



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales

**Estructura, flujo genético y límites geográficos de la rana  
de hojarasca *Eupsophus migueli* (Alsodidae):  
perspectivas hacia su taxonomía y conservación**

Profesor Patrocinante: Dr. José J. Núñez  
Profesor Co-Patrocinante: Dr. Elkin Suárez  
Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas  
Facultad de Ciencias

Trabajo de Titulación presentado como parte  
de los requisitos para optar al Título de  
**Ingeniera en Conservación de Recursos Naturales**

**VICTORIA ANDREA VERA SOVIER**

VALDIVIA

2018

## Índice de materias

Páginas

i	Calificación del Comité de Titulación	i
ii	Agradecimientos	ii
iii	Dedicatoria	iii
iv	Resumen	iv
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	Biogeografía, filogeografía y genética de la conservación	2
2.2	Origen de la cuenca de Valdivia y la diversidad actual de anfibios de la Región de Los Ríos	4
2.3	<i>Eupsophus migueli</i> y el estado taxonómico de <i>E. altor</i>	7
2.4	Problema de investigación	8
2.5	Hipótesis	8
2.6	Objetivos	8
3	MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1	Material	9
3.1.1	Área de estudio	9
3.1.2	Trabajo en campo y colecta de muestras	10
3.2	Métodos	12
3.2.1	Extracción de ADN genómico	12
3.2.2	Amplificación de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	12
3.2.3	Electroforesis en gel de agarosa	14
3.2.4	Alineamiento de secuencias	14
3.2.5	Análisis genético poblacional	14
3.2.5.1	Análisis de diversidad genética	14

3.2.5.2	Análisis de estructura genética	14
3.2.6	Análisis demográfico	15
3.2.7	Análisis filogenético	15
4	RESULTADOS	17
4.1	Extracción y amplificación de ADN	17
4.2	Análisis genético poblacional	18
4.2.1	Diversidad genética	18
4.2.2	Estructura genética	21
4.3	Análisis demográficos	23
4.4	Análisis filogenético	26
5	DISCUSIÓN	28
5.1	Diversidad genética intraespecífica	28
5.2	Estructura genética en poblaciones de <i>E. migueli</i>	29
5.3	Demografía histórica	29
5.4	Relaciones genealógicas de las poblaciones de <i>E. migueli</i>	30
5.5	Implicaciones para la conservación	30
6	CONCLUSIONES	32
7	REFERENCIAS	33
8	ANEXOS	39

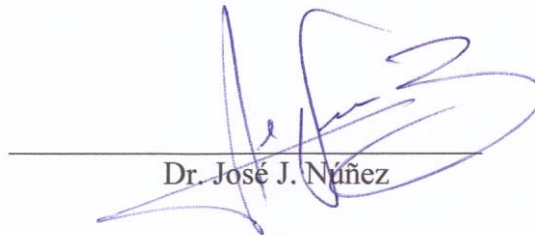
	Índice de cuadros	Páginas
Cuadro 1	Especies de anfibios presentes en la Cordillera de Mahuidache. La distribución geográfica de acuerdo con Rabanal & Nuñez (2008). Los estados de conservación están basados en IUCN (2017): DD= Insuficiente, CR= Peligro Crítico, EN= En Peligro, LC= Preocupación Menor, NT= Casi Amenazado, VU= Vulnerable.	6
Cuadro 2	Localidades de muestreo de especímenes de <i>E. migueli</i> .	9
Cuadro 3	Región de ADN mitocondrial y nuclear, secuencia de partidor y tiempo/temperatura de reasociación que se utilizarán en este estudio.	13
Cuadro 4	Valores de los parámetros de diversidad genética para cada marcador mitocondrial y nuclear. Hd: Diversidad haplotípica, S: Número de sitios polimórficos, $\pi$ : Diversidad nucleotídica, H: Número de haplotipos.	18
Cuadro 5	Valores de los parámetros de diversidad genética para cada haplogrupo de <i>E. migueli</i> con marcadores mitocondriales y nuclear. N: Número de muestras, Hd: Diversidad haplotípica, S: Número de sitios polimórficos, $\pi$ : Diversidad nucleotídica, H: Número de haplotipos.	21
Cuadro 6	Análisis de varianza molecular (AMOVA) para los grupos de <i>E. migueli</i> .	22
Cuadro 7	Valores de los test de neutralidad para cada haplogrupo de <i>E. migueli</i> . D de Tajima (D); D* de Fu y Li; F* de Fu y Li; R2 (Ramos-Onsins & Rozas).	23

	Índice de figuras	Páginas
Figura 1	Mapa que indica los sitios de muestreos de este estudio.	11
Figura 2	Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 1 %, producto de amplificación de ADN con los marcadores mitocondriales COI (A) y Cyt- <i>b</i> (B), región control D-Loop (C) y el marcador nuclear POMC (D). Para todas las fotografías el pocillo número uno es el estándar del marcador molecular; M1 al M9: productos PCR para nueve individuos; C+: Control positivo y C-: Control negativo.	17
Figura 3	Red de haplotipos obtenidas con el total de las secuencias para todas las localidades de <i>E. migueli</i> muestreadas: Cerro Oncol (verde), Chanchán (naranja), Colegual Alto (amarillo) y Las Huellas (turquesa). Cada círculo representa un haplotipo y el área de cada uno de ellos es proporcional al número de individuos; los colores representan la localidad muestreada; los números indican los pasos mutacionales entre haplotipos.	19
Figura 4	Distribución geográfica de haplogrupos. Haplogrupo <b>A</b> incluye a Colegual Alto (color azul) y el haplogrupo <b>B</b> incluye a Cerro Oncol (color naranja), Chanchán (color amarillo claro) y Las Huellas (color verde).	20
Figura 5	Gráfico que muestra la agrupación más probable (probabilidad <i>a posteriori</i> ) de los individuos de <i>E. migueli</i> en las localidades muestreadas. Las zonas con mayor probabilidad de agrupamiento se indican con amarillo claro, mientras que las menores son proporcionales al rojo. Los puntos negros representan las localidades de muestreo.	22
Figura 6	Distribución de diferencias pareadas ( <i>Mismatch distribution</i> ) observadas (línea punteada) y esperadas (línea continua) para: A) Haplogrupo A, B) Haplogrupo B y C) Total.	24
Figura 7	Resultados de <i>Skyline Plot</i> para cada población: A) Haplogrupo A B) Haplogrupo B y C) Total. La línea punteada representa la mediana de estimación y las líneas negras representan los intervalos de confianza (95%) inferiores y superiores.	25
Figura 8	Árbol filogenético que muestra las relaciones entre individuos <i>Eupsophus migueli</i> basadas en el total de secuencias concatenadas. El soporte de las ramas se basa en el <i>bootstrap</i> de 200 réplicas y las probabilidades posteriores Bayesianas. Individuos correspondientes a Colegual Alto se representa en color verde (Clado A) y los individuos pertenecientes a Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas representadas en color rojo (Clado B). De color negro el <i>outgroup</i> de <i>Eupsophus vertebralis</i> .	27

## Calificación del Comité de Titulación

		Nota
Patrocinante:	Dr. José J. Núñez	7,0
Co-Patrocinante:	Dr. Elkin Y. Suarez	7,0
Informante:	Dr. Paulo Corti	6,8
Informante:	Dr. Pablo A. Oyarzún	6,5

El Patrocinante acredita que el presente Trabajo de Titulación cumple con los requisitos de contenido y de forma contemplados en el Reglamento de Titulación de la Escuela. Del mismo modo, acredita que en el presente documento han sido consideradas las sugerencias y modificaciones propuestas por los demás integrantes del Comité de Titulación.



Dr. José J. Núñez

## **Agradecimientos**

Comienzo agradeciendo a mi patrocinante el Dr. José J. Nuñez por el tiempo dedicado y cada crítica constructiva que fue necesaria para realizar este trabajo, que no fue fácil, pero confió en mis habilidades y me animó a superarme y fortalecerme constantemente tanto profesional como personalmente.

A mi Co-Patrocinante, el Dr. Elkin Y. Suárez, por la paciencia, disponibilidad, conocimiento y con ayuda de material de información para el análisis e interpretación de los resultados, y por la subvención de las tesis por el proyecto Fondecyt 3160328.

A Camila Quercia, primero por su buena voluntad para manejar, que fue la primera parte y más importante para realizar el muestreo de este trabajo, y también por cada consejo y disponibilidad en el laboratorio y en el análisis de los datos.

De igual manera agradecer a los profesores informantes, Dr. Paulo Corti y Dr. Pablo A. Oyarzún, por su apoyo para la culminación de esta tesis.

Agradecer a mis amigos por comprender cada momento de estrés y ansiedad, y pudieron darme ánimos para seguir. Pero sobre todo por ese apoyo incondicional, alegría y amor que sólo ellos saben entregar.

Finalmente, a mis padres por el apoyo y los valores entregados para luchar y alcanzar mis metas. También por darme la oportunidad de estudiar una carrera profesional. Y agradecer a mi familia en general por todo el apoyo y amor.

## **Dedicatoria**

*“Hoy en día nos enfrentamos a un desafío que exige un cambio en nuestro pensamiento, para que la humanidad deje de amenazar su sistema de sostenimiento de la vida. Estamos llamados a ayudar a la Tierra a curar sus heridas y, en el proceso, a sanar las nuestras, de hecho, a abrazar a toda la creación en toda su diversidad, belleza y maravilla.*

*...no puede haber paz sin un desarrollo equitativo; y no puede haber desarrollo sin una gestión sostenible del medio ambiente en un espacio democrático y pacífico. Este cambio es una idea cuyo momento ha llegado.”*

Wangari Maathai  
Premio Nobel de la Paz 2004



## Resumen

*Eupsophus migueli* es una especie de rana endémica del sur de Chile que presenta un área de distribución restringida y poblaciones fragmentadas. Recientemente *E. altor* ha sido sinonimizada con *E. migueli*. A pesar de esto, no se han realizado estudios sobre la estructura, posibles quiebres genéticos y específicos determinantes en esta especie, donde el río Lingue pudo haber sido una barrera biogeográfica que limitó en el pasado su área de distribución. Por lo anterior, el objetivo general de este trabajo es determinar la diversidad genética en poblaciones de *E. migueli* a lo largo de su rango distribucional actual. Para ello se secuenciaron tres marcadores mitocondriales (COI, Cyt-*b* y D-Loop) y un nuclear (POMC) de 75 especímenes provenientes de doce puntos de muestreo. Se realizaron análisis de diversidad genética, estructura poblacional, cambios demográficos e inferencia filogenética. Las poblaciones de *E. migueli* presentan alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica ( $Hd=0,995$ ,  $\pi=0,01467$ ). Los análisis de estructura genética indican la presencia de dos grupos bien diferenciados localizados al norte y sur del río Lingue ( $K=2$ ,  $F_{ST}=0,78$ ). Filogenéticamente, estos grupos son recuperados en dos clados con alto soporte estadístico (Bootstrap>94% y BPP>0,96). Se sugiere que río Lingue juega un rol importante como barrera biogeográfica, que probablemente ha generado la marcada estructuración genética en esta especie. Finalmente, en base a los resultados obtenidos se sugiere la revalidación de *E. altor* a nivel específico.

**Palabras clave:** Anfibios, conservación, diversidad genética.

## 1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad es la variedad de todos los seres vivos, las diferentes plantas, animales y microorganismos, la información genética que contienen y los ecosistemas que ellos forman. La biodiversidad generalmente se explora en cuatro niveles: diversidad genética, de especies, de ecosistemas y de paisajes. Estos cuatro niveles se interrelacionan mutuamente para crear la complejidad de la vida en la Tierra. La diversidad genética, entendida como la variedad en la composición de genes dentro y entre especies, también puede ser comparada en cuatro niveles: entre individuos de una población, entre poblaciones dentro de la misma especie, entre las diferentes especies y a nivel paisajístico.

La ecorregión Valdiviana abarca una superficie de 300.000 km<sup>2</sup> entre el paralelo 37°S y 48°S, caracterizado por poseer un bosque templado húmedo, con precipitaciones sobre los 1.400 mm al año y un clima oceánico, siendo considerado como *hotspot* de biodiversidad. Además, debido a su aislamiento geográfico, esta ecorregión presenta una elevada cantidad de especies endémicas y además una gran diversidad genética.

