

POSICIÓN FILOGENÉTICA DE NUEVAS POBLACIONES DE
ALSODES (ANURA, ALSODIDAE) PROCEDENTES DE LA
ARAUCANÍA ANDINA, SUR DE CHILE

Tesis

Entregada a la
Universidad de Valparaíso,
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas mención Biodiversidad y Conservación
Instituto de Biología
Facultad de Ciencias

Por

Edvin Antonio Riveros Riffo

Julio, 2025

INSTITUTO DE BIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister
presentada por el candidato

EDVIN ANTONIO RIVEROS RIFFO

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis, como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención Biodiversidad y Conservación, en la presentación y defensa de tesis, rendida el 07 de julio de 2025.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Nombre de los integrantes:	Institución:	Rol en la comisión:
Prof. Claudio Quezada Romegialli	Universidad de Tarapacá	Director(a)
Prof. Claudio Correa Quezada	Universidad de Concepción	Co-director(a)
Prof. Pablo Conejeros Abraham	Universidad de Valparaíso	Evaluador interno

Dedicatoria:

Para Martín y Santiago, verdaderos tesoros.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a mis profesores Claudio Correa y Claudio Quezada, por creer en esta empresa desde sus inicios y por la infinita paciencia con la que guiaron este proceso. A Marcela Ossandón, Nelson Follador y Francisco González, por su incondicional apoyo en terreno y en gabinete. A la comunidad Mapuche Pehuenche de Icalma y Quililche, por permitirnos explorar su territorio. Finalmente, agradezco a Martín Riveros, por haber propiciado aquella inolvidable búsqueda nocturna de anfibios en los bosques de Icalma, origen de esta tesis.

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	1
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	10
3.1. General.....	10
3.2. Específicos	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. Recolección de muestras.....	11
4.2. Obtención de ADN y secuencias mitocondriales.....	14
4.3. Análisis filogenético	16
4.4. Observaciones morfológicas.....	18
5. RESULTADOS	19
5.1. Recolección de muestras.....	19
5.2. Alineamiento de secuencias de ADN	21
5.3. Relaciones filogenéticas.....	22
5.4. Observaciones morfológicas.....	25
6. DISCUSION	29
7. CONCLUSIONES	37
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39
9. ANEXOS	48
Anexo 1. Permisos de captura con fines de investigación	48
Anexo 2. Certificado de bioética.....	51
Anexo 3. Tabla comparativa con los caracteres diagnósticos reportados en <i>Alsodes</i>	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas, altitudes y provincias de los seis sitios de muestreo de <i>Alsodes</i> sp. considerados en este estudio.	12
Tabla 2. Partidores usados para PCR y secuenciación.	16
Tabla 3. Muestras de <i>Alsodes</i> sp. obtenidas en los distintos sitios de muestreo.....	20
Tabla 4. Resumen de las diferencias morfológicas diagnósticas entre <i>Alsodes</i> sp. y las especies congénicas de mayor proximidad geográfica	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Provincia de Cautín según Espinoza (1897).....	5
Figura 2. Distribución geográfica de <i>A. igneus</i> , <i>A. verrucosus</i> y <i>A. vittatus</i> en la Araucanía andina, además de <i>A. neuquensis</i> en Argentina, según UICN (2025) y Correa et al. (2025).....	7
Figura 3. Especies de <i>Alsodes</i> de mayor cercanía geográfica a la Araucanía andina: A) <i>A. igneus</i> ; B) <i>A. vittatus</i> ; C) <i>A. neuquensis</i> ; D) <i>Alsodes</i> sp. procedente de Icalma	8
Figura 4. Distribución de los sitios de muestreo de <i>Alsodes</i> sp. en la sección andina de la Región de La Araucanía	12
Figura 5. Sitios de muestreo de <i>Alsodes</i> sp. en la sección andina de la Región de La Araucanía: 1) Río Pino Hachado, 2) Afluente estero Icalma, 3) Estero Icalma, 4) Quililche, 5) Resbaloso y 6) Pucón.	14
Figura 6. Individuos de <i>Alsodes</i> sp. en distintos estados ontogénicos. A) Larva; B) Juvenil; C) Macho adulto; D) Hembra adulta.	20
Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias mitocondriales concatenadas utilizado para el análisis filogenético (vista parcial).	21
Figura 8. Árbol de consenso bayesiano del género <i>Alsodes</i> (regla de la mayoría del 50%) que exhibe la posición filogenética de las nuevas poblaciones identificadas en la Araucanía andina	24
Figura 9. Detalles morfológicos externos del macho E1c3 de <i>Alsodes</i> sp. A) Vista dorsal; B) Vista ventral; C) Vista de la superficie palmar; D) Vista lateral de la cabeza; E) Vista de la superficie plantar.....	26

