



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Ciencias

Profesor Patrocinante:

Dr. José J. Nuñez N.

Instituto de Zoología

Facultad de Ciencias

Diferenciación Haplotípica de *Eupsophus roseus* (Anura: Neobatrachia) a través de Secuencias Nucleotídicas de la Región Control Mitocondrial.

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de **Licenciado en Ciencias Biológicas.**

Camila Holzapfel Villaseca

Valdivia - Chile

2007

Dedicada a mis Padres

Agradecimientos

Agradezco profundamente

A mi estimado profesor, Dr. Nuñez, Pepe, por ser el pilar fundamental, en todo aspecto, de la realización de esta tesis, por compartir generosa y humildemente su experiencia con gran calidad docente, cercanía, calidez humana y humor, durante todo el transcurso de mi paso por el instituto.

Al Dr. Formas, por su invaluable apoyo a esta investigación, por sus consejos y, también, sus merecidos y queridos sermones.

A César Cuevas por compartir generosamente sus habilidades y conocimientos, en varias etapas del desarrollo de este estudio.

A la Sra. Rosario por su calidez e incansable trabajo, el cual me permitió hacer el mío.

A todos mis compañeros de laboratorio y a los integrantes del IZUA, por su gran calidad humana y de equipo.

Por otro lado, doy mil gracias

A la mamá por su cariño, por heredarme su inteligencia.

Al papá por su espíritu aventurero, por inculcarme el amor por la naturaleza, por su duro trabajo y por esa redonda pequeñez que se le ocurrió traer al mundo.

A mi familia en general por ser tan maravillosos, por hacerme lo que soy y permitirme estar donde estoy.

A Juan Pablo, mi amor, por su gran gran corazón, por su paciencia, por ser como es, por todo.

A mis querida amiga Dany, por compartir su cariño conmigo todos estos años y a su familia, especialmente a su mamá, por recibirme como la mía cada vez que yo caía.

A mis adoradas amigas Andrea y Paloma, por ser gran-diosas y por todo.

A mis abuelo por su sapiencia, a mi abuela por sus excentricidades y a ambos, junto a la Nelda, por recibirme aquí en Valdivia.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	I
Índice de Tablas	III
Índice de Figuras	IV
1. Resumen	VII
1.1. Abstract	VIII
2. Introducción	1
2.1. Hipótesis	5
2.2. Objetivo General	5
2.3. Objetivos Específicos	5
3. Material y Métodos	6
3.1. Captura de especímenes	6
3.2. Extracción de Sangre	6
3.3. Aislamiento de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) genómico	9
3.4. Electroforesis horizontal	9
3.5. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	10
3.6. Purificación de los productos de PCR	11
3.7. Secuenciación	12
3.8. Alineamiento de las secuencias	12
3.9. Análisis filogenético	12
3.9.1. Análisis de datos mediante Máxima Verosimilitud (ML)	12
3.9.2. Análisis de datos mediante estadística Bayesiana	14

3.10. Análisis de redes de haplotipos	14
4. Resultados	15
4.1. Obtención de sangre y aislamiento de DNA	15
4.2. Reacción en cadena de la Polimerasa y purificación de la región D-Loop	15
4.3. Secuenciación	19
4.4. Análisis filogenético	21
4.5. Análisis de redes de haplotipos	23
5. Discusión	28
5.1. Obtención de tejidos	28
5.2. Aislamiento de DNA y obtención de secuencias nucleotídicas	28
5.3. Análisis filogenético y de red de haplotipos	29
5.4. Conclusiones	33
6. Bibliografía	35
Anexo	44

Índice de Tablas

- Tabla 1.** Partidores utilizados para la amplificación de la región D-loop del 11
genoma mitocondrial de los especímenes de *E. roseus* y *E. migueli*
estudiados.
- Tabla 2.** Valores de probabilidad obtenidos por ML de los árboles utilizados 23
en la prueba de monofilia.

Índice de Figuras

- Figura 1.** Variabilidad en los patrones de dibujo y coloración en especímenes de *E. roseus* pertenecientes a dos localidades de la provincia de Valdivia (A, B, C, D, especímenes de Bosque Experimental San Martín; E, F, G, H, especímenes de Isla Teja). **3**
- Figura 2.** Extracción de sangre sin uso de anestesia, inmovilizando las extremidades posteriores y la parte superior del cuerpo entre los dedos de la mano, puncionando la vena abdominal y extrayendo suavemente la sangre. **8**
- Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa 0,7% de DNA total de diferentes individuos de *E. roseus* (1-13), se distinguen bandas de DNA y RNA. Λ : marcador tamaño molecular λ /Hind III. **16**
- Figura 4.** Electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1% de producto de PCR total, 120 μ l (flecha). Cada banda (1 y 2) corresponde a un individuo y fue cortada para su purificación con el *kit* QIAquick®. Las bandas superior e inferior corresponden respectivamente al inicio de la electroforesis y a posibles restos de dNTPs y partidores que no corresponden al peso molecular esperado. **15**
- Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR purificados. 1: Ladder, 2: ErSaval 07, 3: ErSaval 08, 4: ErSaval 09, 5: ErSaval 11, 6: ErSaval 12, 7: ErSaval 13, 8: ErSaval 14 (no todas las secuencias obtenidas de éstos fragmentos fueron incluidas en el análisis). **18**

- Figura 6.** Cromatograma de las secuencias ErSaval 14 y ErSaval 02, se observa, en el primer caso, la señal G (Guanina) superponiéndose a la señal normal y, en el segundo, el mismo fenómeno, pero en menor intensidad. En este estudio el alza de la señal Guanina fue considerada un artefacto de la secuenciación, por lo que se conservó la señal bajo ella. **20**
- Figura 7.** Cladograma generado por Máxima Verosimilitud (ML), representa las relaciones genealógicas entre los individuos de *E. roseus*, a partir de secuencias de la región D-Loop (región control) mitocondrial. Los valores de *bootstrap* se señalan sobre cada rama como resultado de 200 réplicas. **22**
- Figura 8.** Cladograma en el cual se han forzado los orígenes monofiléticos de los individuos del Parque Saval y Bosque Experimental San Martín para realizar la prueba de monofilia donde se estima si éste y otros cladogramas son significativamente diferentes mediante Máxima Verosimilitud. **25**
- Figura 9.** Cladograma de consenso por mayoría (50%) obtenido del análisis Bayesiano. Representa las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *E. roseus*. Los valores de la probabilidad *a posteriori* se muestran en las ramas. **26**
- Figura 10.** Diagrama formado por el programa TCS (Clement *et al.*, 2000). Representa las relaciones entre los diferentes haplotipos (letras en círculos azules grandes) junto a los cambios mutacionales ocurridos **27**

entre ellos (números en círculos verdes pequeños). Se enmarcan las dos localidades en, **a**: Bosque Experimental San Martín; y **b**: Parque Saval. Los diferentes haplotipos incluyen las siguientes secuencias, haplotipo **A**: ErSaval 03, ErSaval 05, ErSaval 04; haplotipo **B**: ErSaval 14; haplotipo **C**: ErSaval 02; haplotipo **D**: ErSaval 09; haplotipo **E**: ErSaval 06, ErSaval 07; haplotipo **F**: ErSaval 11, ErSaval 12; haplotipo **G**: ErSaval 08, ErSaval 13, ErSaval 15; haplotipo **Z**: ErSM 19, ErSM 21, ErSM 20, ErSM 23, ErSM 18; haplotipo **Y**: ErSM 22; haplotipo **X**: ErSM 14; haplotipo **W**: ErSM 13; haplotipo **V**: *E. migueli*.

Figura 11. Congruencias entre el cladograma formado por inferencia Bayesiana y **32** los haplotipos determinados en la red (letras rojas), donde la ancestralidad del haplotipo **A**, representado por ErSaval 03, es corroborada, entre otras coincidencias.

1. RESUMEN

Eupsophus roseus es una especie de anfibio que exhibe un alto polimorfismo en sus patrones de dibujo y coloración, lo que contrasta con la homogeneidad morfológica que presenta con otras especies del género. Lo anterior es causal de que aún existan interrogantes sobre sus límites de distribución. Para establecer herramientas que ayuden a dilucidar estos límites y realizar otros estudios intraespecíficos, en el presente estudio se analizan datos de secuencias nucleotídicas de la región control mitocondrial o D-Loop, de individuos pertenecientes a dos localidades de la provincia de Valdivia, Bosque Experimental San Martín y Parque Saval. Los análisis de máxima verosimilitud (ML) y Bayesiano, agrupan las secuencias pertenecientes a la localidad del Bosque Experimental San Martín y, al formar una red de haplotipos, las secuencias se distribuyen geográficamente. Así mismo, se resuelve una gran diferenciación respecto del grupo externo *E. migueli*. Esto hace predecir que la utilización de las secuencias de la región D-Loop mitocondrial es adecuada para la caracterización haplotípica de la especie y para establecer sus límites geográficos, entre otros.

1.1. Abstract

Eupsophus roseus is an amphibian that exhibits a high polymorphism in its patterns of drawing and coloration, which contrasts with the morphological homogeneity that presents with other species of the genus, it is for these reasons that queries still exist on their distribution limits. To establish tools that help to elucidate these limits and to carry out other intraespecific studies, in the present study, data of nucleotidic sequences of the mitochondrial control region or D-Loop, of individuals that belong to two localities of Valdivia province, Bosque Experimental San Martín and Parque Saval, were analyzed. Maximum likelihood (ML) and Bayesian analyses group the sequences of Bosque Experimental San Martín locality, and the realization of a haplotype network distributed the sequences geographically. Likewise, a great differentiation regarding the external group *E. Migueli* is solved. These results predict that the use of sequences of the mitochondrial D-loop is suitable for the haplotypic characterization of the species and to establish its geographical limits, among others.

2. INTRODUCCIÓN

Los anfibios anuros, actualmente en declinación en todo el mundo (Houlahan *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2004, La Marca *et al.*, 2005; Lips *et al.*, 2005), son importantes dentro de los ecosistemas por ser integrantes irremplazables de la cadena trófica y, a demás, por actuar como excelentes bioindicadores (Beebee *et al.*, 2005), es decir, que permiten conocer la calidad del medio ambiente que los alberga. Estas características han enfrentado a los especialistas en la materia a la necesidad de un conocimiento taxonómico acabado, siendo primordial la coordinación de esfuerzos y la optimización de recursos en ese ámbito; tanto a nivel local, como nacional e internacional (Glade, 1988; Formas, 1995; Ortiz & Díaz-Páez, 2006; Collins & Halliday 2005; Norris, 2007).

La batracofauna de los bosques templados del sur de Sudamérica, es en su mayoría endémica (Formas, 1995; Ortiz & Díaz-Páez, 2006), y aunque su conocimiento sistemático ha aumentado en los últimos años (Formas, 1979; Veloso & Navarro, 1988; Ortiz *et al.*, 1994; Nuñez, 2003; Correa *et al.*, 2006), aun no existe información disponible y fundamentada sobre los rangos de distribución y límites geográficos precisos de muchas de sus poblaciones (Formas, 1995; Díaz-Páez & Ortiz, 2003; Ortiz & Ibarra-Vidal, 2005).