*Eupsophus migueli* es una de las cuatro especies de anfibios endémica de la Región de Los Ríos y que presenta un área de distribución restringida y de poblaciones fragmentadas en la localidad de Mehuín y sus alrededores. Por otro lado, *E. altor*, endémica de la Cordillera Costera Valdiviana, se distribuye entre la desembocadura del río Valdivia y el río Lingue. Esta especie ha sido sinonimizada con *E. migueli*. No obstante, no se han realizado estudios sobre posibles quiebres genéticos y específicos determinantes en *E. migueli*, donde el río Lingue pudo haber sido una barrera biogeográfica que limitó en el pasado su área de distribución.

La hipótesis planteada en el presente trabajo sugiere que el Río Lingue actúa como una barrera biogeográfica en la distribución de *Eupsophus migueli*, por lo tanto, las poblaciones presentarían una marcada estructuración geográfica concordante con límites específicos de la especie previamente sinonimizada (*Eupsophus altor*). Para la evaluación de las predicciones de esta hipótesis, se plantea como objetivo general: Determinar la estructura y la diversidad genética en poblaciones de *Eupsophus migueli* a lo largo de su rango distribucional actual. A su vez, como objetivos específicos se plantean: I) Determinar la variabilidad genética que se encuentra dentro de la especie a través de marcadores mitocondriales y nucleares a lo largo de su rango distribucional, II) Estimar el grado de estructuración genético-espacial presentes en poblaciones de *E. migueli* y III) Evaluar las relaciones genealógicas de las poblaciones mediante inferencia filogenética.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biogeografía, filogeografía y genética de la conservación

La explicación de los patrones y procesos que afectan en la distribución de las especies ha sido una de las tareas fundamentales en biología. En este contexto, una de las disciplinas importantes en este campo es la biogeografía, enfocada en estudiar, describir y comprender los patrones de distribución geográfica de las especies y taxones supra-específicos (Morrone, 2000). Según Lieberman (2003), estos patrones de distribución geográfica pueden ser descritos con un enfoque ecológico explicado a través de interacciones inter e intraespecíficas, o un enfoque histórico a través de procesos evolutivos. Al respecto, la vicarianza y la dispersión son los procesos que describen las distribuciones de las especies con un enfoque histórico. Como vicarianza se entiende el proceso donde surgen barreras geográficas, climático o de hábitat, que fragmentan la distribución de una población ancestral (Morrone, 2007). Por su parte, la dispersión es la expansión del área de distribución de un taxón, donde puede atravesar barreras biogeográficas (cadenas montañosas, masas de hielo, ríos, lagos, entre otros) colonizando nuevas áreas generándose aislamiento (Morrone, 2007). En la década de los sesenta se publicó el trabajo de Hennig (1968) de biología comparada titulado “*Elementos de una Sistemática Filogenética*”, surgiendo una corriente conocida como biogeografía filogenética, dando sustento teórico a los principios y métodos para la reconstrucción de grupos monofiléticos (Llorente *et al.*, 2001). Esta disciplina sigue el siguiente esquema: 1) reconocer los taxones monofiléticos mediante el método cladista y reconocer su ubicación temporal; 2) graficar las áreas de distribución; 3) interconectar las áreas con base a la información del cladograma. El objetivo de este flujo de trabajo es representar la secuencia de episodios paleogeográficos que separaron las áreas de endemismo de los taxones que se analizan y/o distinguir tanto procesos de dispersión gradual como expansiones y contracciones de las áreas. Entonces mediante este método se demuestra la relación entre historia geológica y genealógica, donde a partir de los eventos geológicos se puede predecir la historia filogenética (Llorente *et al.*, 2001).

Por otro lado, la filogeografía es la disciplina científica que está relacionada a los principios y procesos que conducen a comprender la influencia de factores históricos (climáticos y geológicos) sobre los linajes genealógicos (Avise, 1998), particularmente relaciones dentro y entre especies relacionadas (Avise, 2000; Vargas, 2010). Además, Avise (2000) indica que la filogeografía se puede considerar una disciplina integradora, puesto que incorpora conceptos y técnicas de biología molecular,

genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología. Entre las problemáticas que estudia la filogeografía a partir de los procesos históricos demográficos está la distribución histórica de las especies, el flujo génico entre poblaciones separadas, secuencias de colonización, cuellos de botella y la identificación de unidades de conservación (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000; Avise, 2009; Freeland, 2005; Vázquez-Domínguez, 2002; Vázquez-Domínguez, 2007; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). Una de las disciplinas donde la filogeografía ha tenido mayor impacto es en la genética de la conservación. Esta disciplina nace poco después de haber surgido la biología de la conservación, con la idea de comprender desde el punto de vista genético los procesos ecológicos y evolutivos que atraviesan las especies para así proponer estrategias de conservación (Eguiarte *et al.*, 2007). La finalidad de esta disciplina es generar modelos para minimizar las extinciones asociadas a problemas genéticos entre los que se encuentran la reducción de los tamaños efectivos poblacionales, la endogamia, la pérdida de diversidad genética y la consecuente habilidad para evolucionar en respuesta a cambios ambientales (Eguiarte *et al.*, 2007). Además, señala Moritz (2002), que los análisis genéticos permiten estudiar el efecto de la fragmentación y la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas, el efecto de acumulación y pérdida de mutaciones. Asimismo, estos análisis permiten enfrentar problemas de sistemática biológica, por ejemplo: establecer especies prioritarias para la conservación, solucionar incertidumbres taxonómicas, definir unidades evolutivamente significativas y unidades de manejo, y proteger procesos evolutivos que mantiene la diversidad genética (Moritz, 2002; Eguiarte *et al.*, 2007).

De lo anterior se desprende que uno de los requisitos básicos para la conservación y protección de la biodiversidad local es contar con un conocimiento genético poblacional del grupo de especies de interés y certeza sobre la delimitación de esas especies. Según Whittaker (1972), los mecanismos que dirigen la diversidad a nivel de especie (diversidad alfa) son diferentes de los mecanismos que impulsan la diversidad entre organismos funcionalmente equivalentes (diversidad beta). Por lo tanto, la tarea de cuantificar inequívocamente la biodiversidad puede ser extremadamente difícil si las relaciones sistemáticas son controvertidas, plagadas de sinonimias, por la falta de material tipo para las especies ya descritas, la existencia de especies crípticas, y si el rango geográfico de la especie nominal es desconocida, subjetiva o incierta. Vale la pena señalar que tales incertidumbres pueden tener un impacto severo no sólo en el estado actual de la biodiversidad, sino también en la pérdida futura de procesos biológicos, interacciones interespecíficas, mecanismos evolutivos y servicios ecosistémicos. Por otro lado, los criterios subjetivos para delimitar límites geográficos o específicos pueden generar confusión en las decisiones políticas sobre cuestiones de biodiversidad y potencialmente desperdiciar

millones de dólares en esfuerzos vanos para la conservación de especies (Fujita *et al.*, 2012; Lindenmayer & Possingham, 2013).

## 2.2 Origen de la Cuenca de Valdivia y la diversidad actual de anfibios de la Región de Los Ríos

La formación de la Cuenca de Valdivia se inició con la deposición de sedimento a finales del Oligoceno Tardío (28 Ma aproximadamente) con la rápida incisión de ríos que drenaron de la Cordillera de la Costa (Le Roux & Elgueta, 2000). Posteriormente, en el Mioceno temprano (23 a 15 Ma) hubo una estabilidad tectónica entre las placas de Nazca y la Sudamericana (Le Roux & Elgueta, 2000). Luego se produce una aceleración de erosión vertical por inicio de deposición de conglomerados pluviales basales, desarrollando extensos pantanos de turba fluvial y estuarina (Le Roux & Elgueta, 2000). Luego hace 23 Ma se aceleró la tasa de convergencia de las placas, aproximadamente 14 cm por año (Cisternas & Frutos, 1994; Le Roux & Elgueta, 2000). Durante el Burdigaliano (20,5 – 16,4 Ma) se reduce la velocidad del movimiento de las placas (Somoza, 1998), lo que se confirma con la presencia de *Catapsydrax cf. unicavos* en Catamutún (Le Roux & Elgueta, 2000). Se evidencia además que el ciclo de ingresión marina llegó hace aproximadamente 16,3 Ma y la deposición marina en Pupunahue hace 13,8 Ma (Le Roux & Elgueta, 2000) provocando un aumento del nivel del mar que posiblemente conectó la Cuenca de Valdivia y la Cuenca de Osorno durante el Tortoriano (Le Roux & Elgueta, 2000).

La Cordillera de Mahuidanche es una cadena montañosa, que se extiende desde el Sur del río Queule (Región de la Araucanía) hasta el norte del río Valdivia (Región de Los Ríos) (Smith *et al.*, 2005). La Cordillera de la Costa Valdiviana forma parte del Sur de esta cadena montañosa y se eleva interrumpiendo el desarrollo de llanos litorales, adquiriendo una apariencia con elevaciones que superan los 600 m.s.n.m (CECPAN & MMA, 2012), siendo el cerro Oncol la parte más alta, alcanzando 715 m.s.n.m. (Nuñez *et al.*, 2018). El suelo de tipo trumao predomina en el lado oriental de esta cordillera, formado a partir de cenizas volcánicas sobre arenisca cementada, desarrollando una topografía plana a ligeramente disectada (GORE Los Ríos, 2009). En el lado occidental de esta cordillera, predominan suelos metamórficos formados por esquistos, micaesquistos y pizarras (Schlatter *et al.*, 2003; Miranda, 2015).

Respecto a la diversidad de anfibios de esta zona, es posible encontrar 16 especies de ranas, pertenecientes a cinco familias: Alsodidae, Batrachylidae, Calyptocephalellidae, Leptodactylidae y Rhinodermatidae (Nuñez *et al.*, 2018) y con diferentes estados de conservación (Cuadro 1). Además,

sólo tres especies son endémicas: *Alsodes norae* (la rana de pecho espinoso de Oncol), *Eupsophus migueli* (rana de hojarasca de Mehuín) e *Insuetophrynus acarpicus* (rana verde de Mehuín) (CECPAN & MMA, 2012).

**Cuadro 1.** Especies de anfibios presentes en la Cordillera de Mahuidanche. La distribución geográfica de acuerdo con Rabanal & Nuñez (2008). Los estados de conservación están basados en IUCN (2017): DD= Insuficiente, CR= Peligro Crítico, EN= En Peligro, LC= Preocupación Menor, NT= Casi Amenazado, VU= Vulnerable.

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>Distribución geográfica</b>	<b>EC</b>
Alsodidae	<i>Alsodes nora</i>	Cerro Oncol (endémico de XIV Región)	DD
	<i>Alsodes valdiviensis</i>	Cerro Mirador, Cordillera Pelada (XIV Región)	EN
	<i>Eupsophus calcaratus</i>	Sur de Chile y Argentina (provincias de Chubut, Río Negro y Neuquén)	LC
	<i>Eupsophus migueli</i>	Mehuín y Queule (endémico de la XIV Región)	EN
	<i>Eupsophus roseus</i>	Desde Cautín (IX Región) hasta Valdivia (XIV Región)	NT
	<i>Eupsophus vertebralis</i>	Desde Ramadillas (VIII Región) hasta Valdivia (XIV Región)	NT
Batrachylidae	<i>Batrachyla antartantica</i>	Desde Mehuín (XIV región) a las Islas Virtudes (XII Región)	LC
	<i>Batrachyla leptopus</i>	Desde Los Queules (VII) hasta Cuenca Río Baker (XI Región)	LC
	<i>Batrachyla taeniata</i>	Desde la V Región hasta la XI Región	LC
	<i>Hylorina sylvatica</i>	Desde Ramadillas (VIII Región) hasta XI Región	LC
Calyptocephalellidae	<i>Calyptocephalella gayi</i>	Desde la IV Región hasta la X Región	VU
	<i>Telmatobufo australis</i>	Cordillera de la Costa entre las provincias de Valdivia y Osorno, hasta las laderas occidentales de la Cordillera de los Andes	LC
Leptodactylidae	<i>Pleurodema thaul</i>	Desde la II Región hasta la XI Región	LC
Rhinodermatidae	<i>Insuetophrynus acarpicus</i>	Queule y Colegual Alto (al norte) hasta Chan-chán (al sur), al sur de Llancahue (XIV Región)	CR
	<i>Rhinoderma darwini</i>	Desde la VIII Región hasta la XI Región	VU

### 2.3 *Eupsophus migueli* y el estado taxonómico de *E. altor*

*Eupsophus migueli* fue descrita por Formas (1978), desde la localidad de Mehuín, Región de los Ríos, Chile. Esta especie está ecológicamente asociada a zonas húmedas del bosque, se refugia bajo troncos caídos, rocas y hojarasca (Celis-Diez *et al.*, 2011). Desde el punto de vista morfológico es considerada de tamaño mediano, alcanzando los 36 mm de longitud hocico-cloaca. El hocico es suavemente agudizado en vista dorsal y lateral. Las extremidades posteriores son robustas y las anteriores delgadas. Los dedos y ortijos delgados y libres. De piel suave y sin granulaciones. La coloración dorsal es grisácea con grandes manchas marmóreas y la zona ventral es de color marmóreo oscuro con reticulaciones grisáceas. Las extremidades presentan un patrón de coloración en forma de brazaletes de pigmento oscuro. Coloración lateral es marmórea oscura. Los ojos son negros con una franja color dorado en la porción superior del iris. La pupila es horizontal. El anillo timpánico es visible (Rabanal & Nuñez, 2008). Su época reproductiva es desde noviembre y durante todo el verano (Celis-Diez *et al.*, 2011).