DECLARACIÓN ÉTICA DE TRABAJO

La captura y recolección de anfibios usados en esta investigación se realizó en el marco de las Resoluciones Exentas N°4394/2022 y N°3917/2023, emitidas por la División Protección de los Recursos Naturales Renovables, Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura (Anexo 1). Todos los métodos de captura y el número de individuos recolectados se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y regulaciones correspondientes. Además, los protocolos experimentales contaron con la aprobación del Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, Universidad de Concepción, mediante el certificado CEBB 197-2022 (Anexo 2). Finalmente, se declara el uso de inteligencia artificial (ChatGPT versión GPT-4) para optimizar la redacción original de todas las secciones de esta investigación, sin modificar el contenido científico. Todas las ideas, interpretaciones y conclusiones son propias del autor.

RESUMEN

El conocimiento taxonómico y biogeográfico de los anfibios del género *Alsodes*, particularmente en los Andes, es precario e incompleto. En este estudio se determinó la posición filogenética de seis nuevas poblaciones del género, descubiertas en las estribaciones andinas de la Región de La Araucanía, mediante el análisis molecular más completo y actualizado realizado hasta la fecha para este grupo. La reconstrucción filogenética reveló que estas nuevas poblaciones representan dos linajes mitocondriales: uno completamente nuevo (*Alsodes* sp.) y otro estrechamente relacionado con *A. vittatus*. Ambos linajes tienen distribuciones principalmente alopátricas, pero coexisten en el estero Icalma y su afluente principal. No obstante, los individuos asociados a estos linajes no presentaron correspondencia morfológica con ninguna de las especies nominales cercanas, tanto de la vertiente oriental como occidental de los Andes, indicando un estatus taxonómico incierto. En las localidades australes de Quililche, Resbaloso y Pucón se detectó exclusivamente el linaje mitocondrial de *Alsodes* sp., mientras que, en la localidad más septentrional, río Pino Hachado, solo se identificó el linaje mitocondrial de *A. vittatus*. Este último resultó parafilético respecto al único ejemplar de *A. neuquensis* incluido en el análisis, lo que apoya la hipótesis de conespecificidad propuesta previamente para estas especies. Los resultados también plantean interrogantes sobre posibles eventos históricos de hibridación o introgresión mitocondrial, aspecto que requiere estudios adicionales. Estos hallazgos, resultado del esfuerzo de muestreo más exhaustivo realizado hasta ahora en la región, cubren un segmento de aproximadamente 120 km donde no se habían documentado formalmente poblaciones del género, lo que representa un avance significativo en el conocimiento biogeográfico y filogenético de *Alsodes* en la Araucanía andina.