Ejemplo de lo anterior es *Eupsophus roseus* (Dumèril & Bibron, 1841), anuro endémico de los bosques templados de Sudamérica, que se distribuye entre los 38° y 40° latitud sur y entre los 13 y 980 m de altitud (Nuñez, 2003). Esta especie posee un elevado grado de polimorfismo en los patrones de dibujo y coloración, tanto a nivel intra

como íter poblacional (Fig. 1); lo cual contrasta con la homogeneidad morfológica que presenta respecto a otras especies del grupo *roseus* (*E. calcaratus*, *E. insularis*, *E. migueli*) (Formas, 1992; Veloso *et al.*, 2005).

En el escenario anteriormente descrito, se han producido desde su descripción, una serie de problemas y reordenamientos nomenclaturales (*e. g.* Philippi, 1902; Cei, 1958; Grandison, 1961; Cei, 1962; Capurro, 1963; Formas, 1980; Formas & Vera, 1982; Nuñez *et al.*, 1999). Por ejemplo, Formas (1978a) analizó los cariotipos de tres poblaciones de *E. roseus* (Mehuín, Valdivia y Bosque San Martín), sugiriendo la existencia de más de una especie. Posteriormente, el mismo autor, describe a *E. migueli*, taxón endémico a la localidad de Mehuín (39°25'35''S; 73°12'46''O) (Formas, 1978b).

Actualmente, la situación nomenclatural de *E. roseus* es relativamente estable, sin embargo persisten interrogantes sobre los límites de distribución que presenta respecto a sus congéneres más cercanos geográficamente (*E. migueli*, *E. contulmoensis*, *E. calcaratus*, *E. nahuelbutensis*). Se ha señalado que el patrón de distribución de las especies del grupo *roseus*, es alopátrico (Formas & Brieva, 1994); pero en la descripción de especies tales como *E. nahuelbutensis* (Ortiz *et al.*, 1992) y *E. contulmoensis* (Ortiz *et al.*, 1989) se las señala en simpatria con *E. roseus*, y más recientemente, a ésta última con *E. migueli* (Méndez *et al.*, 2005). Por otra parte, los análisis de distribución geográfica, morfológicos y moleculares, establecen a *E. roseus* como una especie monofilética (Nuñez, 2003). No obstante, asumir la monofilia de un taxón sin realizar un estudio de variabilidad genética intraespecífico y sin establecer los

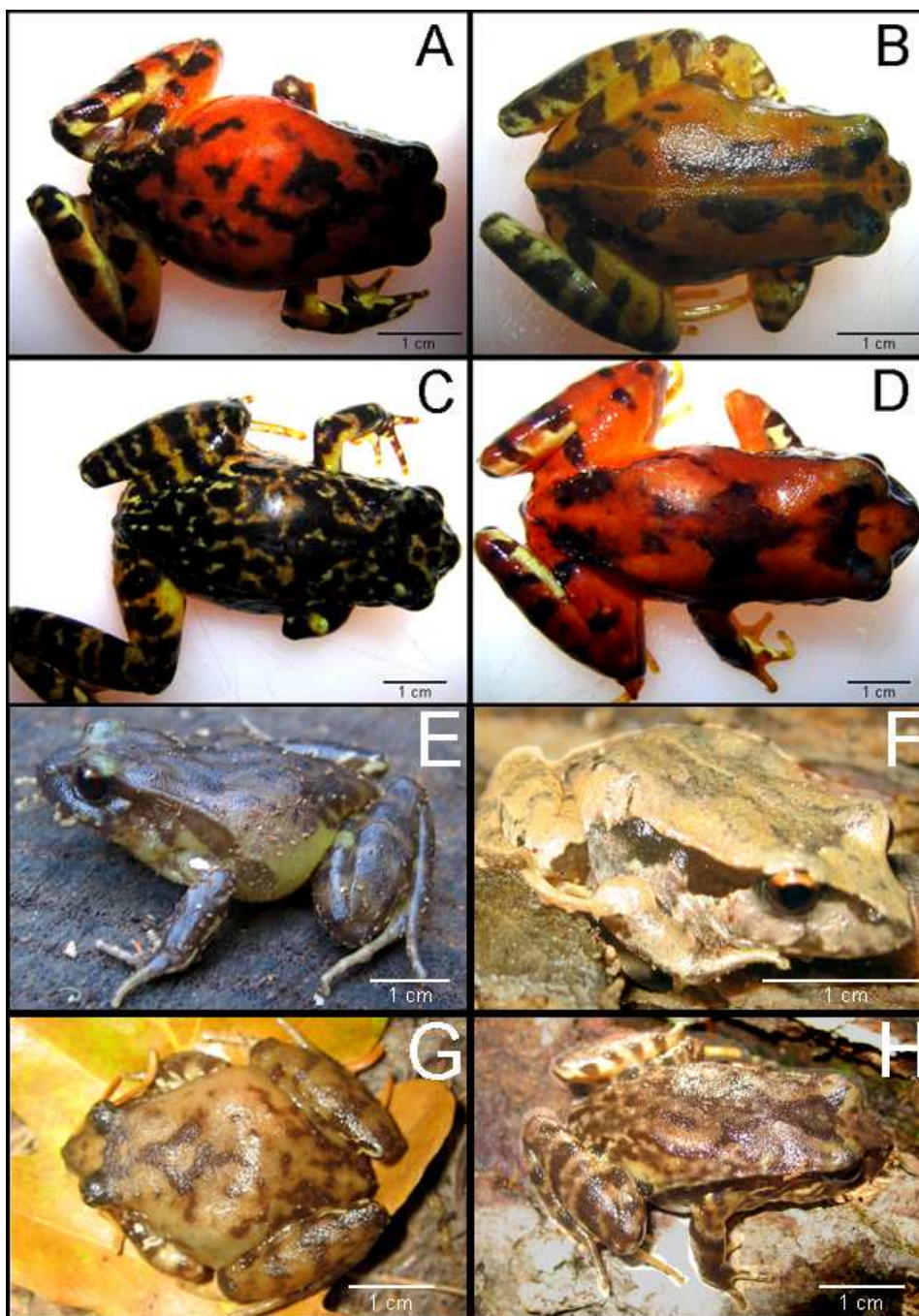


Figura 1. Variabilidad en los patrones de dibujo y coloración en especímenes de *E. roseus* pertenecientes a dos localidades de la provincia de Valdivia (A, B, C, D, especímenes de Bosque Experimental San Martín; E, F, G, H, especímenes de Isla Teja).

límites de su distribución geográfica, induce a conclusiones erróneas acerca de las relaciones entre las especies (Hare *et al.*, 2002).

En la proposición de filogenias y de estudios intraespecíficos, los caracteres moleculares han sido paulatinamente preferidos por sobre otras fuentes de información (Wiens & Reeder, 1995; Sumida *et al.*, 1998; Lanteri & Confalonieri, 2003). Lo anterior se debe, por una parte, a la neutralidad de los datos moleculares y a la relativa facilidad con que se puede obtener gran cantidad de información, y por otra, al desarrollo de métodos computacionales cada vez más confiables y objetivos al momento de inferir relaciones de parentesco (Huelsenbeck & Crandall, 1997; Avise, 2000; Nei & Kumar, 2000; Felsenstein, 2004).

La aplicación de estas metodologías al conocimiento de la diversidad y determinación de límites geográficos de las especies de anfibios de los bosques templados de Sudamérica, podría ser un complemento valioso al momento de determinar la riqueza biológica chilena y, más ampliamente, en la descripción y conservación de la diversidad biológica (Moritz *et al.*, 2000; Sites & Marshall, 2003; Smith-Ramirez *et al.*, 2005).

Sobre la base de los antecedentes expuestos, la presente Tesis tiene por objetivo evaluar la variabilidad de las secuencias de la región D-loop mitocondrial y realizar un análisis filogeográfico con los haplotipos obtenidos. Para ello, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

2.1. Hipótesis

Las secuencias de la región D-loop mitocondrial permiten diferenciar haplotipos, los que son apropiados para establecer límites geográficos y específicos de *E. roseus*.

2.2. Objetivo General

Realizar análisis filogenético y de red de haplotipos con secuencias obtenidas de la región D-Loop mitocondrial de especímenes de *E. roseus* pertenecientes a dos localidades de la provincia de Valdivia.

2.3. Objetivos Específicos

- Recolectar especímenes de *E. roseus* en el Bosque Experimental San Martín (San José de la Mariquina) y en el Parque Saval (Valdivia).
- Obtener muestras de tejido sanguíneo evitando el sacrificio del animal.
- Aislar DNA y estandarizar las condiciones de amplificación de un segmento de la región D-Loop mitocondrial.
- Realizar un análisis filogenético mediante aproximaciones probabilísticas (Máxima Verosimilitud y análisis Bayesiano).
- Construir una red de haplotipos mediante parsimonia estadística.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Captura de especímenes

3.1.1. Los especímenes de *E. roseus* se colectaron manualmente en el Bosque Experimental San Martín (39°38'55"S; 73°11'36"O) y en el parque Saval (39°48'03"S; 73°15'35"O) (localidades distantes entre sí por 18 km), entre los meses de enero y agosto del año 2005.

El traslado de los individuos a laboratorio fue realizado utilizando recipientes térmicos con hojarasca húmeda.

3.2. Extracción de Sangre

3.2.1. Cada espécimen se bañó en una solución de benzocaína al 0,2% (en un volumen que sólo alcanzara a tocar el vientre y muslos del animal) por 30 a 60 segundos, o hasta observar el inicio de la etapa de hiperactividad. Inmediatamente, se lavó con abundante agua limpia y fría (de vertiente o, purificada) con ayuda de una pizeta y se esperó el adormecimiento. Una vez anestesiado, se situó en posición decúbito dorsal, en una superficie limpia y libre de químicos, donde se prosiguió con la extracción de sangre (United States Geographical Survey, 2006).

Además, se realizaron extracciones a animales sin anestesiar, los que fueron inmovilizados por las articulaciones fémur-tibioperoné y cintura escapular con sus apéndices, entre los dedos de una mano limpia, desinfectada y libre de químicos, o con guantes de latex libres de talcos, para luego realizar la extracción de sangre con la mano diestra (Fig. 2) (C. Cuevas, com. Pers.).

3.2.2. Para la extracción se utilizaron jeringas de 0,5 ml y 30 *gauge* (ocupadas en administración de insulina) previamente heparinizadas. La obtención de sangre se hizo a través de la vena abdominal, visible externamente (Fig. 2). El tejido sanguíneo se almacenó en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml y se dejó decantar por cinco minutos a 4°C.