*Eupsophus altor* fue descrita por Nuñez *et al.* (2012), endémica de la Cordillera Costera Valdiviana, entre la desembocadura del río Valdivia y el río Lingue. Esta especie habita bajo troncos caídos y hojarasca (Nuñez *et al.*, 2012). Es una especie de tamaño mediano, alcanzando 40 mm de longitud hocico-cloaca. Tiene el hocico redondeado de vista dorsal y obtuso en vista lateral. Las extremidades posteriores son largas y esbeltas, al igual que las extremidades anteriores. De piel lisa. La coloración dorsal rosa rojizo con manchas de color gris claro y la zona ventral es blanca o cremosa. Las extremidades con brazaletes de color gris claro y los dedos de color blanquecino. La parte superior del iris de color amarillo con negro. La época reproductiva sucede desde mayo hasta agosto (Nuñez *et al.*, 2012). Correa *et al.* (2017), sobre la base de un análisis de delimitación de especies, considera que la diversidad específica de *Eupsophus* está sobredimensionada y sinonimiza varias especies, incluyendo *E. altor*, como sinónimo de *E. migueli*. Este estudio se basó en análisis moleculares de delimitación uni-locus y se apoyó en informaciones geográficas, morfológicas, bioacústicas y citogenéticas de la literatura, que hasta el momento presentan grandes vacíos. No obstante, en un reciente estudio de nuestro grupo de investigación, aplicamos varias técnicas coalescentes multi-locus para delimitar las especies de *Eupsophus* y encontramos que *E. migueli* y *E. altor* representan especies diferentes (Suárez-Villota *et al.*, 2018). Por lo tanto, la sinonimia de *E. altor* y *E. migueli* aún es materia de discusión.



## 2.4 Problema de Investigación

*Eupsophus migueli* es una especie de rana endémica que presenta un área de distribución restringida y de poblaciones fragmentadas en la localidad de Mehuín al norte del río Lingue (Región de Los Ríos). Actualmente, esta especie también incluye las poblaciones que se distribuyen al sur del río Lingue hasta la desembocadura del río Valdivia correspondientes a *E. altor*. Esta última especie ha sido recientemente sinonimizada con *E. migueli* y era considerada una rana endémica de la Cordillera Costera Valdiviana. Aunque la decisión taxonómica de sinonimizar *E. altor* y *E. migueli* es debatible, se hace necesario analizar desde el punto de vista genético-poblacional los posibles quiebres genéticos de *E. migueli* y la influencia del río Lingue como una posible barrera filogeográfica. Analizar la estructura y diversidad genética de *E. migueli* junto con identificar los límites en el rango de distribución de sus poblaciones facilitará la toma de decisiones y la generación de estrategias de conservación a largo plazo.

## 2.5 Hipótesis

El río Lingue constituye una barrera filogeográfica al flujo genético de *Eupsophus migueli* generando una marcada diferenciación genética entre las poblaciones al norte y al sur de este río.

## 2.6 Objetivos

### Objetivo General

Determinar la estructura y la diversidad genética en poblaciones de *Eupsophus migueli* a lo largo de su rango distribucional actual.

### Objetivos específicos

- I. Determinar la variabilidad genética que se encuentra dentro de la especie a través de marcadores mitocondriales y nucleares a lo largo de su rango distribucional.
- II. Estimar el grado de estructuración genético-espacial presentes en poblaciones de *E. migueli*.
- III. Evaluar las relaciones genealógicas de las poblaciones mediante inferencia filogenética.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Área de estudio

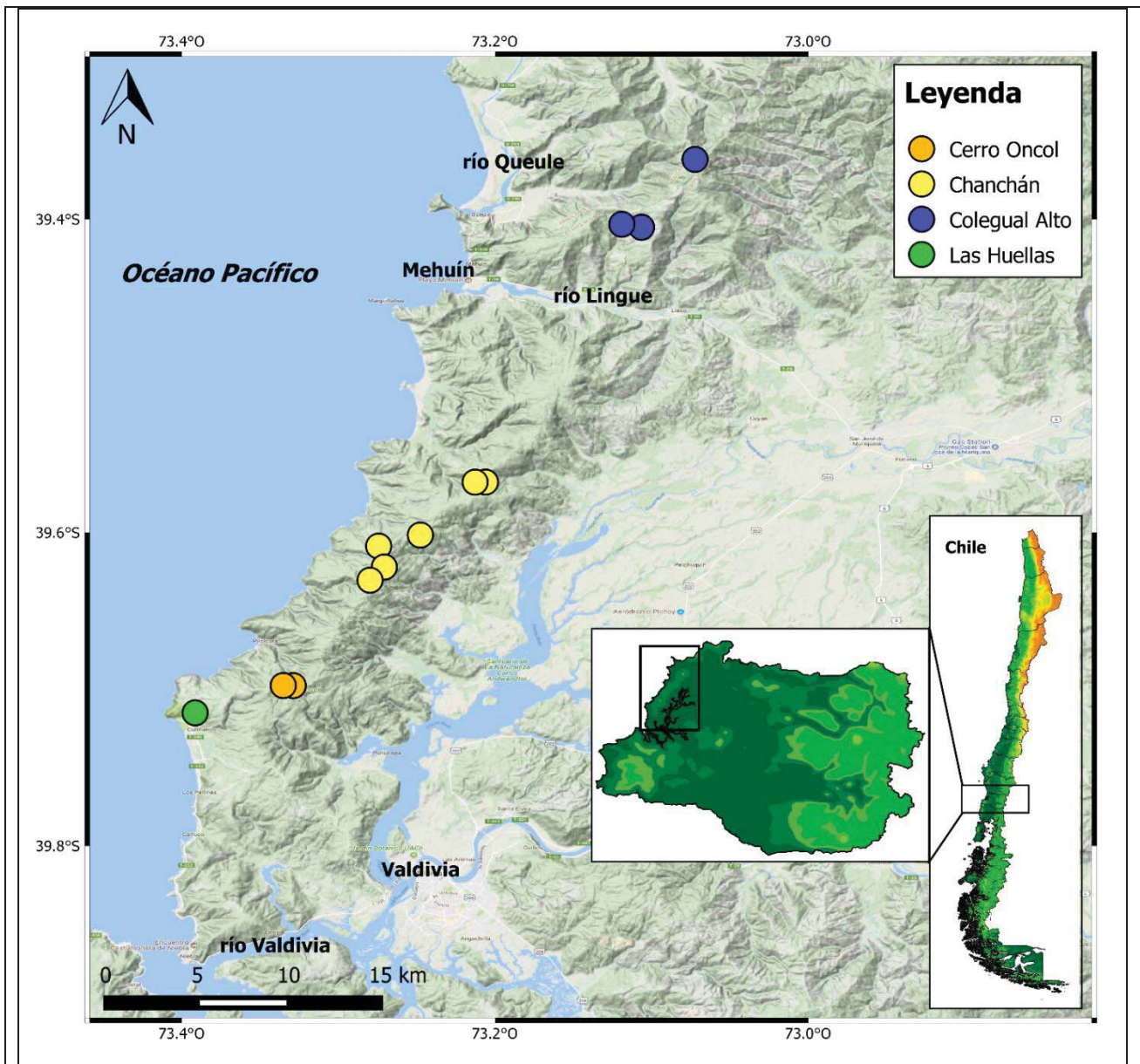
El área de estudio corresponde a la Cordillera de la Costa Valdiviana, en la Región de Los Ríos. Esta zona posee un clima templado-lluvioso y se caracteriza por tener altas precipitaciones y temperaturas moderadas por la influencia oceánica, alcanzando una media anual de 3.500 mm al nivel del mar hasta 6.700 mm en la parte alta de la Cordillera de la Costa (Navarro *et al.*, 2010), y una alta humedad con un promedio anual de 80% (Huber, 1970; Miranda, 2015). Caracterizado por un tipo forestal siempreverde, donde destaca la presencia de subtipo forestal Olivillo costero, con especies como *Luma apiculata*, *Eucryphia cordifolia*, *Myrceugenia planipes*, *Lomatia dentata* y *Amomyrtus luma* (Donoso, 2006). Las muestras se obtuvieron de doce puntos de muestreo correspondientes a las localidades de Cerro Oncol, Chanchán, Colegual Alto y Las Huellas (Cuadro 2). Se seleccionaron las localidades intentando representar toda la distribución geográfica de *E. migueli* (Figura 1).

**Cuadro 2.** Localidades de muestreo de especímenes de *E. migueli*.

Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Nº de muestras	Código
Cerro Oncol	39°41'51.73"	73°19'43.79"	6	EAON
	39°41'51.52"	73°20'6.69"	5	
Chanchán	39°34'3.93"	73°12'21.96"	11	EACC
	39°34'4.07"	73°12'45.84"	4	
	39°36'31.07"	73°16'27.45"	2	
	39°36'5.67"	73°14'51.62"	6	
	39°37'15.32"	73°16'11.88"	1	
Colegual Alto	39°37'30.52"	73°16'19.58"	2	EMME
	39°24'11.28"	73° 7'8.66"	13	
	39°24'18.12"	73° 6'23.39"	10	
Las Huellas	39°21'42.22"	73° 4'20.41"	3	EALH
	39°42'54.31"	73°23'29.15"	12	

### 3.1.2 Trabajo en campo y colecta de muestras

El trabajo en campo se realizó el 6 y 7 de octubre del 2017. Las muestras de los individuos se obtuvieron mediante prospecciones utilizando el método de relevamiento por encuentros visuales (REV), que consiste en buscar en todos los posibles lugares donde pueden estar los anfibios (Heyer *et al.*, 2001). Una vez capturados, se realizó un torulado bucal para la obtención de ADN (Broquet *et al.*, 2007). A cada tórula se le aplicó una gota de alcohol etílico al 100%, para posteriormente conservarlo en un tubo Eppendorf. Finalmente, cada punto se georreferenció con un GPS Garmin GPSmap 76CSx. Cada tubo se rotuló comenzando con las iniciales EM (de *E. migueli*) y por localidad de captura (Cerro Oncol (ON), Chanchán (CH), Colegual Alto (ME) y Las Huellas (LH)). Los individuos fueron liberados en su punto de hallazgo. La Corporación Nacional Forestal, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile permitió recolectar las muestras bucales de *E. migueli* en áreas silvestres protegidas (CONAF, Permiso No. 11 / 2016.-CPP / MDM / jcr / 29.02.2016). Por otra parte, fueron sacrificados seis individuos, siguiendo las recomendaciones del protocolo de bioética de la Universidad Austral de Chile (236/215) y del permiso de captura emitido por el Servicio Agrícola y Ganadero, Gobierno de Chile (SAG, RESOLUCIÓN EXENTA N°9244/2015). Las muestras de hígado fueron guardadas en etanol al 96% a -20°C hasta su posterior uso (ver extracción de ADN genómico, ítem 3.2.1)



## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extracción de ADN genómico

Para obtener el ADN genómico a partir de las tómulas bucales e hígado, se utilizó el método de resina de Chelex (5%) (Walsh *et al.*, 1991). Para ello se colocó la tórula o 0.5 cm<sup>3</sup> de tejido hepático en un tubo Eppendorf con 500 µL de resina (previamente preparada), luego se agregaron 10 µL de Proteinasa K (100 mg/mL) a cada tubo. Luego se mantuvieron los tubos durante 12 horas aproximadamente en una estufa a 56°C en una plataforma con agitado permanente. Después de transcurridas las 12 horas, se retiraron los tubos de la estufa y se agitaron por 10 segundos en Vortex, luego se calentaron a 95-100 °C por 5 minutos en un termoblock. Posteriormente se agitaron los tubos en Vortex por 15 segundos y se centrifugaron a 13.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, para sedimentar el Chelex. Finalmente se extrajo el sobrenadante entre 200 a 300 µL y fueron transferidos a nuevos tubos Eppendorf. Se extrajo el ADN de 75 individuos *E. migueli* (Cuadro 2). Las mediciones de la concentración de ADN en las muestras se realizaron en un Nanodrop, donde se midió la pureza del ADN a través de la relación de absorbancia 260/280.

