refleja en dos haplogrupos separados por muchos pasos mutacionales y segregados espacialmente (norte y sur, Figura 5). Lo otro que se destaca en la red de haplotipos es el haplotipo 3, el cual es compartido entre individuos de *B. nibaldoi* y *B. taeniata* provenientes de la zona sur (Puente Traihuanca, 2 kilómetros al sur de éste y río Mosco). Esto significa que no hay una diferenciación genética entre *B. taeniata* y *B. nibaldoi*, al menos en su ADN mitocondrial, lo cual es congruente con el resultado del análisis filogenético. Además, la presencia del mismo haplotipo en ejemplares de localidades separadas por más de 200 km sugiere que esas poblaciones, independientemente del nombre que han recibido, presentan una baja variación genética en comparación al extremo norte de la distribución de *B. taeniata*.

Los valores de divergencia genética también reflejan la falta de diferenciación entre *B. taeniata* y *B. nibaldoi* y la profunda división dentro de *B. taeniata* (Tabla 4). Así, las distancias extremadamente bajas entre la muestra de *B. taeniata* perteneciente a la localidad de Río Mosco y las tres muestras correspondientes a *B. nibaldoi*, con valores que van de $\sim 0,000$ a $\sim 0,001$, demuestran una estrecha relación entre las poblaciones de *B. nibaldoi* y la muestra de *B. taeniata* del extremo sur, que es consistente con la interpretación de que se trata de la misma especie. Respecto a las distancias entre las muestras de *B. taeniata* del río Pillanleufú y de Pauldeo con las muestras de *B. nibaldoi* y de *B. taeniata* de río Mosco, se observan distancias que van entre los $\sim 0,012$ y $\sim 0,026$, que de acuerdo con los valores de referencia en estudios de vertebrados (ver Metodología) corresponden a poblaciones distintas dentro de la misma especie. En cuanto a los valores de distancias de *B. nibaldoi* y *B. taeniata* de río Mosco en comparación con las muestras de *B. taeniata* de la zona norte (Quintero y

Ucúquer) se observan valores entre $\sim 0,066$ y $\sim 0,071$, lo que se puede interpretar como linajes diferentes dentro de la especie. Esto concuerda con la alta divergencia intraespecífica observada por Cisternas (2022), quien encuentra dos clados principales para la especie. Por último, en la Tabla 4 se puede observar que los valores de distancia entre todas las poblaciones de *B. taeniata* y *B. nibaldoi* y el ejemplar de *B. leptopus* son mayores a 0,2, lo cual ejemplifica lo esperado al comparar especies totalmente diferentes.

La información genética fue contrastada con una comparación de caracteres morfológicos externos entre *B. taeniata* y *B. nibaldoi*, ya que la descripción de esta última se basó exclusivamente en ese tipo de caracteres. Formas (1997) incluyó el tamaño corporal en la diagnosis de *B. nibaldoi* (rana de tamaño mediano, 35,4-40,8 mm de distancia hocico-cloaca) y además indicó que esta especie tiene las patas traseras más cortas que *B. taeniata*. Los análisis de ANOVA realizados en este estudio (Figuras 6 y 7) muestran que tanto la distancia hocico-cloaca como la medida del largo de las patas no presentan diferencias entre ambas especies, lo cual implica que ninguna de estas dos medidas cuantitativas se puede utilizar para diferenciar a *B. nibaldoi* de *B. taeniata* como lo planteó Formas (1997).