En aquellos casos en que, al decantar la parte figurada, el volumen de plasma fue mayor a 50 µl, se usó solo esta porción para el aislamiento de DNA. Si el volumen de plasma fue significativamente menor, se usó la cantidad total de sangre obtenida.

3.2.3. Los animales fueron devueltos a su localidad de origen después de la extracción de sangre.



Figura 2. Extracción de sangre sin uso de anestesia, inmovilizando las extremidades posteriores y la parte superior del cuerpo entre los dedos de la mano, puncionando la vena abdominal y extrayendo suavemente la sangre.

3.3. Aislamiento de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) genómico

El tejido sanguíneo se disgregó incubando en baño termostático a 50°C por una a dos horas junto a 200 µl de tampón STE 1X (NaCl 20 mM; Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,5), 15 µl de SDS 20% y 10 µl de proteinasa K 100 µg/ml (Invitrogen®) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, se realizó la extracción fenólica, añadiendo 200 µl de fenol saturado y agitando hasta obtener una emulsión, tras lo cual, se centrifugó en una microcentrífuga a 10.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente (22°C). La fase acuosa fue traspasada a un nuevo tubo, donde se agregaron 15 µl de acetato de sodio 3M pH 5,3 y dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C para precipitar el DNA. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 10.000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se diluyó en 100 µl de agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C (Sambrook *et al.*, 1989).

3.4. Electroforesis horizontal

Para verificar el alcance de la extracción, las muestras se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa 0,7% en tampón TBE 1x.

3.4.1. En una cámara electroforética (para 40 ml de gel y 300 ml de tampón) se montó el gel de agarosa en tampón TBE 1x (Tris 0,089 M; ác. Bórico 0,089 M; EDTA 5 mM; pH 8,3) al 0,7% mezclado con 3 µl de bromuro de etidio 0,5 µg/ml (stock: 10 mg/ml). Se agregó tampón TBE 1x hasta sumergir el gel, en los pocillos del cual se cargaron 6 µl de cada muestra de DNA previamente mezcladas con 2 µl de tampón de

carga (Glicerol, 40% TBE 1x, 0.025% Azul de Bromofenol). La cámara se expuso a una corriente de 30 mA por 2 hr (Sambrook *et al.*, 1989). El bromuro de etidio remanente en los elementos expuestos, se inactivó con HCl 0,2 % y fue desechado según norma institucional (Proyecto Administración Ambiental Corporativo, 2003).

3.4.2. Para la observación y documentación de los segmentos de DNA, los geles fueron visualizados sobre un transiluminador UV con la debida protección y fueron fotografiados con cámara fotográfica digital y filtro naranja. Los tamaños de los fragmentos obtenidos se determinaron por comparación con el marcador de tamaño molecular λ /Hind III y/o Ladder (escala) de 100 pb.

3.5. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

De cada muestra de DNA purificado, de *E. roseus* y de una muestra de *E. migueli* (IZUA 3477), 1 μ l se sometió a PCR en un tubo Eppendorf de 200 μ l junto a 5 μ l de tampón de PCR 10x, 1,5 μ l de MgCl₂, 2 μ l de mezcla de dNTPs (0,5 μ l de dATP; 0,5 μ l dGTP; 0,5 μ l de dCTP y 0,5 μ l de dTTP), 2 μ l de partidor ControlIPH 10 μ M, 2 μ l de partidor ControlJ2L 10 μ M (Tabla 1.), 0,5 de *Taq* Polimerasa 5 U/ μ l (Invitrogen®) y 37 μ l de agua desionizada estéril. Dicho procedimiento se realizó por triplicado.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de la región D-loop del genoma mitocondrial de los especímenes de *E. roseus* y *E. migueli* estudiados.

Partidor	Secuencia	Fuente
ControlJ2L	5' –GCA TTA CGT TCA CGA AGA TGG- 3'	Goebel <i>et al.</i> , 1999
ControlPH	5' –GTC CAT AGA TTC ACT TCC GTC AG- 3'	Goebel <i>et al.</i> , 1999

3.5.1. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Little Genius® (BIOER) bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 94° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación enzimática, constando cada ciclo de 45 segundos de denaturación a 92°C, 45 segundos de reasociación a 50°C y 50 segundos de extensión a 72°C. Finalizados los 35 ciclos, se expuso a 72°C por 7 min. para la etapa de extensión final. (Goebel *et al.*, 1999).

Luego, 10 µl de cada producto de PCR más 2 µl de tampón de carga fueron expuestos a electroforesis en gel de agarosa 1% para verificar el éxito del proceso.

3.6. Purificación de los productos de PCR

La totalidad del producto de PCR de cada muestra (120 µl), fue expuesta a electroforesis horizontal preparativa en gel de agarosa al 1%, con pocillos especialmente acondicionados para ese volumen. A continuación, los segmentos del gel que contenían la región D-loop mitocondrial amplificadas, fueron cortados con ayuda de una espátula limpia y el DNA contenido en dichos segmentos, se extrajo mediante el *kit* QIAquick® gel extraction kit (de QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.6.1. Las regiones D-loop amplificadas se expusieron a una última electroforesis confirmativa y los geles se fotografiaron para apoyar la etapa de secuenciación.

En los casos en que las bandas de producto de PCR, de individuos del Bosque San Martín, resultaron débiles, se efectuaron reamplificaciones, es decir, se realizó PCR sobre los productos de PCR (datos no mostrados).

3.7. Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo sobre una hebra del DNA utilizando el partidor ControlJ2L en un secuenciador automático (ABI PRISM, Universidad de Concepción).

3.8. Alineamiento de las secuencias

El alineamiento preliminar de las secuencias se hizo con el programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) utilizando las opciones predeterminadas para las penalidades a la apertura (10.00) y extensión (0.2) de *gaps* (espacios).

3.9. Análisis filogenético

En este estudio se utilizaron las aproximaciones probabilísticas de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana, debido a que utilizan modelos explícitos de evolución molecular.

3.9.1. Análisis de datos mediante Máxima Verosimilitud (ML)

Las secuencias alineadas se analizaron con el programa PAUP* 4.0 b10 (Swofford, 2001).

Para encontrar el modelo de evolución más adecuado a las secuencias se usó el programa MODELTEST 3.06 (Posada & Crandall, 1998), el que evalúa la probabilidad de 56 modelos de evolución a utilizar en la reconstrucción filogenética y en la selección del mejor árbol (Huelsenbeck & Crandall, 1997; Wilgenbusch & De Queiroz, 2000). El programa MODELTEST utiliza dos métodos para encontrar el modelo. El primer método es la prueba de la razón jerárquica de las probabilidades (HLRt, por sus siglas en inglés) basado en la comparación de probabilidades de cada modelo; y el segundo es el Criterio de Información Akaike (AIC, por sus siglas en inglés). El modelo seleccionado para este estudio, fue el generado por el criterio de información Akaike, por las ventajas expuestas y discutidas en Posada & Crandall (2001b).

Luego se procedió a la obtención del mejor árbol (el árbol más probable) mediante búsqueda heurística, adición de taxa al azar y permutación de ramas por TBR (Bisección y Reconexión del Árbol) con 10 réplicas; y, para constatar la robustez de cada clado, se llevó a cabo un análisis de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con 200 iteraciones, en el que un nodo se consideró con fuerte soporte si su valor de bootstrap fue igual o mayor a 70% (Hillis & Bull, 1993).

3.9.1.1. Una vez obtenido el mejor árbol, se realizó una prueba de monofilia (Huelsenbeck *et al.*, 1996; Huelsenbeck & Crandall, 1997), donde se compararon las probabilidades de diferentes cladogramas: el árbol obtenido por Máxima Verosimilitud (árbol 1), un árbol elaborado en base al cladograma de ML, pero con ambas poblaciones de *E. roseus* como clados separados (árbol 2) y, 10 árboles generados al azar por el programa PAUP (árboles 3-12) (Tabla 2).

3.9.2. Análisis de datos mediante estadística Bayesiana

Estos análisis se realizaron mediante el algoritmo de Cadena de Markov Monte-Carlo (Larget & Simon, 1999) con el programa MrBAYES 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). El árbol de partida fue elegido al azar y se realizaron dos corridas simultáneas por $1,75 \times 10^6$ generaciones, se muestrearon las cadenas a intervalos de 100 generaciones y los árboles generados se resumieron eliminando el primer cuartil (*burn-in*) para lograr una distribución de la probabilidad posterior sin tendencias.

3.10. Análisis de redes de haplotipos

Mediante el programa TCS (Clement *et al.*, 2000), basado en el método de Templeton, Crandall & Sing (Templeton *et al.*, 1992) y que emplea un algoritmo de parsimonia estadística, se construyó una red de haplotipos con la misma matriz de datos utilizada en los análisis filogenéticos (Posada & Crandall, 2001^a). Este algoritmo estima el máximo número de diferencias entre haplotipos como resultado de sustituciones individuales con un 95% de confianza. Posteriormente, conecta los haplotipos que difieren por un cambio, luego aquellos que difieren por dos y así sucesivamente, hasta que todos los haplotipos son incluidos. Para este estudio el límite de parsimonia se estableció a 95% y el límite de conexiones mutacionales a 43 pasos.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de sangre y aislamiento de DNA

La cantidad de sangre obtenida fue variable, de 50 a 200 μ l, dependiendo del tamaño del animal y de la eficacia de la extracción. La cantidad de DNA resultante fue generalmente suficiente para las reacciones de amplificación (Fig. 3).

4.2. Reacción en cadena de la Polimerasa y purificación de la región D-Loop

Las amplificaciones por PCR de muestras de DNA de *E. roseus* y *E. migueli*, con los partidores universales descritos para anfibios, ControlJ2L y ControlIPH (Goebel *et al.*, 1999). Generaron productos de aproximadamente 600 nucleótidos de longitud.

A pesar de que en la mayoría de los casos se reveló una banda secundaria de 200 pb, esta no se consideró en la purificación por no corresponder al tamaño molecular esperado (Fig. 4); y al realizar una electroforesis confirmativa del producto purificado, se observó un único fragmento (Fig. 5).

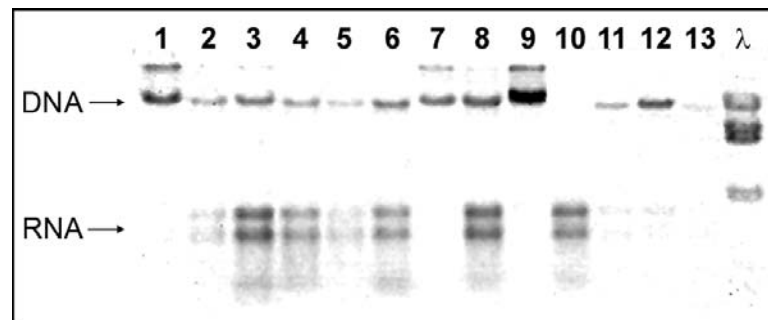


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 0,7% de DNA total de diferentes individuos de *E. roseus* (1-13), se distinguen bandas de DNA y RNA. λ : marcador tamaño molecular λ /*Hind III*.