### 3.2.2 Amplificación de ADN a través de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la PCR se utilizaron los siguientes componentes: 19,05 µL de agua desionizada, 2,5 µL de buffer 5X, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de dNTPs, 0,2 µL de Promega GoTaq y 0,5 µL de cada partidor, por último, se agregó 1 µL de ADN, para completar 25 µL de reacción de PCR. Se amplificaron tres regiones mitocondriales: citocromo oxidasa subunidad 1 (COI), citocromo *b* (Cyt-*b*) y un segmento de la región control (D-Loop), y una región nuclear: propiomelanocortina (POMC). Los partidores que fueron usados para amplificar cada uno de estos genes se indican en el Cuadro 3. Para las amplificaciones, la reacción de PCR incluyó una etapa de desnaturalización inicial de 30 segundos a 94 °C, seguida de 35 (fragmentos de genes mitocondriales) o 45 (fragmentos de genes nucleares) ciclos de amplificación (94 °C durante 30 segundos; 48-64 °C durante 30 s; 72 °C durante 60 s), con un paso de extensión final a 72 °C durante 6 min.

**Cuadro 3.** Región de ADN mitocondrial y nuclear, secuencia de partidor y tiempo/temperatura de reasociación que se utilizarán en este estudio.

<b>Región ADN</b>	<b>Partidores</b>	<b>Secuencia 5'- 3'</b>	<b>Tiempo/temperatura de reasociación (s/°C)</b>	<b>Fuente</b>
COI	HCO2198 LCO1490	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	30/46	Folmer <i>et al.</i> , 1994
Cyt- <i>b</i>	MVZ15-L CYTB-3	GAACTAATGGCCACACWWTACGNAA GGCAAATAGGAARTATCATTG	60/47-52	Moritz <i>et al.</i> , 1992
D-Loop	Control WRev-L Control P-H	GACATACTATGTATAATCGGCATTCA GTCCATAGATTCASTTCCCAG	30/48	Goebel <i>et al.</i> , 1999
POMC	POMC1 POMC-R	GAATGTATYAAAGMMTGCAAGATG GWCTGGGTCATGAATCCTCCRTATCT	30/52	Wiens <i>et al.</i> , 2005 Gamble <i>et al.</i> , 2008

### **3.2.3 Electroforesis en gel de agarosa**

La amplificación y el tamaño de los productos de PCR se verificó en geles de agarosa al 1% mediante electroforesis a 100 voltios constantes por 25 minutos. En cada pocillo se sembró 1  $\mu$ L de ADN amplificado mezclado con 2  $\mu$ L de 5x Green GoTaq Flexi Buffer. Se utilizó el marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Los productos de PCR fueron secuenciados en Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

### **3.2.4 Alineamiento de secuencias**

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) con el software Geneious v9.0.5 (GeneMatters Corp.) siguiendo los parámetros predeterminados del programa, seguido de un alineamiento manual.

### **3.2.5 Análisis genético poblacional**

#### **3.2.5.1 Análisis de diversidad genética**

Se utilizó el programa DnaSP versión 5.0 (Librado & Rozas, 2009) para identificar los haplotipos y además generar los índices de diversidad genética tales como: número de haplotipos (H), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (Hd) (Nei, 1987) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei & Li, 1979; Nei & Tajima, 1981). También se utilizó el programa Network versión 4.6.1.6 (Polzin & Daneschmand, 2001) utilizando el algoritmo *Median Joining*, para construir la red de haplotipos.

#### **3.2.5.2 Análisis de estructura genética**

La estructura genético-espacial se realizó mediante Geneland versión 4 (Guillot *et al.*, 2005; Guedj & Guillot, 2011) el cual determina y localiza discontinuidades genéticas entre poblaciones a partir de los genotipos de individuos georreferenciados, donde se puede estimar el número de poblaciones, cuantificar la dependencia espacial y analizar las barreras que afectan el flujo genético, entre otras tareas (Guillot *et al.*, 2009). Este paquete se ejecutó en R versión 3.1.2 mediante un modelo de frecuencias alélicas no correlacionadas para los marcadores mitocondriales y nuclear concatenados.

Sobre esta matriz se realizaron ocho corridas independientes de  $1,5 \times 10^7$  iteraciones, con un adelgazamiento ajustado de 500 y con un *burn-in* de 20%. El número de conglomerados recuperados por GENELAND se utilizó para el análisis de varianza molecular (AMOVA; Holsinger & Weir, 2009) ejecutado en ARLEQUIN versión 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), y para las comparaciones por pares del índice de estructura genética  $F_{ST}$ . Por lo tanto, el número más probable de conglomerados de población se definió con la combinación de estos dos enfoques.

### 3.2.6 Análisis demográfico

Se utilizó DnaSP versión 5.0 (Librado & Rozas, 2009) para evaluar si las secuencias evolucionaron bajo un modelo de neutralidad estricta a través de las pruebas D de Tajima (Tajima, 1989), Fu y Li (Fu & Li 1993) y el estadístico R2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Además, se generaron los gráficos de diferencias pareadas (*mismatch distribution*) por población utilizando la función “*Population Size Change*”. Para la elaboración de gráficos bayesianos que muestran el comportamiento del número efectivo poblacional en el tiempo (*Bayesian Skyline Plots*, BSP) se utilizó BEAUTi, el complemento del programa BEAST versión 2 (Bouckaert *et al.*, 2014), donde se utilizó el tutorial de Heled (2010). Previo a esto, se determinó para la matriz de marcadores mitocondriales y la matriz de POMC el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica con el programa JModeltest (Darriba *et al.*, 2012). Donde el modelo de mayor ajuste para la matriz mitocondrial fue HKY+I y para POMC fue JC69. Las tasas de sustituciones utilizadas para los genes mitocondriales fueron de 0,379173 y para POMC de 0,374114 (Irisarri *et al.*, 2012). Finalmente se ejecutó un archivo de salida en R, para la elaboración de los gráficos.

### 3.2.7 Análisis filogenético

Las relaciones filogenéticas se infirieron a través de los criterios de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (BI) utilizando las secuencias concatenadas de los tres marcadores mitocondriales y un marcador nuclear. Los árboles con el criterio de ML se infirieron utilizando el algoritmo rápido de Guindon y Gascuel (2003), implementado en PhyML 3.0, con un soporte de ramas evaluado con el *bootstrap* no paramétrico (Felsenstein, 1985) con 200 réplicas. Respecto a la inferencia Bayesiana se utilizó el programa MrBayes v.3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Cada cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) se realizó con un árbol al azar y se corrió con  $10 \times 10^7$  generaciones, se tomaron

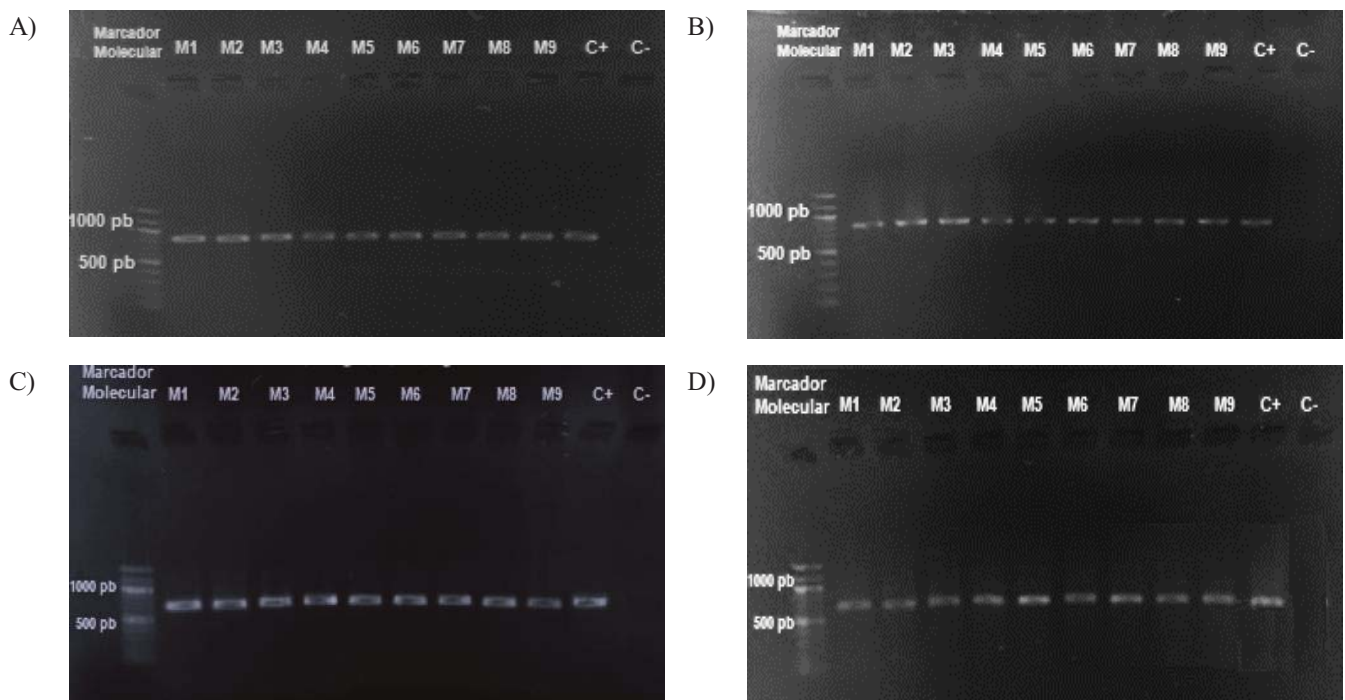


muestras cada 1000 generaciones de las cuales el primer 10% de los árboles muestreados se descartaron. El árbol de consenso resultante se editó con FigTree (Rambaut, 2014).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Extracción y amplificación de ADN

Se extrajo exitosamente el ADN de 75 muestras con una concentración ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) entre 42 y 601,4 y una pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ) entre 1 y 1,68 (Anexo 1). El total de las muestras fueron sometidas a amplificación los marcadores mitocondriales COI, *Cyt-b*, D-Loop y el marcador nuclear POMC. La Figura 2 muestra un ejemplo de las corridas electroforéticas de los productos PCR de ocho individuos con cada marcador molecular. Se obtuvo un tamaño aproximado de 900 pb (pares de bases) para el marcador mitocondrial COI (Figura 2A), 850 pb para el marcador mitocondrial *Cyt-b* (Figura 2B), 700 pb para D-Loop (Figura 2C) y 700 pb para el marcador nuclear POMC (Figura 2D).



**Figura 2.** Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 1 %, producto de amplificación de ADN con los marcadores mitocondriales COI (A) y *Cyt-b* (B), región control D-Loop (C) y el marcador nuclear POMC (D). Para todas las fotografías el pocillo número uno es el estándar del marcador molecular; M1 al M9: productos PCR para nueve individuos; C+: Control positivo y C-: Control negativo.

Para los análisis de diversidad genética, estructura y demografía se utilizó la matriz concatenada con los marcadores mitocondriales y el nuclear POMC, siendo un total de 2.260 sitios. En el análisis filogenético se utilizó una secuencia adicional considerada como grupo externo correspondiente a *Eupsophus vertebralis*. Además, se realizó una prueba preliminar de variación de secuencias (Cuadro 4). Donde el marcador nuclear POMC presentó sólo un sitio polimórfico. Por el contrario, la región D-Loop fue la más polimórfica, seguida por COI y Cyt-*b* con valores altos de sitios polimórficos.