También se analizaron los siguientes caracteres externos cualitativos utilizados por Formas (1997) para diferenciar a ambas especies: grosor y transparencia de la membrana interdigital (gruesa y opaca en *B. taeniata*; transparente y delgada en *B. nibaldoi*) y presencia y desarrollo de los tubérculos palmar y metatarsal externos (ambos presentes en *B. taeniata*; el primero rudimentario y el segundo ausente en *B. nibaldoi*). Las pruebas de Fisher (Tabla 10) sobre las tablas de contingencia muestran que *B. nibaldoi* y *B. taeniata* podrían diferenciarse por el grosor de la membrana interdigital y la presencia y desarrollo de los tubérculos. Sin embargo, es necesario destacar que las características de la membrana interdigital y los tubérculos son variables dentro de *B. taeniata*. Por ejemplo, hay ejemplares de *B. taeniata* con membrana transparente y que no poseen tubérculo metatarsal externo, tal como se describió para *B. nibaldoi*. En todo caso, se requieren más datos o muestras de *B. nibaldoi* para disminuir el desbalance de los datos y así realizar pruebas estadísticas más robustas. Otra de las características morfológicas utilizadas por Formas (1997) para distinguir a ambas especies fue el grosor y la forma de las puntas de los dedos, pero en este estudio no se encontró ninguna diferencia significativa a nivel de especie. Todos estos resultados muestran

que tampoco hay diferencias consistentes en la mayoría de los caracteres diagnósticos cualitativos, lo que podría explicar lo expuesto por Díaz-Páez *et al.* (2002), quienes mencionan que *B. nibaldoi* concuerda con las descripciones fenotípicas de *B. taeniata* (y que ambas especies no pueden diferenciarse por sus vocalizaciones), poniendo en duda la validez de *B. nibaldoi*.

Batrachyla nibaldoi es una especie poco conocida, ya que más allá de su descripción (Formas 1997), solo se han publicado nuevas localidades que extendieron significativamente su distribución al norte y sur de la localidad tipo (Díaz-Páez *et al.* 2002, Díaz-Páez & Carreño 2002, Pincheira-Donoso & Díaz-Páez 2003, Rabanal 2010, González *et al.* 2015). Los nuevos registros implican que la distribución de *B. nibaldoi* es fragmentaria, pero extensa (~ 680 km latitudinalmente, 42°35'-48°42'S), aunque Rabanal (2010) indica que su distribución sería continua entre Bahía Murta y las cercanías de Villa O'Higgins. Sin embargo, se conocen poblaciones de *B. taeniata* a lo largo de toda la extensión del rango de *B. nibaldoi* y hasta un poco más al sur de Villa O'Higgins (río Mosco, 48°29'S; Correa *et al.* 2014). Esto implica que la distribución de *B. nibaldoi* estaría contenida casi completamente dentro de la de *B. taeniata* (con la excepción del extremo sur, Fiordo Témpanos, González *et al.* 2015), aunque el nivel de simpatría o sintopía entre ambas especies se desconoce actualmente.

Las distribuciones actuales de *B. taeniata* y *B. nibaldoi* implican que ocurrió un evento de especiación en algún punto dentro de la zona de superposición y que luego una o ambas especies expandieron su rango hasta quedar casi completamente solapadas geográficamente. Aunque se desconoce hasta qué punto ambas especies pueden coexistir en el mismo sitio (solo hay un caso de sintopía reportado, Díaz-Páez *et al.* 2002) o hay cierta segregación de nicho que les permite tener el alto grado de simpatría descrito, en ambos casos tendrían que haber evolucionado barreras reproductivas para mantener la superposición de sus rangos. Al parecer, las vocalizaciones no cumplen ese rol ya que no habría diferencias entre los cantos de estas especies como mencionan Díaz-Páez *et al.* (2002) (aunque el canto de *B. nibaldoi* nunca ha sido descrito formalmente). Esto contrasta con las evidentes diferencias morfológicas y etológicas (vocalizaciones) entre *B. taeniata* y las otras dos especies del género, *B. antartandica* y *B. leptopus*, con las cuales comparte gran parte de su distribución y hábitats (Penna y Veloso 1990, Rabanal y Núñez 2008). La evidencia genética y

morfológica obtenida en este estudio, que sugiere que *B. taeniata* y *B. nibaldi* corresponden a la misma especie, simplifica el escenario biogeográfico y evolutivo antes descrito y, además, implica una menor diversidad específica para el género (solo cuatro especies).