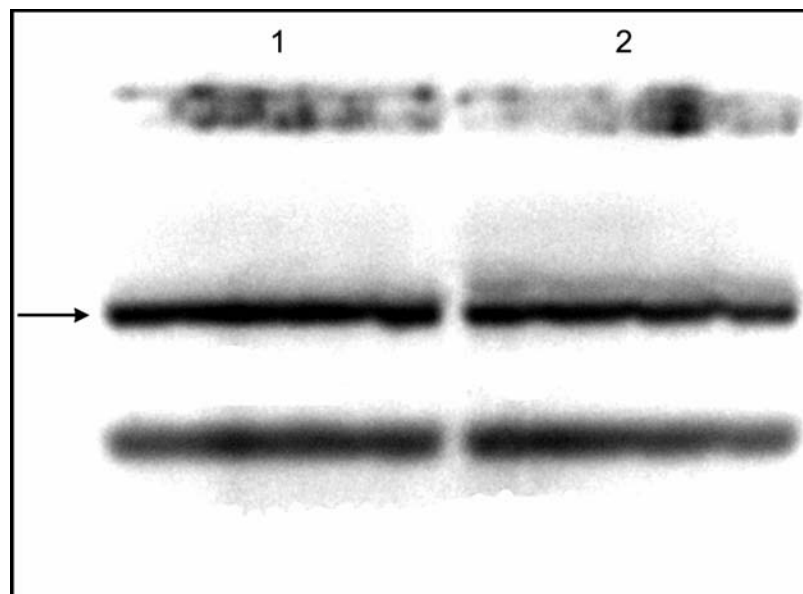


Figura 4. Electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1% de producto de PCR total, 120 μ l (indicado con una flecha). Cada banda (1 y 2) corresponde a un individuo y fue cortada para su posterior purificación mediante el *kit* QIAquick®. Las bandas superior e inferior corresponden respectivamente al inicio de la electroforesis y a posibles restos de dNTPs y partidores que no corresponden al peso molecular esperado.

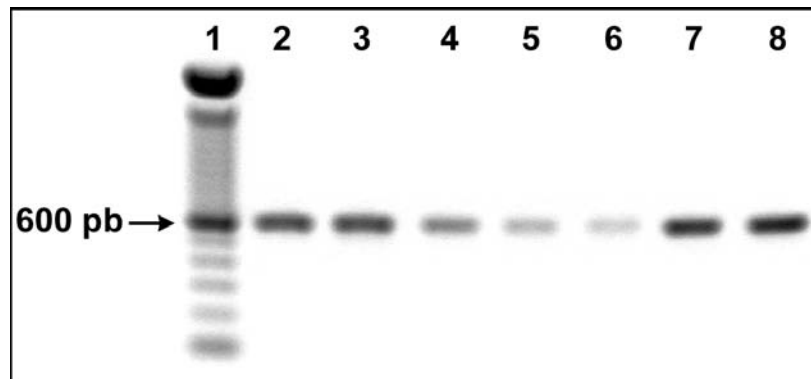


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR purificados. 1: Ladder, 2: ErSaval 07, 3: ErSaval 08, 4: ErSaval 09, 5: ErSaval 11, 6: ErSaval 12, 7: ErSaval 13, 8: ErSaval 14 (no todas las secuencias obtenidas de éstos fragmentos fueron incluidas en el análisis).

4.3. Secuenciación

La secuenciación de la región D-loop mitocondrial proporcionó diferentes resultados. La calidad de algunas de estas secuencias fue muy baja, por lo que fueron descartadas del estudio; otras secuencias resultaron ser de excelente calidad, con una longitud de 540 nucleótidos.

Varias presentaron una anomalía a la altura de las 150 bases, en que la señal de la Guanina se superponía en un rango de 3 a 12 bases a la señal normal de la secuencia, mientras en secuencias buenas ésta alza de la señal de Guanina existía, pero en baja proporción y sin superponerse a la señal normal. La decisión tomada frente a esta situación fue ignorar ésta alza de Guanina y conservar la clara señal bajo ella, aduciendo ésta alza a un artefacto del proceso de secuenciación (Fig. 6).

En determinados cromatogramas, sólo el principio de las secuencias fue claramente legible; pero hacia el final, la señal de las bases se volvió progresivamente pobre, difícil de leer y aumentó el nivel de ruido. Esta porción de mala calidad fue descartada y reemplazada por símbolos (ζ) que representaron el valor de dato faltante, con el fin de incluir en los análisis el rango utilizable de la secuencia, como se muestra en el anexo.

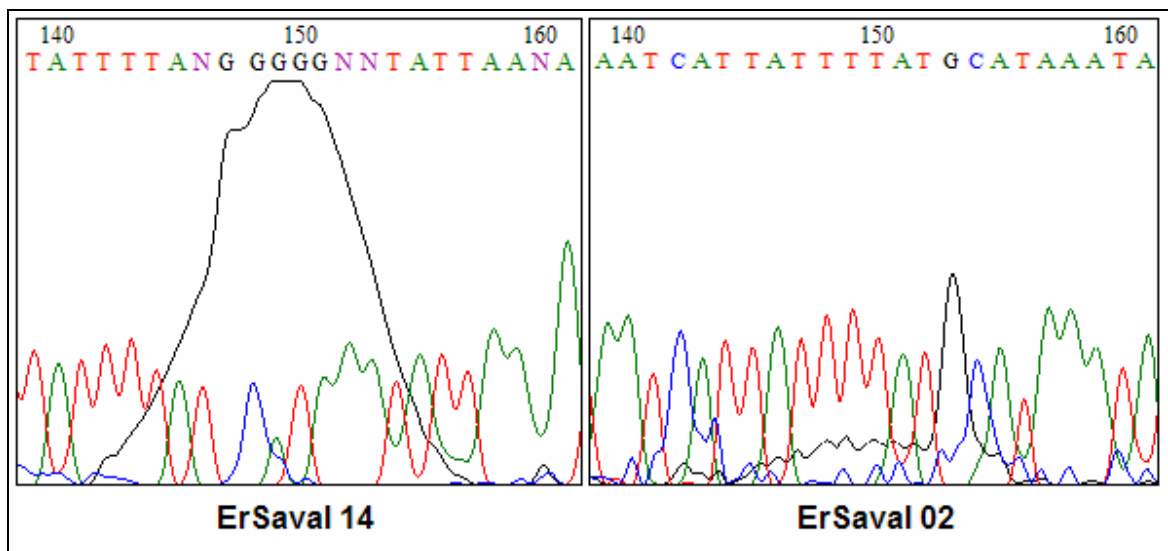


Figura 6. Cromatograma de las secuencias ErSaval 14 y ErSaval 02, se observa, en el primer caso, la señal G (Guanina) superponiéndose a la señal normal y, en el segundo, el mismo fenómeno, pero en menor intensidad. En este estudio el alza de la señal Guanina fue considerada un artefacto de la secuenciación, por lo que se conservó la señal bajo ella.

4.4. Análisis filogenéticos

4.4.1. Los análisis de datos mediante Máxima Verosimilitud entregaron valores de frecuencias nucleotídicas de A: 0,29500; C: 0,22980; G: 0,13520; T: 0,34000. El modelo de evolución seleccionado por el método HLRt fue el HKY+ Γ , y el seleccionado por el criterio de información Akaike, utilizado en los análisis posteriores, fue el de TRN+ Γ , el cual corresponde a una proporción de sitios invariables no significativa, una distribución gamma con un parámetro de forma (alfa): 0,1831 y número de categorías de tasa de cambio igual a 4.

En relación a la topología del cladograma (Fig. 7), este muestra dos clados principales en relación al grupo externo, conformados por secuencias del Parque Saval, uno de los cuales anida un subclado, con un valor de *bootstrap* igual a 65, que contiene todas las secuencias pertenecientes al Bosque San Martín. También se observa una gran proporción de multifurcaciones.

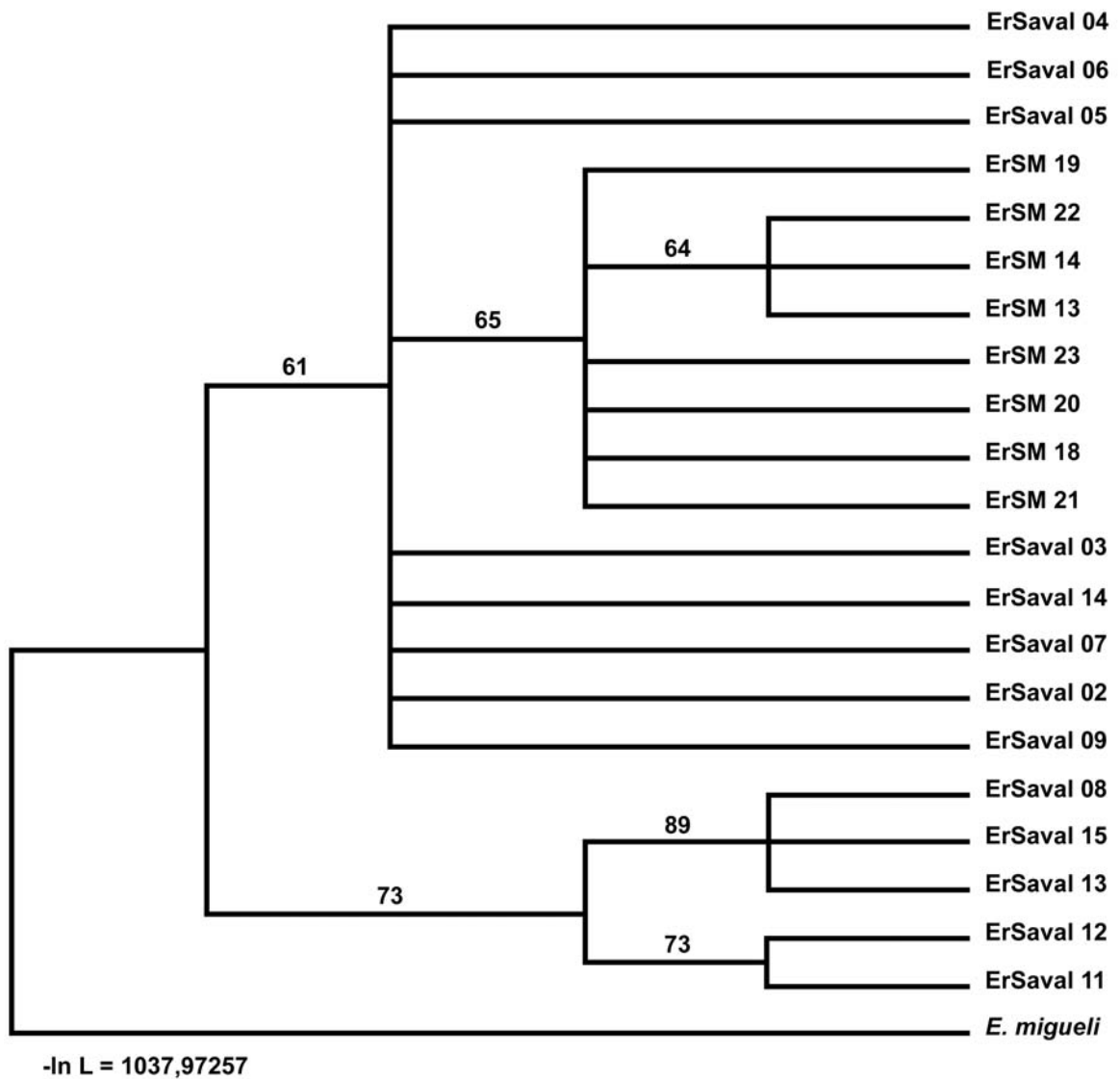


Figura 7. Cladograma generado por Máxima Verosimilitud (ML), representa las relaciones genealógicas entre los individuos de *E. roseus*, a partir de secuencias de la región D-Loop (región control) mitocondrial. Los valores de *bootstrap* se señalan sobre cada rama como resultado de 200 réplicas.