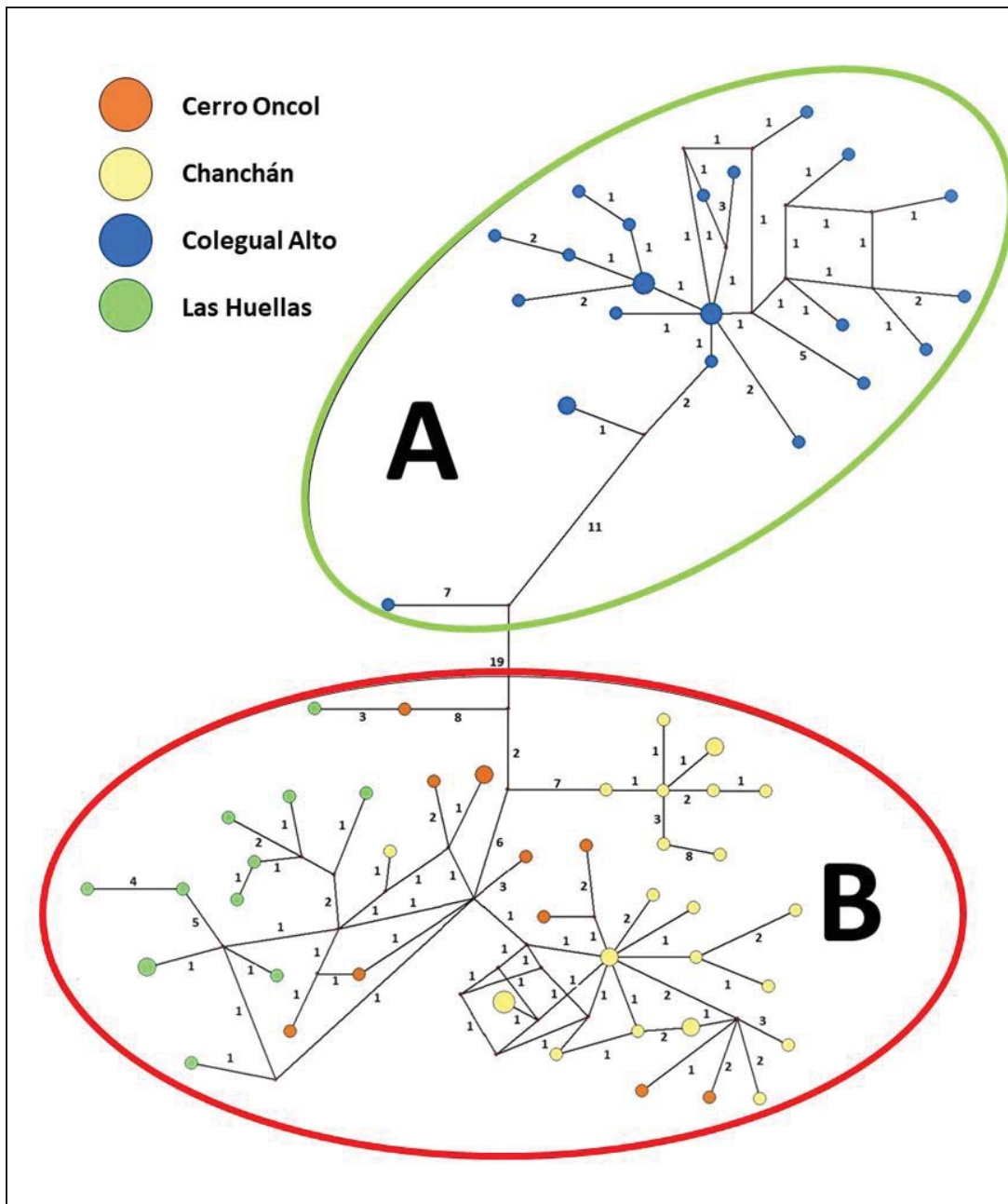
**Cuadro 4.** Valores de los parámetros de diversidad genética para cada marcador mitocondrial y nuclear. Hd: Diversidad haplotípica, S: Número de sitios polimórficos,  $\pi$ : Diversidad nucleotídica, H: Número de haplotipos.

<b>Marcador</b>	<b>Sitios</b>	<b>Hd</b>	<b>S</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>H</b>
COI	654	0,97412	65	0,02398	46
Cyt- <i>b</i>	569	0,98316	53	0,01809	38
D-Loop	519	0,98667	67	0,03342	55
POMC	519	0,34098	1	0,00066	2

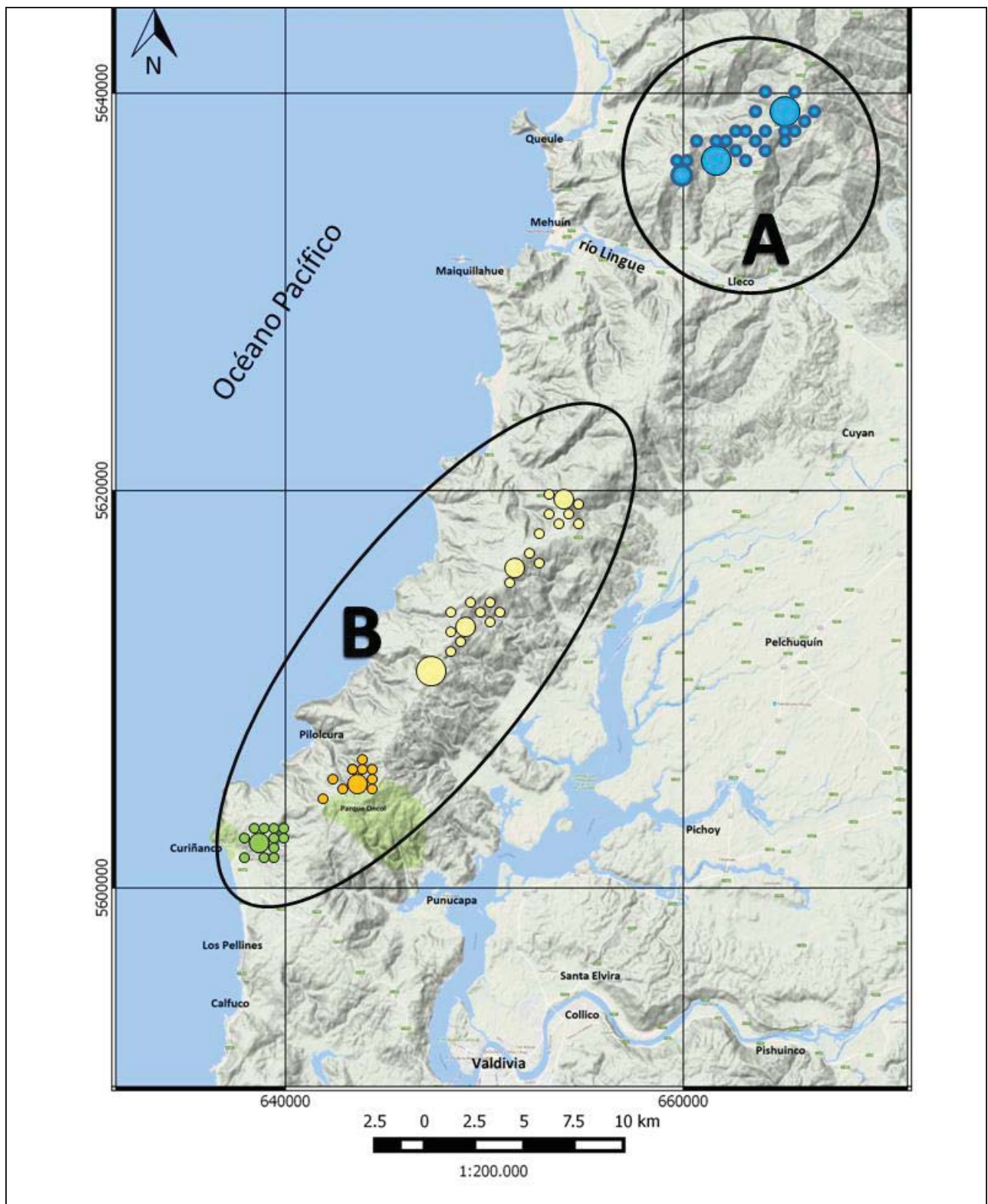
## 4.2 Análisis genético poblacional

### 4.2.1 Diversidad genética

Se observó en la red de haplotipos construida con los marcadores mitocondriales y nuclear para las poblaciones de *E. migueli* (Figura 3), que los 63 haplotipos presentes en los puntos de muestreo no comparten haplotipos entre localidades, obteniendo para Cerro Oncol desde el haplotipo 33 al 42, Chanchán desde el haplotipo 1 al 21, Colegual Alto desde el haplotipo 43 al 63 y Las Huellas desde el haplotipo 22 al 32. La red de haplotipos mostró dos haplogrupos separados por 19 pasos mutacionales (Figura 3). El haplogrupo A incluyó la localidad de Colegual Alto, representado geográficamente en la Figura 4. El haplogrupo B incluyó las localidades de Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas, también representada en la Figura 4. Por consiguiente, los siguientes análisis se realizaron por haplogrupo A y B.



**Figura 3.** Red de haplotipos obtenidas con el total de las secuencias para todas las localidades de *E. migueli* muestreadas: Cerro Oncol (verde), Chanchán (naranja), Colegual Alto (amarillo) y Las Huellas (verde). Cada círculo representa un haplotipo y el área de cada uno de ellos es proporcional al número de individuos; los colores representan la localidad muestreada; los números indican los pasos mutacionales entre haplotipos.



**Figura 4.** Distribución geográfica de haplogrupos. Haplogrupo A incluye a Colegual Alto (color azul) y el haplogrupo B incluye a Cerro Oncol (color naranja), Chanchán (color amarillo claro) y Las Huellas (color verde).

Para determinar la variabilidad genética intraespecífica, fueron separados los individuos por haplogrupo (Cuadro 5). Al respecto, el haplogrupo A presentó una diversidad haplotípica de 0,979 y una diversidad nucleotídica de 0,00342. El haplogrupo B presentó una diversidad haplotípica de 0,993 y una diversidad nucleotídica de 0,00634.

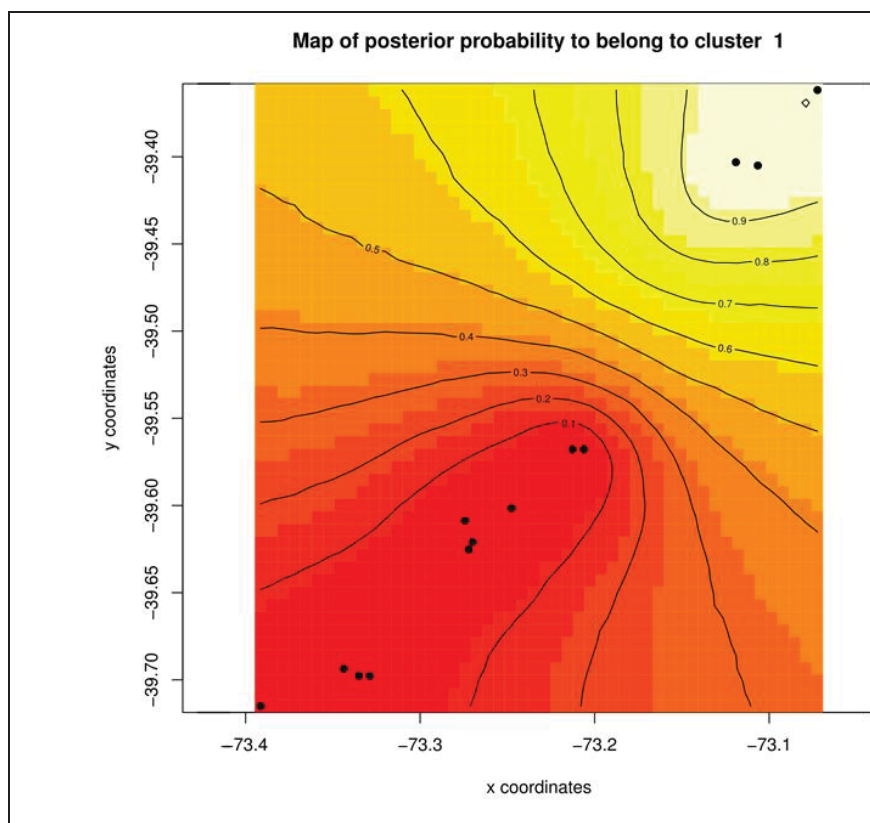
**Cuadro 5.** Valores de los parámetros de diversidad genética para cada haplogrupo de *E. migueli* con marcadores mitocondriales y nuclear. N: Número de muestras, Hd: Diversidad haplotípica, S: Número de sitios polimórficos,  $\pi$ : Diversidad nucleotídica, H: Número de haplotipos.

Haplogrupo	N	Hd	S	$\pi$	H
A	26	0,979	44	0,00342	21
B	49	0,993	75	0,00634	42
Total	75	0,995	119	0,01467	63

#### 4.2.2 Estructura genética

El análisis de estructura poblacional para *E. migueli* mostró dos grupos genéticos más probables ( $k=2$ , Figura 5A). Donde el grupo I (Figura 5B) corresponde a la población de Colegual Alto y el grupo II (Figura 5C) incluye las poblaciones de Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas. Donde las probabilidades de inclusión para el grupo I y II son de 0,9 (color amarillo claro) y las probabilidades de exclusión son de 0,1 (color rojo).