En un contexto biogeográfico más amplio, si se acepta la hipótesis de sinonimia entre estas dos especies, la diversidad del género iría disminuyendo progresivamente hacia el sur, ya que *B. leptopus* llega hasta los 48°11'S (Sector río Bravo, Ortiz & Domínguez 2021), *B. taeniata* llegaría hasta los 48°42'S (Fiordo Témpanos, González *et al.* 2015) y *B. antartandica* alcanza los 52°40'S (Cabo León en la isla Riesco, Stipicic *et al.* 2020). Esta disminución de la riqueza hacia el extremo sur concuerda con el patrón general de distribución de los anfibios en Chile (Vidal 2008, Vidal y Díaz-Páez 2012) y fue recientemente encontrado para el género *Alsodes* (San Francisco 2024, tesis de pregrado de Biología). Por otro lado, la disminución de la variación genética intraespecífica hacia el sur observada en *B. taeniata* (incluyendo a las poblaciones de Puente Traihuanca y alrededores dentro de esta especie) concuerda con los patrones de variación encontrados en otras especies de anfibios codistribuidos como *Eupsophus calcaratus* (Núñez *et al.* 2011) y *B. leptopus* (Núñez *et al.* 2020). Por lo tanto, la hipótesis de sinonimia de *B. nibaldi* con *B. taeniata* no solo es soportada por la falta de diferenciación genética y morfológica entre ambas especies, sino que también tiene sentido en el contexto de la biogeografía e historia poblacional de los anfibios de los bosques templados del sur de Chile.

CONCLUSIÓN

Este estudio proporciona una evaluación integral de la relación entre *Batrachyla nibaldoi* y *Batrachyla taeniata*, incorporando por primera vez datos moleculares y morfológicos de ejemplares de la localidad tipo de *B. nibaldoi*. El análisis filogenético, la red de haplotipos y las distancias genéticas muestran que las poblaciones asignadas a *B. nibaldoi* no constituyen un linaje genético independiente, sino que se encuentran estrechamente relacionadas con las poblaciones más australes de *B. taeniata*, compartiendo incluso haplotipos mitocondriales. Esta falta de diferenciación genética, junto con la ausencia de diferencias consistentes en la mayoría de los caracteres morfológicos diagnósticos propuestos originalmente, indican que ambas entidades corresponderían a una misma especie.

Los resultados de los análisis morfológicos permiten cuestionar la diagnosis de *B. nibaldoi*, ya que los caracteres cualitativos y cuantitativos utilizados para separar a esta especie de *B. taeniata* (como el tamaño corporal, la longitud de las patas o la forma de los tubérculos) demostraron ser altamente variables dentro de esta última especie. Considerando el alto nivel de variación fenotípica de *B. taeniata*, estos resultados por si solos apoyan la hipótesis de sinonimia de *B. nibaldoi* con *B. taeniata*, lo cual implica que las poblaciones de *B. nibaldoi* pueden considerarse simplemente como poblaciones adicionales del extremo sur de esta última especie. Este resultado es importante, ya que *B. nibaldoi* se describió solo considerando caracteres morfológicos externos.

La reinterpretación taxonómica propuesta aquí no solo reduce la diversidad específica reconocida dentro del género *Batrachyla*, sino que también tiene importantes consecuencias para la comprensión de su biogeografía e historia evolutiva. La distribución de *B. nibaldoi* se encuentra casi completamente contenida dentro del rango de *B. taeniata* y los patrones genéticos observados (con una marcada diferenciación entre clados norte y sur y una disminución de la variación genética hacia el sur) son coherentes con procesos históricos comunes a otros anfibios del bosque templado austral. Asimismo, el muestreo de *B. taeniata* permite cuestionar la rigidez de algunas barreras geográficas propuestas previamente, como el río Biobío, cuyo rol como barrera podría ser más permeable de lo que se pensaba.