4.4.1.1. La prueba de monofilia se resume en la Tabla 2 y muestra que el árbol con la restricción de monofilia (Fig. 8) y los árboles formados al azar, no fueron más probables que el árbol obtenido por ML.

Tabla 2. Valores de probabilidad obtenidos por ML de los árboles utilizados en la prueba de monofilia.

Árbol	-ln L	Diff -ln L	P
1	1093,01991	(Mejor)	
2	1099,43866	6,41875	0,113
3	1279,34907	186,32916	0,000*
4	1289,84035	196,82044	0,000*
5	1270,05480	177,03489	0,000*
6	1280,05163	187,03172	0,000*
7	1281,50518	188,48527	0,000*
8	1199,18458	106,16467	0,005*
9	1276,99611	183,97620	0,000*
10	1297,20345	186,18353	0,000*
11	1267,99033	174,97042	0,000*
12	1265,71637	172,69646	0,000*

*=P<0,05

1: árbol óptimo obtenido de los análisis de ML

2: árbol de monofilia forzada para las secuencias de cada localidad

3-12: árboles generados al azar por programa computacional PAUP

4.4.2. La topología obtenida por análisis Bayesiano (Fig. 9) presenta un gran clado respecto del grupo externo, el cual anida al subclado (probabilidad *a posteriori* de 0,93) conformado por las secuencias del Bosque San Martín.

4.5. Análisis de redes de Haplotipos

Todos los haplotipos de *E. roseus* y *E. migueli* fueron exitosamente unidos en una sola red y distribuidos de acuerdo a sus respectivas localidades, por el programa TCS, el cual asignó un mayor peso de grupo externo al haplotipo **A**. Dos pasos

mutacionales separan las secuencias de ambas localidades. El haplotipo correspondiente a *E. migueli* fue unido a los haplotipos del Bosque San Martín, y separado por 43 pasos mutacionales de éste clado (Fig. 10).

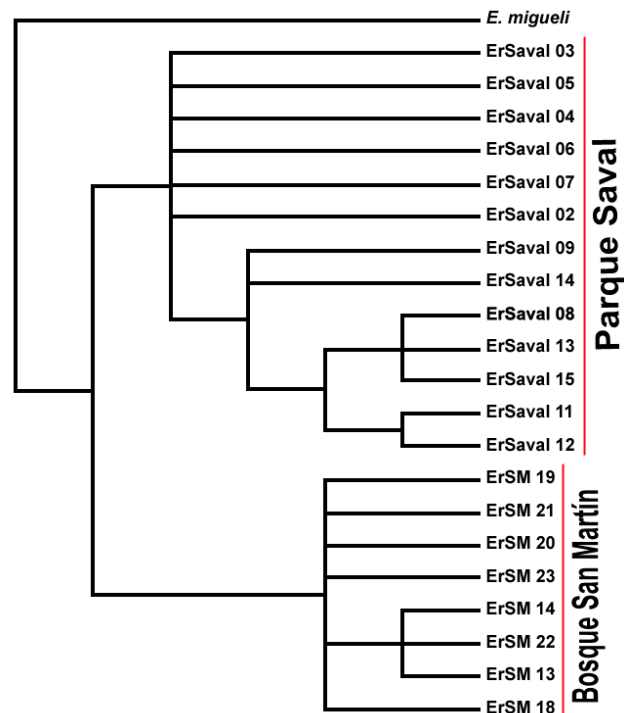


Figura 8. Cladograma en el cual se han forzado los orígenes monofiléticos de los individuos del Parque Saval y Bosque San Martín para realizar la prueba de monofilia, donde se estima si éste y otros cladogramas son significativamente diferentes mediante Máxima Verosimilitud.

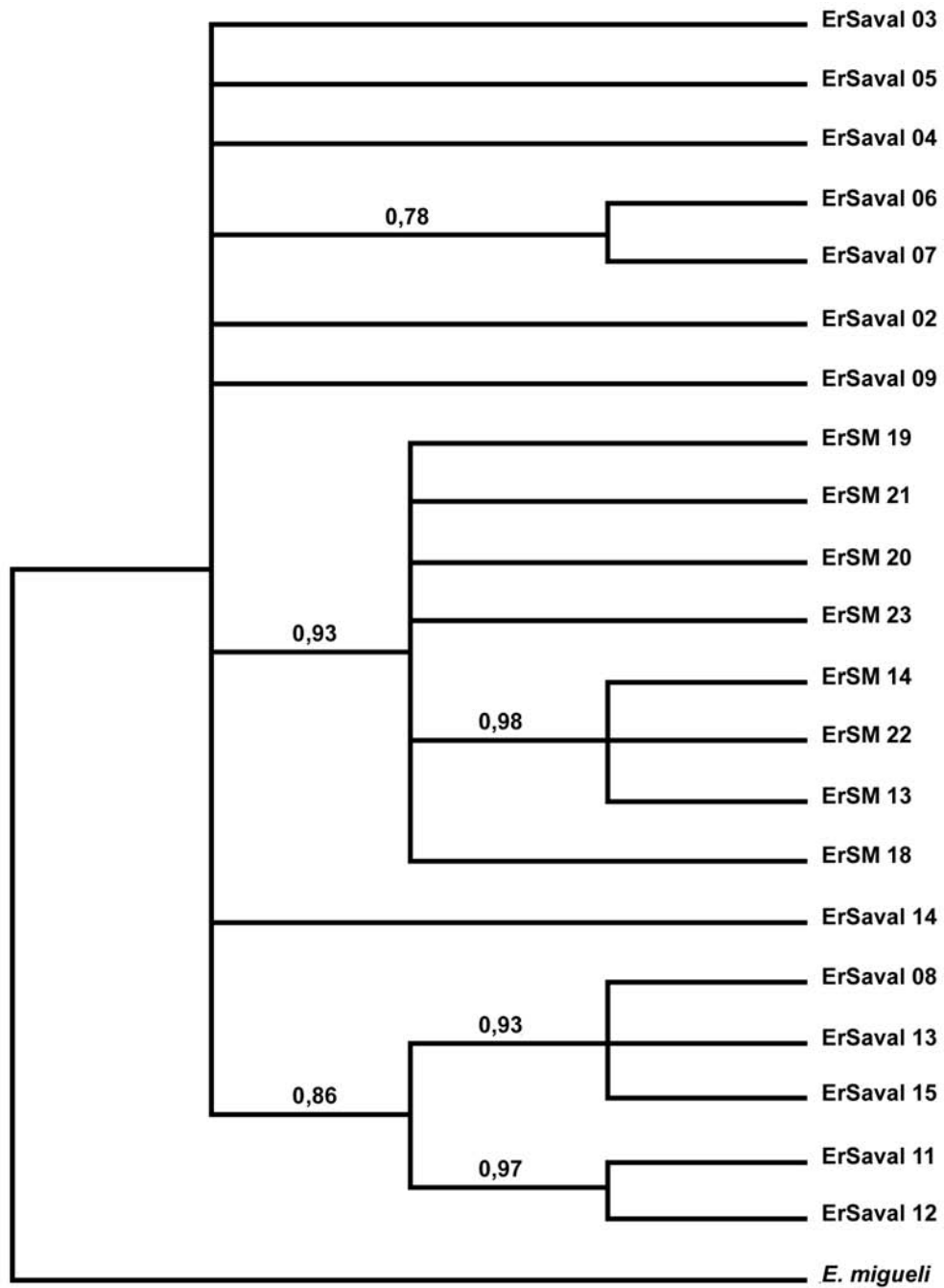


Figura 9. Cladograma de consenso por mayoría (50%) obtenido del análisis Bayesiano. Representa las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *E. roseus*. Los valores de la probabilidad *a posteriori* se muestran en las ramas.

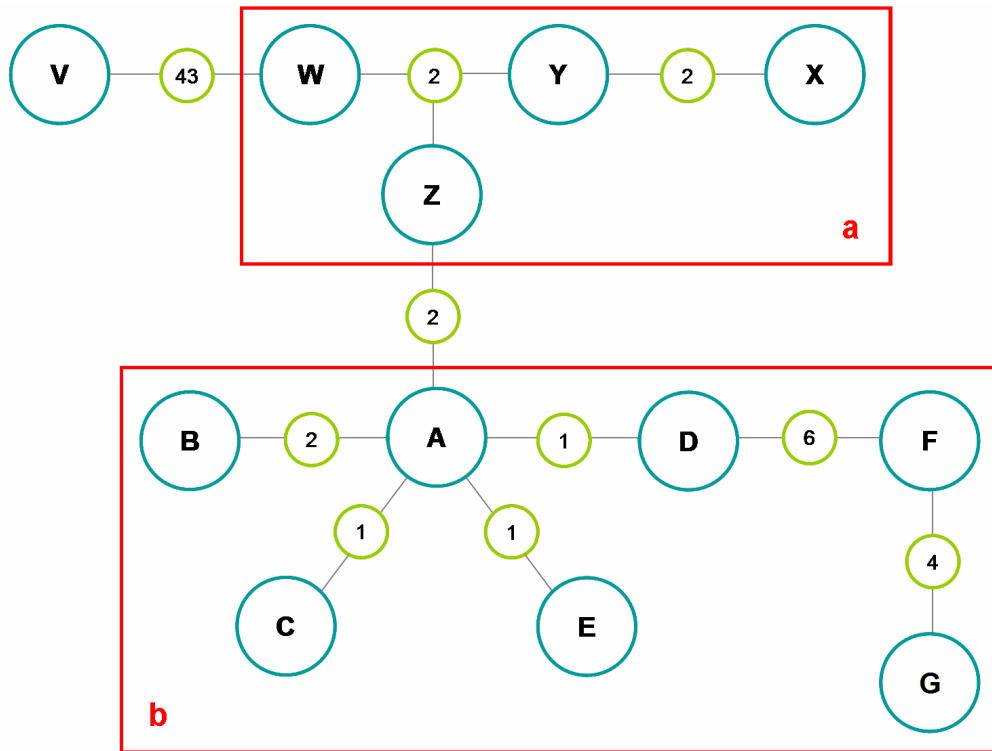


Figura 10. Diagrama formado por el programa TCS (Clement *et al.*, 2000). Representa las relaciones entre los diferentes haplotipos (letras en círculos azules grandes) junto a los cambios mutacionales ocurridos entre ellos (números en círculos verdes pequeños). Se enmarcan las dos localidades en, **a**: Bosque Experimental San Martín; y **b**: Parque Saval. Los diferentes haplotipos incluyen las siguientes secuencias, haplotipo **A**: ErSaval 03, ErSaval 05, ErSaval 04; haplotipo **B**: ErSaval 14; haplotipo **C**: ErSaval 02; haplotipo **D**: ErSaval 09; haplotipo **E**: ErSaval 06, ErSaval 07; haplotipo **F**: ErSaval 11, ErSaval 12; haplotipo **G**: ErSaval 08, ErSaval 13, ErSaval 15; haplotipo **Z**: ErSM 19, ErSM 21, ErSM 20, ErSM 23, ErSM 18; haplotipo **Y**: ErSM 22; haplotipo **X**: ErSM 14; haplotipo **W**: ErSM 13; haplotipo **V**: *E. migueli*.