El análisis de AMOVA identificó valores significativos para la varianza genética en los tres niveles jerárquicos evaluados (entre grupo A y B, entre poblaciones dentro de grupos y dentro de las poblaciones; Cuadro 6). Indicando que la variación entre los grupos A y B (78%) es mayor a la variación entre poblaciones dentro de los grupos (5%). Además, la medida de diferenciación poblacional indica niveles moderados a altos de diferenciación genética entre los grupos A y B (0,78;  $P<0,05$ ), lo mismo sucede con la diferenciación genética entre poblaciones dentro de los grupos (0,83;  $P<0,05$ ). Por el contrario, la variación dentro de las poblaciones es baja (16%) con una baja diferenciación genética (0,23;  $P<0,05$ ).



**Figura 5.** Gráfico que muestra la agrupación más probable (probabilidad a posteriori) de los individuos de *E. migueli* en las localidades muestreadas. Las zonas con mayor probabilidad de agrupamiento se indican con amarillo claro, mientras que las menores son proporcionales al rojo. Los puntos negros representan las localidades de muestreo.

**Cuadro 6.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) para los grupos de *E. migueli*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación (P)	Índices de fijación ( $F_{st}$ )
Entre grupo A y B	606,446	17,42946	78,09419	0,78094
Entre poblaciones dentro de grupos	102,538	1,13895	5,10318	0,83197
Dentro de las poblaciones	236,256	3,75010	16,80263	0,23296
Total	945,240	22,31851		

### 4.3 Análisis demográficos

Ambos test de neutralidad, D de Tajima y Fu & Li, mostraron valores negativos para cada haplogrupo (Cuadro 7) y los valores de R2 fueron positivos: 0,0774 (Haplogrupo A) y 0,0670 (Haplogrupo B). Sin embargo, ningún valor alcanzó la significancia estadística en los test ( $p > 0.05$ ).

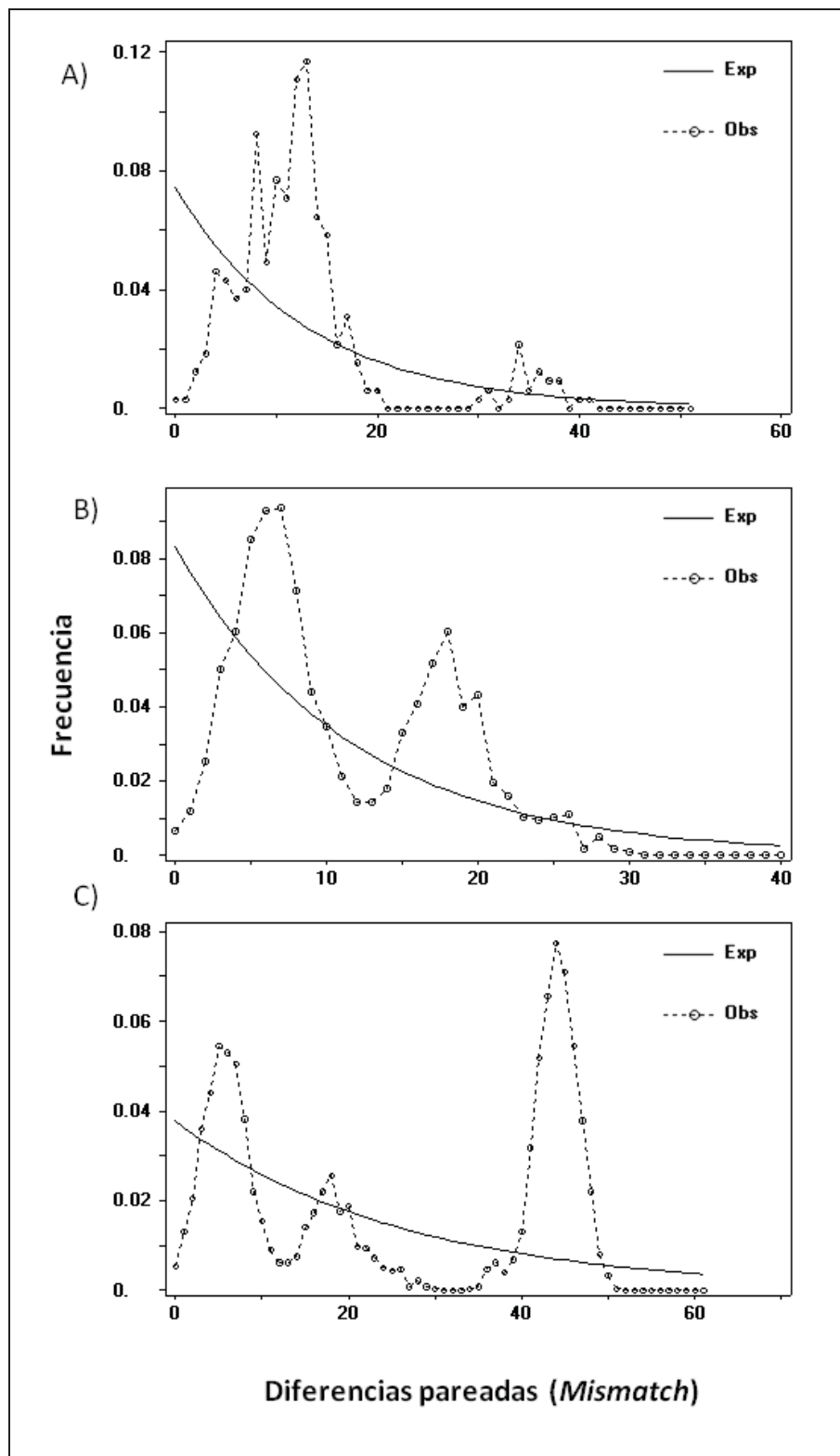
**Cuadro 7.** Valores de los test de neutralidad para cada haplogrupo de *E. migueli*. D de Tajima (D); D\* de Fu y Li; F\* de Fu y Li; R2 (Ramos-Onsins & Rozas).

Haplogrupo	N	D	D* Fu & Li	F* Fu & Li	R2
A	26	-1,60934	-2,41460	-2,53805	0,0774
B	49	-1,24554	-1,37368	-1,58369	0,0670
Total	75	0,05200	-1,14259	10,78902	0,1033

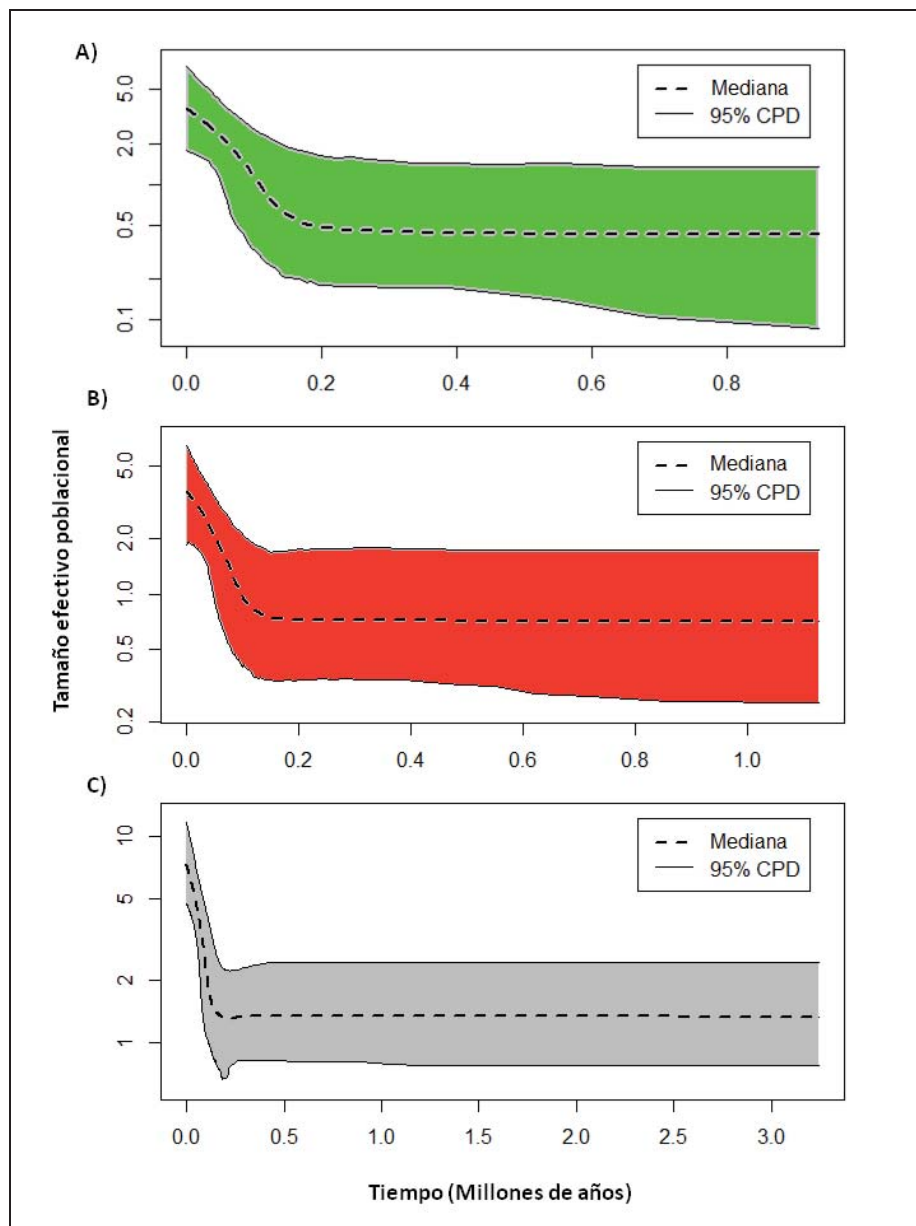
El análisis de distribuciones de diferencias pareadas (Figura 6), se observa para cada haplogrupo una curva con una distribución multimodal con una mayor incidencia de pocas diferencias, ajustándose a un modelo de tamaño poblacional constante.

Para explorar las posibles contracciones o expansiones los haplogrupos de *E. migueli*, se obtuvieron los siguientes gráficos de BSP (Figura 7). Según los gráficos, después de un prolongado período de tiempo con un tamaño poblacional constante, tal como se observa en el Haplogrupo A, es seguido por una expansión poblacional reciente que comenzó aproximadamente en los últimos 200.000 años (7A). Se observa un patrón similar para el Haplogrupo B, con un tamaño poblacional constante a lo largo del tiempo y una expansión poblacional posterior que comenzó hace 100.000 años (7B). Finalmente, para los haplogrupos de *E. migueli* en conjunto, se observa el mismo patrón que los haplogrupos por separado, pero con una expansión poblacional reciente (últimos 150.000 años) (7C).





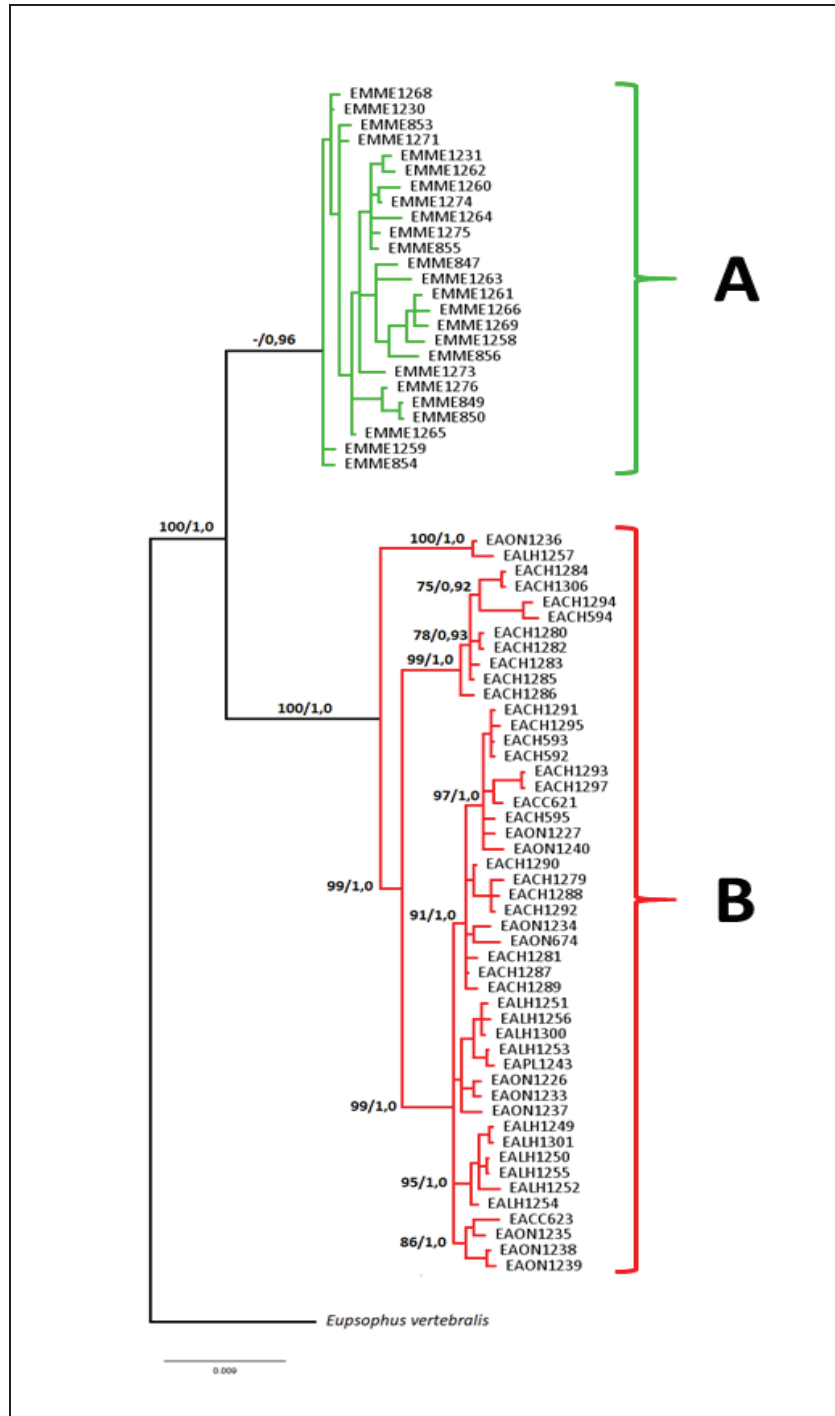
**Figura 6.** Distribución de diferencias pareadas (*Mismatch distribution*) observadas (línea punteada) y esperadas (línea continua) para: A) Haplogrupo A, B) Haplogrupo B y C) Total.