ABSTRACT

Taxonomic and biogeographic knowledge of amphibians in the genus *Alsodes*, particularly in the Andes, remains limited and incomplete. In this study, the phylogenetic placement of six newly discovered *Alsodes* populations from the Andean foothills of La Araucanía Region was determined using the most comprehensive and updated molecular analysis conducted until now for this group. Phylogenetic reconstruction revealed that these populations represent two mitochondrial lineages: one entirely novel (*Alsodes* sp.) and another closely related to *A. vittatus*. These lineages are primarily allopatric, yet they co-occur in the Icalma stream and its main tributary. However, individuals from both lineages exhibited no clear morphological correspondence with any geographically proximate nominal species from either the eastern or western slopes of the Andes, indicating an uncertain taxonomic status. The southernmost sites — Quililche, Resbaloso, and Pucón— exclusively harbored the mitochondrial lineage of *Alsodes* sp. In contrast, only the mitochondrial lineage of *A. vittatus* was observed at the northernmost locality, Pino Hachado river. This latter lineage was found to be paraphyletic with respect to the single *A. neuquensis* specimen included in the analysis, providing further support for the previously proposed hypothesis of conspecificity between these taxa. The results also raise questions regarding potential historical hybridization or mitochondrial introgression events, an aspect that requires further studies. These findings, derived from the most extensive sampling effort conducted in the region to date, cover approximately 120 km of previously unsampled territory, where no formal records of the genus existed. This represents a significant advancement in the phylogenetic and biogeographic understanding of *Alsodes* in the Andean area of La Araucanía.

1. INTRODUCCION

Los anuros constituyen el orden de anfibios más diverso del mundo, con un total de 58 familias y aproximadamente 7.825 especies descritas a nivel mundial (Frost, 2024). Presentan una distribución cosmopolita, ausentes únicamente en las altas latitudes del Ártico, la Antártica, algunas islas oceánicas y desiertos extremadamente áridos (Duellman & Trueb, 1994). Comúnmente conocidos como sapos, ranas y ranas arborícolas, los anuros exhiben una morfología especializada para la locomoción saltatoria, caracterizada por extremidades posteriores muy desarrolladas, cuerpos compactos, ausencia de cola en estado adulto y una cabeza proporcionalmente grande con ojos prominentes (Wells, 2007). A nivel reproductivo, los anuros muestran una notable diversidad de estrategias, aunque la mayoría de las especies presenta fertilización externa y una fuerte dependencia de ambientes húmedos para completar su ciclo de vida (Duellman & Trueb, 1994). En general, poseen un desarrollo indirecto con metamorfosis completa, pasando desde larvas acuáticas hasta adultos terrestres (McDiarmid & Altig, 1999). Actualmente, la anurofauna alcanza su máxima diversidad en los trópicos de América del Sur, donde las condiciones climáticas y ecológicas han favorecido los procesos de especiación y diversificación ecológica. En contraste, las regiones templadas y las zonas tropicales de alta montaña al oeste de los Andes exhiben menor diversidad de anuros (Wake & Koo, 2018; Vasconcelos et al., 2019), debido posiblemente a restricciones ambientales más severas y a diferencias en la historia evolutiva de las comunidades.

En Chile, los anuros nativos están representados por siete familias, entre las cuales Alsodidae Mivart, 1869 destaca como la más diversa en términos de riqueza específica. Esta familia se compone de tres géneros, de los cuales *Alsodes* Bell, 1843 y *Eupsophus* Fitzinger, 1843 presentan una distribución restringida al suroeste de América del Sur, específicamente a Chile y

Argentina. Dentro de esta familia, *Alsodes* presenta la mayor riqueza específica, con 19 entidades reconocidas, de las cuales 18 se encuentran en Chile y 13 son endémicas (Barrasso et al., 2022; Correa, 2022; Rabanal et al., 2022; Frost, 2024). Esta alta representatividad no solo posiciona a *Alsodes* como el género de anfibios más diversificado del país, sino que también como aquel que concentra el mayor número de anuros endémicos, lo que revela su importancia como componente esencial de la diversidad de anfibios en Chile.