5. DISCUSIÓN

5.1. Obtención de tejidos

Como es prioridad en los programas de genética de la conservación (Taberlet, 1999), en éste trabajo se utilizó la técnica menos invasiva y perjudicial posible, con el objetivo de limitar la perturbación y el daño al organismo estudiado. Aunque la extracción de sangre es un método invasivo y que requiere del manejo de los animales por períodos de tiempo relativamente largos, este se consideró menos perturbador que la amputación de dedos, por no representar un daño conocido permanente para el animal. El uso de anestesia no es recomendable, mientras no se cuente con protocolos sobre su aplicación a estos anfibios.

5.2. Aislamiento de DNA y obtención de secuencias nucleotídicas

Aunque la obtención de DNA a partir de tejido sanguíneo fue habitualmente exitosa; la etapa de extracción fenólica se tornó difícil, por lo que el uso de *kits* para el aislamiento de DNA de sangre es recomendable.

En éste estudio se utilizaron partidores de carácter universal para anfibios, lo que obligó a bajar la temperatura de reasociación a 50°C con el objetivo de disminuir la especificidad de la reacción. Esto puede haber generado que posibles restos de partidores, amplificaciones no específicas y dNTPs no utilizados en la reacción, se revelaran en forma de una banda difusa y de menor tamaño molecular, en la electroforesis de algunos productos de PCR.

No obstante, la obtención de secuencias fue mayoritariamente exitosa, estas resultaron del tamaño esperado según Goebel *et al.* (1999) y claramente legibles. Las excepciones se debieron seguramente, a la escasa cantidad de DNA disponible para la reacción de secuenciación en los productos de PCR de determinadas muestras. Esto sería el causal de que la claridad y calidad de ésta disminuyera hacia el final de la secuencia. Razón por la cual, con el objetivo de incluir en los análisis el mayor número de muestras posible, este segmento se reemplazó con el símbolo de *missing data* (?) (dato faltante) (Anexo). Esta medida pudo haber afectado los resultados, ya que en los análisis estos haplotipos aparecen agrupados; lo cual, para el objetivo de este estudio, de tipo preliminar, no representa un problema mayor.

5.3. Análisis filogenéticos y de red de haplotipos

La topología de ambos árboles filogenéticos distingue claramente la monofilia del grupo de secuencias del Bosque San Martín, pero no resuelve la diferenciación entre las dos localidades. Lo que sí se logra observando la red de haplotipos formada por TCS.

La mayor claridad y realidad en la exposición de los resultados mediante redes de haplotipos, en comparación a árboles filogenéticos, se debe a que la evolución a niveles intraespecíficos no puede ser siempre representada por un árbol de bifurcaciones, ya que usualmente las genealogías a este nivel son multifurcadas, genes descendientes coexistiendo con los ancestrales, junto a eventos de recombinación producen relaciones reticuladas (Clement *et al.*, 2000; Posada & Crandall, 2001a).

Es por esto que se han desarrollado aproximaciones de conexiones en red para estimar genealogías intraespecíficas (Bandelt & Dress, 1992; Templeton *et al.*, 1992; Excoffier & Smouse, 1994; Fitch, 1997; Smedmark *et al.*, 2005), y su uso se ha generalizado, en especial la aproximación basada en el método de Templeton *et al.* (1992), utilizada también en este estudio (*e. g.* Vilà *et al.*, 1999; Carnaval, 2002; Masta *et al.*, 2003; Heilveil & Berlocher, 2006), la cual toma en cuenta los fenómenos que ocurren a nivel intraespecífico y, emplea el algoritmo de parsimonia estadística (Huelsenbeck & Crandall 1997; Posada & Crandall, 2001a).

La segregación de los haplotipos en sus respectivas localidades, es decir, que no existan haplotipos compartidos, indica que el flujo de individuos y, por tanto, génico entre estas, debe ser muy bajo o nulo. Esto puede deberse a varias razones, si bien la vagilidad de estos animales no ha sido estudiada, se presume muy baja; esto junto al hecho de que sus larvas están restringidas a cavidades anegadas (Formas & Vera, 1980), causaría que la migración de individuos fuera de la Isla Teja, en épocas actuales, desde la formación de la isla, sea muy baja. También puede corresponder a elementos propios de la historia de vida de las genealogías de ambas localidades.

El programa TCS asigna un mayor peso de grupo externo al haplotipo más frecuente, que de acuerdo a la teoría de coalescencia, sería el más ancestral (Watterson & Guess, 1997; Donnelly & Tavaré, 1986; Crandall & Templeton, 1993; Clement *et al.*, 2000; Hein *et al.*, 2005), que en este caso sería el haplotipo **A** (tres secuencias, ErSaval 03; ErSaval 04; ErSaval 05), esto permite observar una ruta evolutiva a partir de éste haplotipo, causa que designaría a la localidad del Parque Saval como ancestral. La inclusión de la secuencia de *E. migueli* es usada para

demostrar la diferenciación respecto del grupo externo, la cual es considerable (43 pasos mutacionales) en relación a las diferencias intraespecíficas, con un máximo de seis pasos mutacionales entre haplotipos. El haplotipo de *E. migueli* fue vinculado al clado formado por las secuencias de *E. roseus* del Bosque San Martín, localidad que, precisamente, es la más cercana a su localidad tipo, Mehuín (Formas, 1978b) (25 km entre Mehuín y el Bosque San Martín; 42 km entre Mehuín y el Parque Saval).

Al analogar la red de haplotipos a los árboles filogenéticos, podemos encontrar equivalencias que ayudan a respaldar ambas aproximaciones. En este caso, las similitudes se dan especialmente con el cladograma formado por análisis bayesiano, donde, entre otros, se corrobora a ErSaval 03 como haplotipo ancestral (Fig. 11).

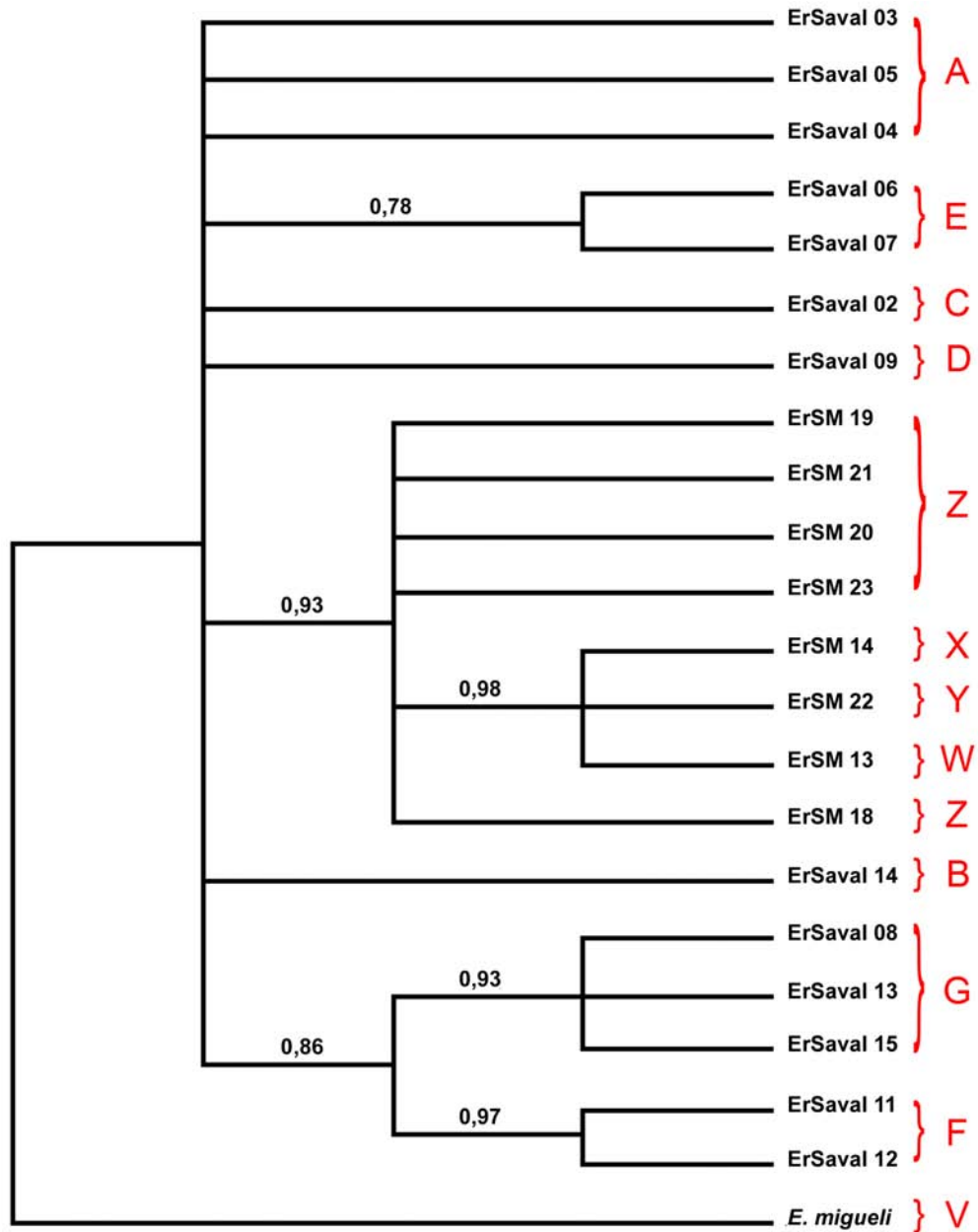


Figura 11. Congruencias entre el cladograma formado por inferencia Bayesiana y los haplotipos determinados en la red (letras rojas), donde la ancestralidad del haplotipo **A**, representado por ErSaval 03, es corroborada, entre otras coincidencias.