**Figura 7.** Resultados de *Skyline Plot* para cada población: A) Haplogrupo A B) Haplogrupo B y C) Total. La línea punteada representa la mediana de estimación y las líneas negras representan los intervalos de confianza (95%) inferiores y superiores.

#### **4.4 Análisis filogenético**

El análisis de máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI) revelaron topologías en su mayoría consistentes, a excepción por algunas ramas de punta con soportes bajos. En todos los casos, se evidenciaron dos grupos monofiléticos (Figura 8), sustentado por el valor máximo de soporte de ramas (bootstrap=100%; BPP=1,0). Todos los individuos de Colegual Alto se agruparon en un sólo clado (Clado A, Figura 8), sustentado por un alto valor de soporte de ramas (BPP=0,96). En el segundo clado (Clado B) se agruparon todos los individuos correspondientes a Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas, sustentado por un alto valor de soporte de ramas (bootstrap=100%; BPP=1,0).



**Figura 8.** Árbol filogenético que muestra las relaciones entre individuos *Eupsophus migueli* basadas en el total de secuencias concatenadas. El soporte de las ramas se basa en bootstrap de 200 réplicas y las probabilidades posteriores bayesianas (PPB). Individuos correspondientes a Colegal Alto se representa en color verde (Clado A) y los individuos pertenecientes a Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas representadas en color rojo (Clado B). De color negro el *outgroup* de *Eupsophus vertebralis*.

## 5. DISCUSIÓN

La diversidad genética se entiende como la variación de los genes dentro y entre especies, donde se reconocen tres atributos: composición (identidad y variación de genes), estructura (cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de una especie) y función (procesos evolutivos responsables de la dinámica de los genes en las poblaciones y la estructura genética) (Glowka *et al.*, 1996). Además, puede ser comparada en tres niveles: entre individuos de una población, entre poblaciones dentro de la misma especie y entre diferentes especies (Glowka *et al.*, 1996). El objetivo de este estudio fue determinar la influencia del río Lingue sobre la estructura y la diversidad genética en poblaciones de *E. migueli* a lo largo de su rango distribucional actual. Para esto se usaron datos de secuencia de ADN, las que han sido utilizadas con éxito para revelar la historia evolutiva de una especie y poder estimar la estructura geográfica de sus poblaciones (Avise, 2000; Hewitt, 2000).

### 5.1 Diversidad genética intraespecífica

Los individuos de *E. migueli* no comparten haplotipos por localidad, lo que indica que individuos al norte y sur del río Lingue se presentan de manera estructurada lo cual significa una mayor diferenciación, representando probablemente eventos antiguos de divergencia genética. Asimismo, el número de pasos mutacionales en la red de haplotipos genera una separación en dos haplogrupos: A) Colegual Alto y B) Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas. Además, los haplogrupos presentan una alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, según Nuñez *et al.* (2011) en un estudio filogeográfico de *Eupsophus calcaratus*, esos valores indican una expansión poblacional. En este caso, el haplogrupo A presenta una diferencia menor de diversidad genética que el haplogrupo B, aunque ambos haplogrupos presentan alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica. Este patrón puede ser atribuido a que ambos haplogrupos sufrieron un cuello de botella debido a la reducción en el tamaño efectivo de la población seguido por un crecimiento poblacional rápido (Grant & Bowen, 1998).

## 5.2 Estructura genética en poblaciones de *E. migueli*

La estructura genético-espacial de los individuos presentan una distribución alopátrica separados en dos grupos con alto soporte estadístico, quedando al Norte sólo individuos de la localidad de Colegual Alto y al Sur individuos pertenecientes a las localidades de Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas, lo que concuerda con la red de haplotipos. Al respecto Li *et al* (2009) indican que los sistemas fluviales funcionan como barreras sobre el patrón de distribución. En este caso, la distribución de los grupos de *E. migueli* podría ser explicado por la presencia del río Lingue, además esta barrera podría haber causado eventos vicariantes iniciales y que se mantienen por el continuo impedimento del río sobre el desplazamiento de las ranas (Li *et al.*, 2009). Además, el valor significativamente alto de estructuración ( $F_{st}=0,78$ ) indica una diferenciación genética alta entre los grupos al norte y sur del río Lingue. Algo similar se observó en el estudio de Igawa *et al.* (2013), que estudió la estructura genética, en este caso sugieren que el flujo de genes está limitado sólo a las poblaciones vecinas, generando un patrón de estructuración y aislamiento.

## 5.3 Demografía histórica

Los valores negativos no significativos en el test D de Tajima (1983) y Fu & Li (1993) obtenidos en las pruebas de neutralidad, indican que ha ocurrido o está ocurriendo una expansión poblacional (Fu & Li, 1993) y los valores positivos de  $R_2$  evidencian este suceso, aunque al no hay suficiente información para rechazar el modelo de población constante. Por otro lado, los BSP muestran señales de una reciente expansión poblacional para ambos grupos (entre los últimos 150.000-100.000 años), lo que concuerda con la historia geológica en la zona, el período Interglacial Valdivia (Latorre *et al.*, 2007), que ocurrió en los últimos 127 a 110 mil años. Sin embargo, las pruebas neutralidad no fueron estadísticamente significativas y los grupos presentaron curvas multimodales en el análisis de distribución de diferencias pareadas, lo cual se ajusta a un modelo de tamaño poblacional constante o equilibrio demográfico histórico (Rogers & Harpending, 1992). Esto se podría deber a que las poblaciones experimentaron una expansión reciente, luego se subdividieron, y experimentaron contracciones históricas (Ray *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012). En este sentido es posible que las técnicas Bayesianas como BSP sean más sensibles para detectar este tipo de fenómenos en el tiempo (Wang *et al.*, 2012).

#### 5.4 Relaciones genealógicas de las poblaciones de *E. migueli*

Una característica importante del árbol filogenético mostrado en la Figura 8 fue que los individuos muestran una asociación geográfica, separado en dos grupos monofiléticos al igual que los resultados anteriormente discutidos: 1) Colegual Alto (Clado A) y 2) Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas (Clado B). Según Wägele & Mayer (2007). A pesar de que los clados tienen un alto valor de soporte de ramas, dentro del clado B no se observa una estructura genética que tenga relación con la distribución geográfica de los individuos por localidad, puesto que se encuentran poco distanciadas geográficamente, factor que podría estar influenciando el flujo genético entre las poblaciones. Por el contrario, en el clado A, se observa una alta estructura genética, a pesar de que la poca distancia geográfica con las localidades del sur del río Lingue.

En este estudio se ha observado que a pesar de la cercanía geográfica entre Chanchán y Colegual Alto, no se agrupan en un solo clado, como lo observado entre las ranas de Cerro Oncol y Las Huellas. En este caso la distancia geográfica entre el clado A y B puede no ser un factor que mantiene la estructura genética entre ambos. Es probable que puedan estar actuando otras características del ambiente que limiten la dispersión, por ejemplo: gradientes climáticos o cambios en la topografía (Kozak *et al.*, 2008). Sin embargo, nosotros hipotetizamos que el río Lingue es el factor clave en la estructura genética observada (Figura 5, Cuadro 7). De hecho, Li *et al* (2009) propone que los ríos y montañas generan un fuerte impacto en el movimiento y proporcionan barreras significativas en anfibios.

#### 5.5 Implicaciones para la conservación

Los resultados obtenidos en este trabajo respaldan la hipótesis planteada, donde el río Lingue es propuesto como un factor importante en la diferenciación genética entre los clados de *E. migueli*. Se concluye así, que el clado B (que incluye las poblaciones de Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas) podrían corresponder a un taxón de nivel específico diferente (*E. altor*) a aquel de Colegual Alto, en este caso de *E. migueli*. Por lo anteriormente expuesto es que se sugiere que las poblaciones de Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas corresponden al taxón *E. altor*, lo que es respaldado por trabajos anteriores (Nuñez *et al.*, 2011; 2012) y recientes (Suárez-Villota *et al.*, 2018), donde sugieren que son dos especies diferentes. Esto se contradice con el trabajo de Correa *et al.* (2017), donde sinonimiza ambas especies, quedando sólo la especie nominal *E. migueli*. Además, la escasa literatura existente

(Formas, 1978; Iturra & Veloso, 1981; Iturra & Veloso, 1986; Nuñez *et al.*, 2012), ambas especies cuentan con pocos antecedentes biológicos. Por lo que la información preliminar obtenida en este estudio sobre la estructura y diversidad genética de ambas especies puede ofrecer un marco de referencia inicial para implementar medidas de conservación en sus poblaciones con el fin de preservar su diversidad genética y minimizar posibles riesgos de extinción, considerando el estado de conservación de *E. migueli* (En Peligro) (UICN, 2017) y *E. altor* sin estar catalogada en ninguna lista de especies protegidas.

Finalmente, el modelamiento de nicho ecológico puede proporcionar un complemento útil para los estudios moleculares, que explique los patrones evolutivos intraespecíficos a oscilaciones climáticas pasadas, ofrecer una hipótesis menos subjetiva y espacialmente explícita de patrones geográficos de distribución del pasado (Waltari *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012).



## 6. CONCLUSIONES

La diversidad genética presente en el Haplogrupo B, perteneciente al Sur del río Lingue (Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas) es relativamente más alta que aquella del Haplogrupo A. Por otra parte, la alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica en los haplogrupos son atribuidas a una reciente expansión poblacional que se puede relacionar con el retroceso glacial del Pleistoceno.

Los haplogrupos mostraron un alto grado de estructuración genético-espacial, separadas en dos grupos: A) Colegual Alto (al Norte del río Lingue) y B) Cerro Oncol, Chanchán y Las Huellas (al Sur de río Lingue). Asimismo, las relaciones genealógicas indican que los individuos al norte del río corresponden a un clado diferente a los individuos al sur del río.

Se puede concluir que el río Lingue representa al parecer una barrera filogeográfica sobre el flujo genético de *E. migueli*, generando una marcada estructuración genética en sus poblaciones, entre el Norte (Haplogrupo A) y Sur (Haplogrupo B) del río. Finalmente se propone la revalidación de *E. altor*, como especie válida al sur del río Lingue, con un análisis exhaustivo de delimitación de especies.