Las especies acuáticas y semiacuáticas del género *Alsodes* se distribuyen ampliamente en el centro-sur de Chile, entre los 32° y 49° S (Cuevas & Formas, 2005), y desde el nivel del mar hasta la cordillera de los Andes, rango que incluye especies con distribución insular y continental. Esta amplia extensión latitudinal y altitudinal permite que las poblaciones de *Alsodes* ocupen una gran variedad de ecosistemas, desde zonas dominadas por matorrales semiáridos en el norte hasta los fríos y húmedos bosques subantárticos en el sur; y desde bosques y matorrales costeros hasta vegas y estepas altoandinas en el gradiente altitudinal. En Argentina, en cambio, su distribución es más limitada y se restringe a una estrecha franja de la vertiente oriental del macizo andino, entre los 36° y 49° S (Cuevas & Formas, 2005; Charrier et al., 2015; Barrasso et al., 2022).

La taxonomía y sistemática de *Alsodes* es considerada confusa y compleja (Lynch, 1978; Cei, 1980; Díaz, 1989; Blotto et al., 2013; Charrier et al., 2015). Si bien en los últimos años se han logrado avances significativos en la comprensión de las relaciones filogenéticas dentro del género, impulsados fundamentalmente por estudios con enfoques moleculares (Blotto et al., 2013; Charrier et al., 2015; Correa et al., 2018, 2020, 2025; Barrasso et al., 2022; Mella-Romero et al., 2022; Rabanal et al., 2022), aún persisten importantes vacíos de información para gran parte de los taxones que lo componen. Esta carencia es particularmente evidente en aquellas

poblaciones de *Alsodes* con distribuciones geográficas restringidas o que habitan áreas montañosas remotas y poco exploradas de la cordillera de los Andes, donde la dificultad de acceso limita los estudios de campo, restringiendo así nuestra comprensión sobre su diversidad y procesos evolutivos subyacentes.

Las áreas de alta complejidad topográfica, como la cordillera de los Andes, desempeñan un papel fundamental en la promoción de la diversidad biológica, ya que impulsan la diferenciación de especies (García-Rodríguez et al., 2021), especialmente en aquellos grupos con capacidades de dispersión limitada, fuerte dependencia a microhábitats húmedos y elevada filopatría, como muchas especies de anfibios. En particular, los anfibios anuros que habitan en regiones montañosas accidentadas muestran mayores tasas de especiación y endemismo, fomentadas por su baja capacidad de dispersión y por la presencia de barreras físicas que reducen el flujo génico entre poblaciones, favoreciendo la especiación alopátrica (mediante la separación geográfica), así como por gradientes ecológicos que facilitan la especiación parapátrica (debido a diferencias en el entorno). Entre las familias de anfibios que habitan en los Andes, Alsodidae destaca por exhibir la tasa de especiación más rápida (García-Rodríguez et al., 2021).

La Región de La Araucanía, en Chile, se extiende entre los 37°35' y 39°37' S y se caracteriza por su diversidad física, geográfica y vegetal, que da origen a un mosaico de microclimas y hábitats únicos. En los Andes de esta región, conocida como Araucanía andina, la actividad volcánica ha forjado un relieve abrupto y vigoroso, donde las formas del paisaje destacan por su marcado contraste. Aquí se encuentran los imponentes volcanes Llaima y Villarrica, considerados entre los más activos de Chile y de toda la cordillera de los Andes (SERNAGEOMIN, 2018). En este paisaje topográficamente complejo e irregular se reconocen en la actualidad tres especies de anfibios del género *Alsodes* (Philippi, 1902; Vellard, 1947; Cei,