En conjunto, estos resultados refuerzan la necesidad de reevaluar especies descritas únicamente con base en caracteres morfológicos limitados, especialmente en grupos con alta variabilidad fenotípica y baja diferenciación genética. Además, destacan la importancia de integrar enfoques filogenéticos, morfológicos y biogeográficos para una delimitación taxonómica robusta, que refleje con mayor precisión la diversidad evolutiva real de los taxa involucrados.

Bibliografía

- Armesto, J. J., Rozzi, R., Smith-Ramírez, C., & Arroyo, M. T. (1998). Conservation targets in South American temperate forests. *Science*, 282(5392), 1271–1272.
- Armesto, J. J., Smith-Ramírez, C., León, P., & Arroyo, M. K. (1992). Biodiversidad y conservación del bosque templado en Chile. *Ambiente y Desarrollo*, 8, 19–24.
- Basso, N. G. (1994). Una nueva especie de *Batrachyla* (Anura: Leptodactylidae: Telmatobiinae) de Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 8(1), 51-56.
- Basso, N. G., Úbeda, C. A., Bunge, M. M., & Martinazzo, L. B. (2011). A new genus of neobatrachian frog from southern Patagonian forests, Argentina and Chile. *Zootaxa*, 3002(1), 31–44.
- Benítez, M. F. (2019). *Revisión multidisciplinaria de Rhamdia quelen (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae) de las cuencas de los ríos alto Paraná y Uruguay en Argentina: taxonomía clásica, citogenética y genética molecular* [Tesis doctoral, Universidad Nacional del Nordeste]. <https://doi.org/10.35537/10915/74065>
- Celis-Díez, 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. <https://fundacionphilippi.cl/wp-content/uploads/2018/10/fauna-del-bosque-celis-diez-et-al-2011.pdf>
- Cisternas, I. M. (2022). *Filogeografía de Batrachyla taeniata (Girard, 1855) e influencia del paisaje sobre la estructura genética de sus poblaciones* [Tesis doctoral, Universidad de Concepción]. <https://repositorio.udec.cl/server/api/core/bitstreams/1bd3abd8-dba9-47d5-8d53-61e801a3c473/content>
- Charrier, A. (2019). *Guía de campo: Anfibios de los bosques de la zona centro sur y Patagonia de Chile* (p. 300). Corporación Chilena de la Madera.

- Correa, C., Cisternas, J., Velásquez, N., Lobos, G., & San Martín-Órdenes, J. (2014). Distribution extension, new records and historical occurrence of *Batrachyla taeniata* (Girard, 1854) (Anura: Batrachylidae) in Chile. *Herpetology Notes*, 7, 703–706.
- Correa, C., Morales, J., Schussler, C., & Ortiz, J. C. (2020). An enigmatic population of *Alsodes* (Anura, Alsodidae) from the Andes of central Chile with three species-level mitochondrial lineages. *Mitochondrial DNA Part A*, 31(1), 25–34.
- 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 (Concepción)*, 77(2), 125–131. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382013000200006>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Díaz-Páez, H., & Carreño, E. (2002). Geographic distribution. *Batrachyla nibaldoi* (Nibaldo's wood frog). *Herpetological Review*, 33(3), 218.
- 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, 135–145. <https://publicaciones.mnhn.gob.cl/668/w3-article-64479.html>
- Echeverría, C., Coomes, D., Salas, J., Rey-Benayas, J. M., Lara, A., & Newton, A. (2006). Rapid deforestation and fragmentation of Chilean temperate forests. *Biological Conservation*, 130(4), 481–494.
- Formas, J. R. (1997). A new species of *Batrachyla* (Anura: Leptodactylidae) from southern Chile. *Herpetologica*, 53(1), 6–13.

- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., & Gemmell, N. J. (2007). Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE*, 2(10), e1109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001109>
- 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.
- Kartavtsev, Y., & Lee, J.-S. (2006). Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome b and cytochrome oxidase 1 genes at the population, species, and genus levels. *Russian Journal of Genetics*, 42, 341–362.
- Koroiva, R., & Santana, D. J. (2022). Evaluation of partial 12S rRNA, 16S rRNA, COI and Cytb gene sequence datasets for potential single DNA barcode for hylids (Anura: Hylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94(4), e20200825. <https://doi.org/10.1590/0001-376520220200825>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- 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*. Ministerio del Medio Ambiente, Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y Red Chilena de Herpetología. 104p. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Muñoz-Mendoza, C., D'Elía, G., Panzera, A., T, M. A. M., Villalobos-Leiva, A., Sites, J. W., & Victoriano, P. F. (2017). Geography and past climate changes have shaped the evolution of a widespread lizard from the Chilean hotspot. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 116, 157-171. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.08.016>

- Núñez, J. J., Wood, N. K., Rabanal, F. E., Fontanella, F. M., & Sites, J. W. (2011). Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58(2), 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.026>
- Núñez, 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. <https://doi.org/10.7717/peerj.9980>
- Ortiz, J., & Domínguez, E. (2021). Anfibios de las turberas de *Sphagnum* de la región de Aysén, Chile. En E. Domínguez & M. P. Martínez (Eds.), *Función y servicios ecosistémicos de las turberas de Sphagnum en la región de Aysén* (pp. 233–237). Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación Tamel Aike. 344 pp.
- Palma, R. E., Boric-Bargetto, D., Torres-Pérez, F., Hernández, C. E., & Yates, T. L. (2012). Glaciation effects on the phylogeographic structure of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Southern Andes. *PLoS ONE*, 7(3), e32206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032206>
- Penna, M., & Veloso, A. (1990). Vocal diversity in frogs of the South American temperate forest. *Journal of Herpetology*, 24, 23–33.
- Pincheira-Donoso, D. & Díaz-Páez, H. (2003). *Batrachyla nibaldoi*: Geographic Distribution. *Herpetological Review*, 34, 256.
- R Core Team. (2025). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

- Rabanal, F. (2010). Amphibia, Anura, Ceratophryidae, *Batrachyla nibaldoi* Formas, 1997: Latitudinal extension in Patagonia, southern Chile, and distributional range actualization. *Check List*, 6(2), 287–288.
- Rabanal, F. E., & Nuñez, J. J. (2008). *Anfibios de los Bosque Templados de Chile* (1ª ed.). Universidad Austral de Chile.
- Rodriguez, L. J., Barbosa, O. A., Azat, C., Alvarado-Rybak, M., Correa, C., Méndez, M. A., Moreno-Gómez, F. N., Rabanal, F. E., Vidal, M. A., Velásquez, N. A., & Bacigalupe, L. D. (2022). Amphibian phylogenetic diversity in the face of future climate change: not so good news for the Chilean biodiversity hotspot. *Biodiversity and Conservation*, 31(11), 2587-2603. <https://doi.org/10.1007/s10531-022-02444-3>
- 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. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- San Francisco, M. (2024). *Determinación de la diversidad específica de los Alsodes australes de Chile* [Seminario de Título, Universidad de Concepción]. <https://repositorio.udec.cl/items/3eb50cf0-e896-436b-ad52-9c0d5e9e2c89>
- 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.
- Vidal, M. A. (2008). Biogeografía de anfibios y reptiles. En: Herpetología de Chile (Eds. Vidal, M.A. & A. Labra), pp. 195-231. Science Verlag, Santiago.
- Vidal, M., & Díaz-Páez, H. (2012). Biogeography of Chilean Herpetofauna: Biodiversity hotspot and extinction risk. En *Global advances in biogeography. Rijeka: InTech* (pp. 137-154). <https://doi.org/10.5772/31255>

- Von Tschirnhaus, J., & Correa, C. (2021). The definitive rediscovery of *Telmatobius halli* (Anura, Telmatobiidae) at its historic type locality and its synonymy with *T. dankoi* and *T. vilamensis*. *ZooKeys*, 1079, 1–20. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1079.73970>
- Watters, J. L., Cummings, S. T., Flanagan, R. L., & Siler, C. D. (2016). Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach. *Zootaxa*, 4072(4), 477–495. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4072.4.6>