5.4. Conclusiones

Por todo lo expuesto en este primer estudio filogeográfico de *E. roseus*, se deduce que la utilización de secuencias de la región D-loop o control del DNA mitocondrial, por la variabilidad que estas presentaron, tanto entre los individuos de cada localidad como entre localidades, es apta para el estudio a nivel intraespecífico de esta especie. Así mismo, los análisis llevados a cabo sobre las secuencias nucleotídicas demostraron un alto poder resolutivo, en especial el de red de haplotipos, el cual, apoyado por los análisis filogenéticos, es capaz de discriminar los haplotipos de las diferentes localidades; así como también separa notoriamente los haplotipos pertenecientes a diferentes especies. Lo anterior conduce a la aprobación de la hipótesis de trabajo, previamente presentada.

Respecto a estudios intraespecíficos realizados anteriormente, se puede afirmar que las técnicas moleculares empleadas en el presente trabajo serían de gran utilidad en la resolución de ambigüedades taxonómicas, tales como las detectadas en relación a caracteres cariológicos, en *E. roseus* del Bosque San Martín (Formas, 1978a). No obstante, debido al bajo éxito en la obtención de secuencias nucleotídicas de individuos de dicha localidad, en este estudio, tales ambigüedades no fueron resueltas.

Mayores y más acuciosos estudios se pueden realizar mediante el uso de la metodología presentada, la cual ha demostrado ser una poderosa herramienta al momento de representar las relaciones intraespecíficas de *E. roseus*. Con el objetivo de definir la especie, sus límites geográficos y su historia, se debiera primero realizar un muestreo extensivo en más localidades, de una forma más rápida y menos invasiva para el organismo, tales como varillas bucales para la obtención de DNA (Pidancier *et*

al., 2003; Miller, 2006). Segundo, realizar análisis que abarquen más aristas del problema, como análisis de clados anidados (Templeton *et al.*, 1995), además de análisis propios de genética poblacional, con información genética de múltiples fuentes (otros genes mitocondriales y genes nucleares). Así como combinar esos datos con antecedentes ecológicos, fisiológicos y de historia de vida de la especie, en conjunto con referencias históricas del clima, del paisaje y de la geografía (Masta *et al.*, 2003).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Avice, J. (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press. Massachusetts. 447 pp.
- Bandelt, H. & Dress, A. (1992) Split decomposition: a new and usefull approach to phylogenetic analysis of distance data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1: 244-252.
- Beebee, T. & Griffiths, R. (2005) The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biol. Cons.*, 125: 271-285.
- Carnaval, A. (2002) Phylogeography of four frog species in forest fragments of northeastern brazil – a preliminary study. *Integr. Comp. Biol.*, 42: 913-921.
- Capurro, L. (1963) *Eupsophus grayi* de Isla Mocha. *Invest. Zool. Chil.*, 10: 5-8.
- Cei, J. (1958) Las láminas originales del suplemento a los batraquios chilenos de Philippi: primera impresión y comentarios. *Invest. Zool. Chil.*, 4: 265-288.
- Cei, J. (1962) El género *Eupsophus* en Chile. *Invest. Zool. Chil.*, 8: 7-42.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, 9 (10): 1657-1660.
- Collins, J. & Halliday, T. (2005) Forecasting changes in amphibian biodiversity: aiming at a moving target. *Philos. Trans. R. Soc. London [Biol.]*, 360: 309-314.
- Correa, C., Veloso, A., Iturra, P. & Méndez, M. (2006) Relaciones filogenéticas de los leptodactílicos chilenos: una aproximación molecular basada en los genes mitocondriales 12S y 16S. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 79 (4): 435-450.

- Crandall, K. & Templeton, A. (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134: 959-969.
- Díaz-Páez, H. & Ortiz, J. (2003) Evaluación del estado de conservación de los anfibios en Chile. *Rev. ch. hist. nat.*, 76: 509-525.
- Donnelly, P. & Tavaré, S. (1986) The ages of alleles and a coalescent. *Adv. Appl. Probab.*, 18: 1-19.
- Excoffier, L. & Smouse, P. (1994) Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: Molecular variance parsimony. *Genetics*, 136: 343-359.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Felsenstein, J. (2004). *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 664 pp.
- Fitch, W. (1997) Networks and viral evolution. *J. Mol. Evol.*, 44: S065-S075.
- Formas, J. (1978a) Systematic problems in the frog species *Eupsophus roseus* (Anura: Leptodactylidae) detected by karyological analysis. *Experientia*, 34: 446-446.
- Formas, J. (1978b) A new species of leptodactylid frog (*Eupsophus*) from the Coastal Range in southern Chile. *Stud. Neotrop. Fauna E.*, 13: 1-9.
- Formas, J. (1979) La herpetofauna de los bosques temperados de Sudamérica. En: Duellman, W. (ed.) *The South American Herpetofauna: its origin, evolution and dispersal*: 314-369. Monograph 7, Museum of Natural History The University of Kansas, Kansas.

- Formas, J. (1980) The chromosomes of *E. calcaratus* and the karyological evolution of genus *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae). *Experientia*, 36: 1163-1164.
- Formas, J. (1981) Adaptaciones larvarias de los anuros del bosque templado austral de Sudamérica. *Med. Amb. (Chile)*, 5: 15-21.
- Formas, J. (1992) El cariotipo de la rana chilena *Eupsophus contulmoensis* (Anura: Leptodactylidae), con comentarios sobre la evolución cariológica del género *Eupsophus*. *Bol. Soc. Biol. Concepción (Chile)*, 63: 77-82.
- Formas, J. (1995) Anfibios. En: Simonetti, J., Arroyo, M., Spotorno, A., & Lozada, E. (eds.) *Diversidad Biológica de Chile*: 314-325. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Santiago, Chile.
- Formas, J. & Brieva, L. (1994) Advertisement calls and relationships of the Chilean frogs *E. contulmoensis* and *E. insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *P. Biol. Soc. Wash.*, 107: 391-397.
- Formas J. & Vera M. (1980) Reproductive patterns of *Eupsophus roseus* and *E. vittaus*. *J. Herpetol.*, 14: 11-14.
- Formas, J. & Vera, M. (1982) The status of two Chilean frogs of the genus *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae). *P. Biol. Soc. Wash.*, 95: 594-601.
- Glade, A. (1988) Libro Rojo de los vertebrados terrestres de Chile. Corporación Nacional Forestal (CONAF), Chile. 65 pp.
- Goebel, A., Donnelly, J. & Atz, M. (1999) PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 11: 163-199.

- Grandison, A. (1961) Chilean species of the genus *Eupsophus*. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist.*, 9: 111-149.
- Hare, M., Cipriano, F. & Palumbi, S. (2002) Genetic evidence on the demography of speciation in allopatric dolphin species. *Evolution*, 56 (4): 804-816.
- Heilveil, J. & Berlocher, S. (2006) Phylogeography of postglacial range expansion in *Nigronia serricornis* Say (Megaloptera: Corydalidae). *Mol. Ecol.*, 15: 1627-1641.
- Hein, J., Schierup, M. & Wiuf, C. (2005) Gene Genealogies, Variation and Evolution – A Primer in Coalescent Theory. Oxford University Press, New York. 276 pp.
- Hillis, D. & Bull, J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42: 182-192.
- Houlahan, J., Findlay, C., Schmidt, B., Meyer, A. & Kuzmin, S. (2000) Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404: 752-755.
- Huelsenbeck, J. & Crandall, K. (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 28: 437-466.
- Huelsenbeck, J., Hillis, D. & Nielsen, R. (1996) A likelihood-ratio test of monophyly. *Syst. Biol.*, 45 (4): 546-558.
- La Marca, E., Lips, K., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibáñez, R., Rueda-Almonacid, J., Schulte, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla-Puppo, J., García-Pérez, J., Bolaños, F., Chaves, G., Pounds, J., Toral, E. & Young, B. (2005) Catastrophic population declines and extinctions in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica*, 37 (2): 190-201.

- Lanteri, A. & Confalonieri, V. (2003) Filogeografía: Objetivos, Métodos y Ejemplos. 185-193. En: Bousquets, J. & Morrone, J. (eds.) Una Perspectiva Latinoamericana de la Biogeografía. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Larget, B. & Simon, D. (1999) Markov Chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 750-759.
- Lips, K., Burrowes, P., Mendelson, J. & Parra-Olea, G. (2005) Amphibian declines in Latin America: widespread population declines, extinctions, and impacts. *Biotropica*, 37 (2): 163-165.
- Masta, S., Laurent, N., & Routman, E. (2003) Population genetic structure of the toad *Bufo woodhousii*: an empirical assessment of the effects of haplotype extinction on nested cladistic analysis. *Mol. Ecol.*, 12: 1541-1554.
- Méndez, M., Soto, E., Torres-Pérez, F. & Veloso, A. (2005) Anfibios y Reptiles de los bosques de la Cordillera de la Costa (X Región, Chile). En: Smith-Ramírez, C., Armesto, J. & Valdovinos, C. (eds.) Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile: 441-451. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Miller, H. (2006) Cloacal and buccal swabs are a reliable source of DNA for microsatellite genotyping of reptiles. *Conserv. Genet.*, 7: 1001-1003.
- Moritz, C., Patton, J. L., Schneider, C. J. & Smith, T. B. (2000) Diversification of rainforest fauna: an integrated molecular approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 31: 533-563.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 333 pp.

- Norris, S. (2007) Ghosts in our midst: coming to terms with amphibian extinctions. *Bioscience*, 57 (4): 311-316.
- Nuñez, J. (2003) Taxonomía y sistemática de las ranas del género *Eupsophus* (Leptodactylidae). Tesis Doctorado en Ciencias. Escuela de Graduados. Universidad Austral de Chile. 114 pp.
- Nuñez, J., Zárraga, A. & Formas, J. (1999) New molecular and morphometric evidence for the validation of *Eupsophus calcaratus* and *E. roseus* (Anura: Leptodactylidae) in Chile. *Stud. Neotrop. Fauna E.*, 34: 150-155.
- Ortiz, J. & Díaz-Páez, H. (2006) Estado de conocimiento de los anfibios de Chile. *Gayana*, 70 (1): 114-121.
- Ortiz, J. & Ibarra-Vidal, H. (1992) Una nueva especie de Leptodactylidae (*Eupsophus*) de la Cordillera de Nahuelbuta (Chile). *Acta Zool. Lilloana* (Argentina), 41: 75-79.
- Ortiz, J. & Ibarra-Vidal, H. (2005) Anfibios y reptiles de la Cordillera de Nahuelbuta. En: Smith-Ramírez, C., Armesto, J. & Valdovinos, C. (eds.) Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile: 427-438. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Ortiz, J., Ibarra-Vidal, H. & Formas, J. (1989) A new species of *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae) from Contulmo, Nahuelbuta range, southern Chile. *P. Biol. Soc. Wash.*, 102(4): 1031-1035.
- Ortiz, J., Quintana, V. & Ibarra-Vidal, H. (1994) Vertebrados terrestres con problemas de conservación en la cuenca del Bío-Bío y mar adyacente. Ediciones Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 152 pp.