1958, 1962, 1976; Formas & Vera, 1983; Cuevas & Formas, 2003, 2005; Formas & Brieva, 2004; Rabanal & Núñez, 2008; Blotto et al., 2013; Mella-Romero & Lamilla-Maulén, 2019; Alveal et al., 2021; Barraso et al., 2022; Correa, 2022, 2025): *A. igneus* Cuevas y Formas, 2005, *A. verrucosus* (Philippi, 1902) y *A. vittatus* (Philippi, 1902). Entre ellas, *A. igneus* es la especie descrita más recientemente (2005) y su localidad tipo se encuentra en el Parque Nacional Tolhuaca (Cuevas & Formas, 2005). En este lugar, habita en sectores boscosos con presencia de *Araucaria araucana*, *Nothofagus obliqua* y *N. dombeyi*, entre otros elementos del estrato arbóreo; y en arroyos de montaña que desembocan en la Laguna Malleco, a una altitud aproximada de 920 m s.n.m. Por el contrario, las localidades tipo de *A. verrucosus* y *A. vittatus* fueron detalladas someramente por Philippi en 1902, en su obra “Suplemento a los batraquios chilenos descritos en la Historia Física i Política de Chile de don Claudio Gay”, lo que ha generado, durante años, un alto grado de incertidumbre sobre el estatus taxonómico y la distribución geográfica de ambas especies. En el caso de *A. verrucosus* (= *Borborocoetus verrucosus*), Philippi (1902) señala que la especie “*Habitat in Andibus Provinciae Cautin*” (p.83), provincia que fue creada oficialmente en 1887 (Ley S/N, Ministerio del Interior). Según mapas de la época, contenidos en el libro “Jeografía Descriptiva de la República de Chile” de Espinoza (1897), utilizado como texto de enseñanza en los establecimientos de instrucción militar del Ejército y que probablemente fue la referencia geográfica adoptada por Philippi en su obra, los Andes de la Provincia de Cautín se extendían por más de 150 km lineales entre sus extremos norte y sur, desde la naciente del río Rahueco (actualmente Rahue) por el norte hasta el nacimiento del río Trancura por el sur (Figura 1). A esto se agrega el hecho de que la ubicación actual del holotipo de *A. verrucosus* es desconocida y muy probablemente se haya perdido (Formas, 1995). Aunque varias poblaciones de Argentina fueron inicialmente atribuidas a

A. verrucosus (Vellard, 1947; Cei, 1976, 1980, 1987), estudios posteriores las descartaron como parte de esta especie (Blotto et al., 2013). En cuanto a Chile, también se han reportado poblaciones de *A. verrucosus* al sur de la antigua Provincia de Cautín, como en el Parque Nacional Puyehue (Formas & Vera, 1983; Cuevas & Formas, 2003, 2005; Formas & Brieva, 2004; Cuevas, 2008), ubicado a más de 180 km (lineales) de distancia. De similar modo, esta especie se ha documentado en localidades aún más australes, como Cayutué (Mella-Romero & Lamilla-Maulén, 2019), la Reserva Nacional Futaleufú (Elgueta et al., 2005) e incluso la Isla Wellington (Díaz & Núñez, 1988). No obstante, la asignación específica de estas poblaciones es controversial, por lo que estudios dirigidos y con distintas líneas de evidencia son indispensables para resolver tales determinaciones taxonómicas.