## 7. REFERENCIAS

- Avice JC, J Arnold, RM Ball, E Bermingham, T Lamb, JE Neigel, NC Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18(1): 489–522.
- Avice JC. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7(4):371–379.
- Avice JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 447 p.
- Avice JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36(1): 3–15.
- Bouckaert R, J Heled, D Kühnert, T Vaughan, CH Wu, D Xie, AJ Drummond. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* 10(4): e1003537.
- Broquet T, L Berset-Braendli, G Emaresi, L Fumagalli. 2007. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics* 8(2): 509–511.
- CECPAN (Centro de Estudios y Conservación del Patrimonio Cultural, CL), MMA (Ministerio del Medio Ambiente, CL). 2012. *Ranas de la Cordillera de la Costa Valdiviana*. Ministerio del Medio Ambiente, Región de Los Ríos. 24 p.
- Celis-Diez JL, S Ippi, A Charrier, C Garín. 2011. *Fauna de los bosques templados de Chile. Guía de campo de los vertebrados terrestres*. Concepción. Chile. Corporación Chilena de la Madera. 261 p.
- Cisternas M, J Frutos. 1994. Evolución tectónica paleogeográfica de la Cuenca Terciaria de los Andes del sur de Chile. 7º Congreso Geológico Chileno, Concepción, Actas, Vol. 1, pp. 6–12.
- Darriba D, GL Taboada, R Doallo, D Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- Donoso C. 2006. *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina: autoecología*. María Cuneo Ediciones. Valdivia. 678 p.
- Eguiarte LE, D Piñero. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias* 4(1): 34–47.
- Eguiarte LE, V Souza, X Aguirre. 2007. *Ecología Molecular*. Semanrant, Conabio, Inst. de Ecología UNAM. DF, México. 592 p.
- Excoffier L, G Laval, S Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1(1): 47–50.

- Formas JR. 1978. A new species of leptodactylid frog (*Eupsophus*) from the coastal range in southern Chile. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 13(1): 1–9.
- Folmer O, WR Hoeh, MB Black, RC Vrijenhoek. 1994. Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(1): 294–299.
- Freeland J R., 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, England. 449 p.
- Fu YX, WH Li. 1993. Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics* 133(3): 693–709.
- Fujita MK, AD Leaché, FT Burbrink, JA McGuire, C Moritz. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 27(9): 480–488.
- Gamble T, PB Berendzen, HB Shaffer, DE Starkey, AM Simons. 2008. Species limits and phylogeography of North American cricket frogs (*Acris*: Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(1): 112–125.
- Glowka L, F Burhenne-Guilmin, H Synge. 1996. Guía del Convenio sobre la Diversidad Biológica. UICN Gland y Cambridge. 179p.
- Goebel AM, JM Donnelly, ME Atz. 1999. PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11(1): 163–199.
- GORE (Gobierno Regional de Los Ríos, CL). 2009. Estrategia Regional de Desarrollo. Región de Los Ríos 2009 – 2019. Gobierno Regional. 146 p.
- Grant WS, BW Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89(5): 415–426.
- Guedj B, G Guillot. 2011. Estimating the location and shape of hybrid zones. *Molecular Ecology Resources* 11(6): 1119–1123.
- Guillot G, F Mortier, A Estoup. 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Resources* 5(3): 712–715.
- Guillot G, R Leblois, A Coulon, AC Frantz. 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology* 18(23): 4734–4756.
- Guindon S, O Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5): 696–704.

- Heled J. 2010. Extended Bayesian skyline plot tutorial. *Available from: tutorial. east. bio. ed. ac. uk/Tutorials.*
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405(6789): 907.
- Heyer W, M Donnelly, R McDiarmid, L Hayek, M Foster. 2001. *Medición y Monitoreo de la Diversidad Biológica: Métodos Estandarizados para Anfibios.* Comodoro Rivadavia, Argentina. Editorial Universitaria de la Patagonia. 349 p.
- Holsinger KE, BS Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . *Nature Reviews Genetics* 10(9): 639.
- Huber A. 1970. Diez años de observaciones climatológicas en la estación Teja-Valdivia (Chile) 1960-1969. Publicación Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Instituto de Geología y Geografía, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 60 p.
- Igawa T, S Oumi, S Katsuren, M Sumida. 2013. Population structure and landscape genetics of two endangered frog species of genus *Odorrana*: different scenarios on two islands. *Heredity* 110(1): 46.
- Irisarri I, D San Mauro, F Abascal, A Ohler, M Vences, R Zardoya. 2012. The origin of modern frogs (Neobatrachia) was accompanied by acceleration in mitochondrial and nuclear substitution rates. *BMC Genomics* 13(1): 626.
- Iturra P, A Veloso. 1981. Evidence for heteromorphic sex chromosomes in male amphibians (Anura: Leptodactylidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 31(2): 108–110.
- Iturra P, A Veloso. 1986. Further evidence for early sex chromosome differentiation of anuran species. *Genetica* 78(1): 25–31.
- Kozak KH, CH Graham, JJ Wiens. 2008. Integrating GIS-based environmental data into evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 23(3): 141–148.
- Le Roux JP, S Elgueta. 2000. Sedimentologic development of a late Oligocene–Miocene forearc embayment, Valdivia Basin Complex, southern Chile. *Sedimentary Geology* 130(1-2):27–44.
- Li R, W Chen, L Tu, J Fu. 2009. Rivers as barriers for high elevation amphibians: a phylogeographic analysis of the alpine stream frog of the Hengduan Mountains. *Journal of Zoology* 277(4): 309–316.
- Librado P, J Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11): 1451–1452.
- Lieberman BS. 2003. Unifying theory and methodology in biogeography. *En* Macintyre RJ, MT Clegg rds. *Evolutionary Biology.* Springer, Boston, MA. p.25.

- Lindenmayer DB, HP Possingham. 2013. No excuse for habitat destruction. *Science* 340(6133): 680–680.
- Llorente J, N Papavero, A Hernández. 2001. Síntesis Histórica de la Biogeografía. In Llorente-Bousquets J, JJ Morrone eds. Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: teorías, conceptos, métodos y aplicaciones. UNAM. México. p. 1–24.
- Miranda, PA. 2015. Catastro de Anfibios En Peligro y En Peligro Crítico de la Cordillera de Queule, Región de Los Ríos, Chile. Universidad Austral de Chile. Consultado 12 oct. 2017. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2015/fifm672c/doc/fifm672c.pdf>
- Moritz C, CJ Schneider, DB Wake. 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology* 41(3): 273–291.
- Moritz C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51(2): 238–254.
- Morrone JJ. 2000. Sistemática, biogeografía, evolución: Los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio. UNAM. México. Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias. 124 p.
- Morrone JJ. 2007. Hacia una biogeografía evolutiva. *Revista Chilena de Historia Natural* 80(4): 509–520.
- Navarro C, M Herrera, F Drake, P Donoso. 2010. Evaluación de la rentabilidad del manejo en bosques secundarios de canelo (*Drimys winteri*) en la Cordillera de la Costa de Valdivia, Chile. *Bosque* 31 (3): 209–218.
- Nei M, WH Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(10): 5269–5273.
- Nei M, F Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97(1): 145–163.
- Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press.
- Núñez JJ, NK Wood, FE Rabanal, FM Fontanella, JW Sites Jr. 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.
- Núñez JJ, FE Rabanal, JR Formas. 2012. Description of a new species of *Eupsophus* (Amphibia: Neobatrachia) from the Valdivian Coastal range, Southern Chile: an integrative taxonomic approach. *Zootaxa* 3305(1): 53–68.

- Nuñez JJ, AP Olivares, NI González, C Contreras-Carrillo. 2018. Anfibios de la Cordillera de la Costa Valdiviana: diversidad, vulnerabilidad y estrategias de conservación. En: Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile (Segunda Edición). *En prensa*.
- Polzin T, Daneshmand S. 2001. Network v4. Improved algorithms for the Steiner problem in networks. *Discrete Applied Mathematics* 112:263–300.
- Rabanal FE, JJ Nuñez. 2008. Anfibios de los bosques templados de Chile. Primera edición. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 206 p.
- Ramos-Onsins SE, J Rozas. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19(12): 2092–2100.
- Ray N, M Currat, L Excoffier. 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20(1): 76–86.
- Rogers AR, H Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3): 552–569.
- Ronquist F, M Teslenko, P Van der Mark, DL Ayres, A Darling, S Höhna, JP Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539–542.
- Schlatter JE, R Grez, V Gerding. 2003. Manual para el Reconocimiento de Suelos. 3a Ed. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 114 p.
- Smith-Ramírez C, JJ Armesto, C Valdovinos. 2005. Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile. Editorial Universitaria. 708 p.
- Suárez-Villota EY, CA Quercia, LM Díaz, VA Vera-Sovier, JJ Nuñez. 2018. Speciation in a biodiversity hotspot: phylogenetic relationships, species delimitation, and divergence times of the Patagonian ground frogs of *Eupsophus roseus* group (Alsodidae). *PloS One*. *Accepted*.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105(2): 437–460.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123(3): 585–595.
- Thompson JD, DG Higgins, TJ Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(1): 4673–4680.

- Vázquez-Domínguez E. 2002. Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. In Nelson G, JC Day, LM Sportza, J Loucky, C Vásquez eds. Protected areas and the regional planning imperative in North America. Univ. of Calgary Press, Canada. p. 369-378.
- Vázquez-Domínguez E. 2007. Filogeografía y Vertebrados. In Eguiarte L, V Souza, X Aguirre eds. La Ecología Molecular de Plantas y Animales. INE, México. p. 441–466.
- Wägele JW, C Mayer. 2007. Visualizing differences in phylogenetic information content of alignments and distinction of three classes of long-branch effects. *BMC Evolutionary Biology* 7(1): 147.
- Walsh PS, DA Metzger, R Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4): 506–513.
- Waltari E, RJ Hijmans, AT Peterson, ÁS Nyári, SL Perkins, RP Guralnick. 2007. Locating Pleistocene refugia: comparing phylogeographic and ecological niche model predictions. *PLoS one* 2(7): e563.
- Wang B, J Jiang, F Xie, C Li. 2012. Postglacial colonization of the Qinling Mountains: phylogeography of the Swelled Vent frog (*Feirana quadranus*). *PloS one* 7(7): e41579.
- Whittaker R. 1972. Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon* 21(2): 213–251.
- Wiens JJ, J Fetzner, CL Parkinson, TW Reeder. 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology* 54(5): 778–807.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Tabla de extracción de ADN por muestra

---

<b>ID</b>		
EACH592	57,2	1,37
EACH593	158,7	1,43
EACH594	506,7	1,43
EACH595	348,3	1,51
EACC621	150,5	1,38
EACC623	154,2	1,28
EMME847	65,4	1,34
EMME849	350,1	1,32
EMME850	207,8	1,00
EMME853	84,3	1,25
EMME854	101,2	1,37
EMME855	78,3	1,42
EMME856	42,0	1,19
EAON1226	72,8	1,57
EAON1227	357,4	1,68
EMME1230	70,4	1,56
EMME1231	117,9	1,67
EAON1232	105,8	1,45
EAON1233	117,5	1,4
EAON1234	271,2	1,45
EAON1235	211,0	1,5
EAON1236	101,7	1,45
EAON1237	61,3	1,56
EAON1238	59,7	1,52
EAON1239	42,3	1,42
EAON1240	121,9	1,52
EAPL1243	185,9	1,62
EALH1249	210,5	1,32
EALH1250	221,5	1,49

---



---

EALH1251	203,1	1,33
EALH1252	72	1,41
EALH1253	121,1	1,49
EALH1254	238,4	1,38
EALH1255	93,4	1,41
EALH1256	58,8	1,42
EALH1257	92,8	1,4
EMME1258	171	1,46
EMME1259	127,8	1,46
EMME1260	114,2	1,4
EMME1261	158,8	1,43
EMME1262	107,7	1,48
EMME1263	86	1,4
EMME1264	159,5	1,59
EMME1265	105,2	1,41
EMME1266	111,1	1,09
EMME1268	150,5	1,27
EMME1269	91,4	1,26
EMME1270	162,5	1,3
EMME1271	137	1,33
EMME1272	192,9	1,23
EMME1273	101,5	1,29
EMME1274	165,5	1,3
EMME1275	126	1,15
EMME1276	601,4	1,47
EACH1277	58,4	1,45
EACH1278	94,7	1,53
EACH1279	113,7	1,53
EACH1280	108,5	1,6
EACH1281	88,1	1,46
EACH1282	129,5	1,53
EACH1283	176,6	1,4

---

---

EACH1284	150,5	1,47
EACH1285	177,4	1,44
EACH1286	167,7	1,42
EACH1287	168,6	1,29
EACH1288	121,1	1,51
EACH1289	182,5	1,41
EACH1290	112,9	1,55
EACH1291	151,3	1,42
EACH1292	103,7	1,55
EACH1293	114,5	1,44
EACH1294	85,9	1,56
EACH1295	97,6	1,3
EACH1296	99,2	1,5
EACH1297	70,5	1,5
EALH1300	172,6	1,64
EALH1301	234,1	1,67
EACH1306	114,1	1,33

---