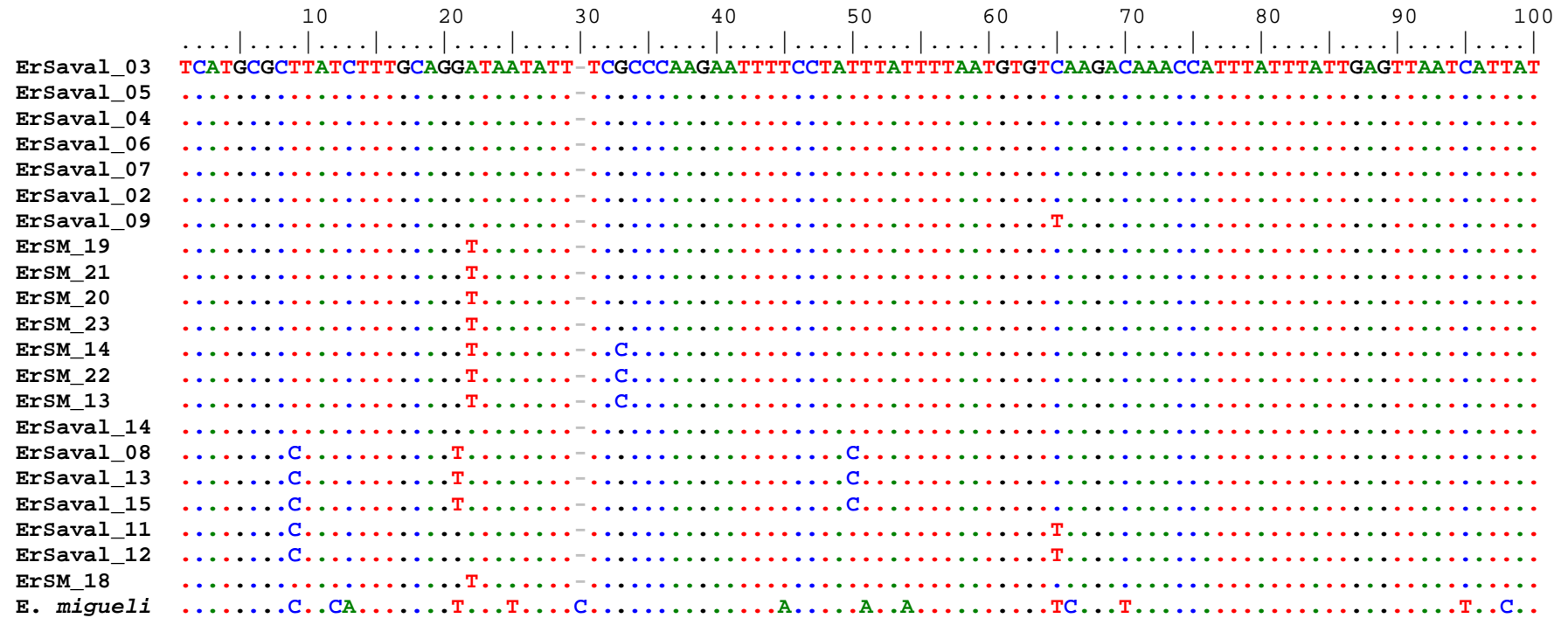
- PAAC, Proyecto Administración Ambiental Corporativo (2003). Capítulo 3: Residuos Tóxicos y peligrosos: 8-21. Universidad Austral de Chile.
- Phillipi, R. (1902) Suplemento a los Batraquios Chilenos Descritos en la Historia Física i Política de Chile de Don Claudio Gay. Librería Ivens, Santiago, Chile. 161 pp.
- Pidancier, N., Miquel, C. & Miaud, C. (2003) Buccal swabs as a nondestructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetol. J.*, 13: 175–178.
- Posada, D. & Crandall, K. (1998) MODELTEST: Testing the Model of DNA Substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Posada, D. & Crandall, K. (2001a) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.*, 16 (1): 37-45.
- Posada, D. & Crandall, K. (2001b) Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst. Biol.*, 50 (4): 580-601.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. (2003). MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1659 pp.
- Sites, J. Jr., & Marshall, J. (2003) Species delimitation: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 462-470.
- Smedmark, J., Eriksson, T. & Bremer, B. (2005) Allopolyploid evolution in Geinae (Colurieae: Rosaceae) – building reticulate species trees from bifurcating gene trees. *Org. Divers. Evol.*, 5: 275-283.

- Smith-Ramírez, C., Armesto, J. & Valdovinos, C. (Eds) (2005) Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile. Editorial Universitaria, Santiago. 708 pp.
- Sumida, M., Agata, M., Kaneda, H. & Yonekawa, H. (1998) Evolutionary relationships among Japanese pond frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of cytochrome b and 12S ribosomal RNA genes. *Genes Genet. Syst.*, 73: 121-133.
- Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D. & Waller, R. (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783-1786.
- Swofford, D. (2001). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P., Waits, L. & Luikart, G. (1999) Noninvasive genetics sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.*, 14: 323–327.
- Templeton, A., Crandall, K. & Sing, C. (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 132: 619-633.
- Templeton A., Routman E. & Phillips C. (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 767-782.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4876-4882.

- USGS, United States Geographical Survey (2006). Collection of Blood Samples From Adult Amphibians [en línea]. National Wildlife Health Center. <http://www.nwhc.usgs.gov/publications/amphibian_research_procedures/blood_samples.jsp>. Consultada en Junio, 2007.
- Veloso, A. & Navarro, J. (1988) Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. *Boll. Mus. Reg. Sci. Nat. (Torino)*, 6: 481-593.
- Veloso, A., Celis-Diez, J., Guerrero, P., Méndez, M., Iturra, P. & Simonetti, J. (2005) Description of a new *Eupsophus* species (amphibia, leptodactylidae) from the remnants of Maulino Forest, central Chile. *Herpetol. J.*, 15: 159-165.
- Vilà, C., Amorim, I., Leonard, J., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, K., Ellegren, H. & Wayne, R. (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the gray wolf *Canis lupus*. *Mol. Ecol.*, 8: 2089-2103.
- Watterson, G. & Guess, H. (1977) Is the most frequent allele the oldest? *Theor. Popul. Biol.*, 11: 141-160.
- Wiens, J. & Reeder, T. (1995) Combining data sets with different numbers of taxa for phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 44: 548-558.
- Wilgenbusch, J., & De Queiroz, K. (2000) Phylogenetic relationships among the phrynosomatid sand lizards inferred from mitochondrial DNA sequences generated by heterogeneous evolutionary processes. *Syst. Biol.*, 49: 592-612.
- Young, B., Lips, K., Reaser, J., Ibáñez, R., Salas, A., Cedeño, J., Coloma, L., Ron, S., La Marca, E., Meyer, J., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G., & Romo D. (2001) Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conserv. Biol.*, 15: 1213-1223.

ANEXO

Secuencias Nucleóticas de la Región Control mitocondrial de individuos provenientes del Parque Saval (ErSaval_..) y Bosque Experimental San Martín (ErSM_..) y un individuo de la especie *Eupsophus migueli* (*E. migueli*) como grupo externo, alineadas por el programa ClustalX (Thompson, *et al.*, 1997). Las bases nucleicas reemplazadas por un punto representan concordancia con la secuencia guía: ErSaval 03.



	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200				
ErSaval_03	TTTATGCATAAA	TATTAAGATCAA	AAATATTTTT	CGACTTAAACA	ATTGCACCATTT	CCCATATTG	TATCATTTCCT	ACTACTACCCAA	CTAGTTCAAG					
ErSaval_05				
ErSaval_04				
ErSaval_06				
ErSaval_07				
ErSaval_02				
ErSaval_09				
ErSM_19				
ErSM_21				
ErSM_20				
ErSM_23				
ErSM_14	C	A				
ErSM_22				
ErSM_13	C				
ErSaval_14				
ErSaval_08	G	G				
ErSaval_13	G	G				
ErSaval_15	G	G				
ErSaval_11	G	T				
ErSaval_12	G	T				
ErSM_18				
<i>E. migueli</i>	C	C	A	CC	TT	TC	C	C	TC	T	CTA

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ErSaval_03	TATTTACTC	GTTGAATTGAGCCTTTTTTTTCTCTAGTCATCTAGAATATC	CGAAAAAGCCATCGTAGACGTT	CATCCATGG	ACTGTCACATCAAACA					
ErSaval_05
ErSaval_04
ErSaval_06
ErSaval_07
ErSaval_02
ErSaval_09
ErSM_19
ErSM_21
ErSM_20
ErSM_23
ErSM_14
ErSM_22
ErSM_13
ErSaval_14
ErSaval_08
ErSaval_13
ErSaval_15
ErSaval_11
ErSaval_12
ErSM_18
<i>E. migueli</i>

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
ErSaval_03	TACTTAAAAATATTCCCAATAATAATAATAATATCATGAAATTTTCAGTTTCCCCATCCCCAAGGAGAAACATTAGTCTTATGATTCTTACTCTAATGGAC									
ErSaval_05									
ErSaval_04									
ErSaval_06									
ErSaval_07									
ErSaval_02C.....									
ErSaval_09									
ErSM_19C.....									
ErSM_21C.....									
ErSM_20C.....									
ErSM_23C.....									
ErSM_14	??									
ErSM_22	??									
ErSM_13	??									
ErSaval_14									
ErSaval_08									
ErSaval_13									
ErSaval_15									
ErSaval_11									
ErSaval_12									
ErSM_18??									
<i>E. migueli</i>	.T..T.....C.....G.....T.....A.....C.G.TCA..TA.TG.AC.									

```

          410      420      430      440      450      460      470      480      490
ErSaval_03  . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSaval_05  CTTGGCCTGTCCACAGTTGGTTTCAGGGGCGATCGATTGTGTACTCCATGGGCCACCAACCAGATTACCAGTGTCTACCTTCAGGAGGCATCT
ErSaval_04  . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSaval_06  . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSaval_07  . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSaval_02  . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSaval_09  . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSM_19     . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSM_21     . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSM_20     . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSM_23     . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSM_14     ?????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
ErSM_22     ?????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
ErSM_13     ?????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
ErSaval_14  . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . N . . . . . C
ErSaval_08  . . . . G.C . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSaval_13  . . . . G.C . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSaval_15  . . . . G.C . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSaval_11  . . . . G.C . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSaval_12  . . . . G.C . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
ErSM_18     ?????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
E. migueli T.G . . . . N . . . G . . . . . A . C . C . TGATCG . AG . . . G . . T . CATGG . C . T . TC . A . C . . . TA . TCA . . . . . A . . . .

```