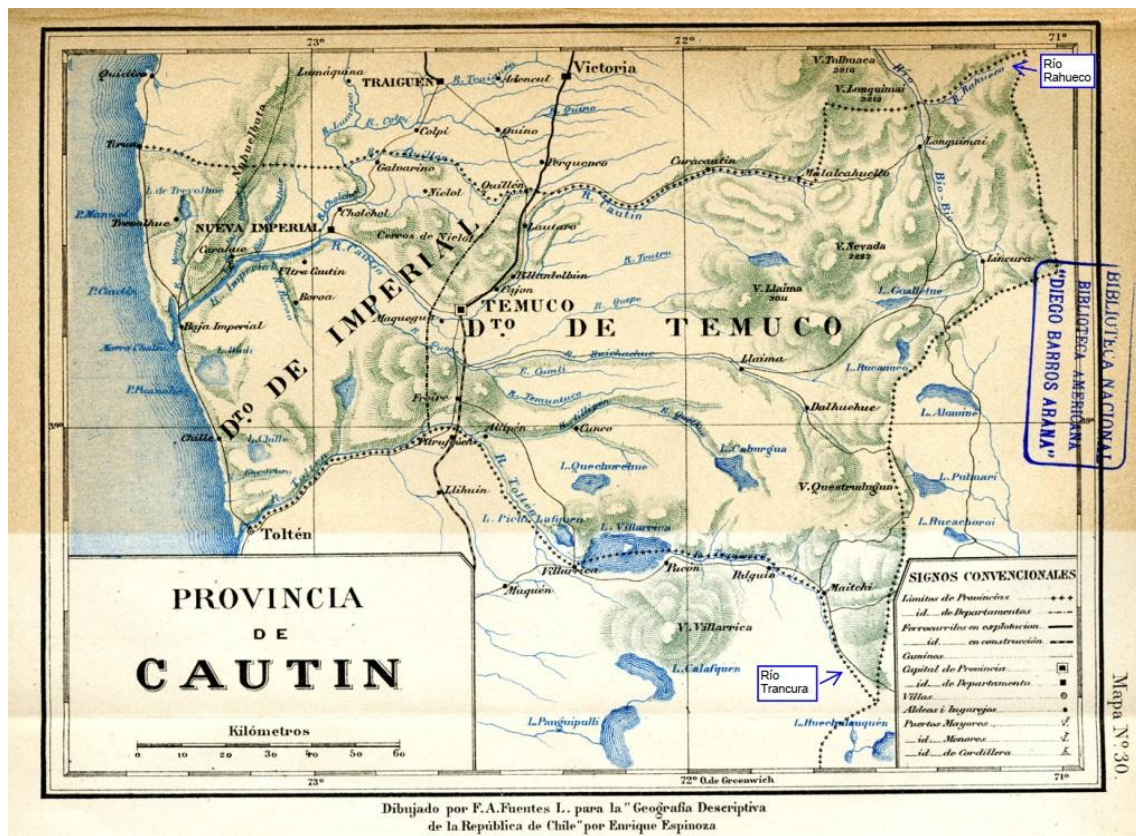


Figura 1. Provincia de Cautín según Espinoza (1897). Se añadieron recuadros para señalar los límites norte y sur de la provincia durante esa época.

Adicionalmente, Philippi (1902) menciona que *A. vittatus* (= *Cystignathus vittatus*) “*Habitat in Araucania*” (p.103), sin embargo, a diferencia de *A. verrucosus*, detalla que los ejemplares tipo provienen de un lugar más concreto: la hacienda de San Ignacio de Pemehue. Solo recientemente, Correa et al. (2025) lograron un avance significativo al descubrir poblaciones de *A. vittatus* en las inmediaciones de lo que actualmente corresponde al límite administrativo entre las regiones del Biobío y La Araucanía, en valles cordilleranos que antiguamente formaron parte de la hacienda de San Ignacio de Pemehue, contribuyendo a esclarecer parte del enigma dejado por Philippi hace más de un siglo. Por último, en la vertiente oriental de los Andes (Argentina), adyacente a la región andina de La Araucanía, habita *A. neuquensis* Cei, 1976, una especie considerada endémica de la Provincia de Neuquén, que aparentemente se distribuye en una estrecha franja comprendida entre Primeros Pinos, la Pampa de Lonco Luan (localidad tipo), la laguna Batea Mahuida y el arroyo Moquehue (Cei, 1976, 1980, 1987; Úbeda et al., 2012; Blotto et al., 2013; Barraso et al., 2016; Úbeda, 2021), aproximadamente entre los 38°49' y 38°57' S. No obstante, la reconstrucción filogenética de Correa et al. (2025), basada en caracteres moleculares, plantea la necesidad de evaluar la posible conespecificidad de *A. vittatus* y *A. neuquensis*, lo que eventualmente implicaría ajustes tanto nomenclaturales como distribucionales. La Figura 2 exhibe las distribuciones geográficas de las especies mencionadas, conforme a lo reportado por la UICN (2025), en base a las evaluaciones realizadas entre los años 2016 y 2020, e incorpora además la ubicación de las nuevas poblaciones descubiertas por Correa et al. (2025).

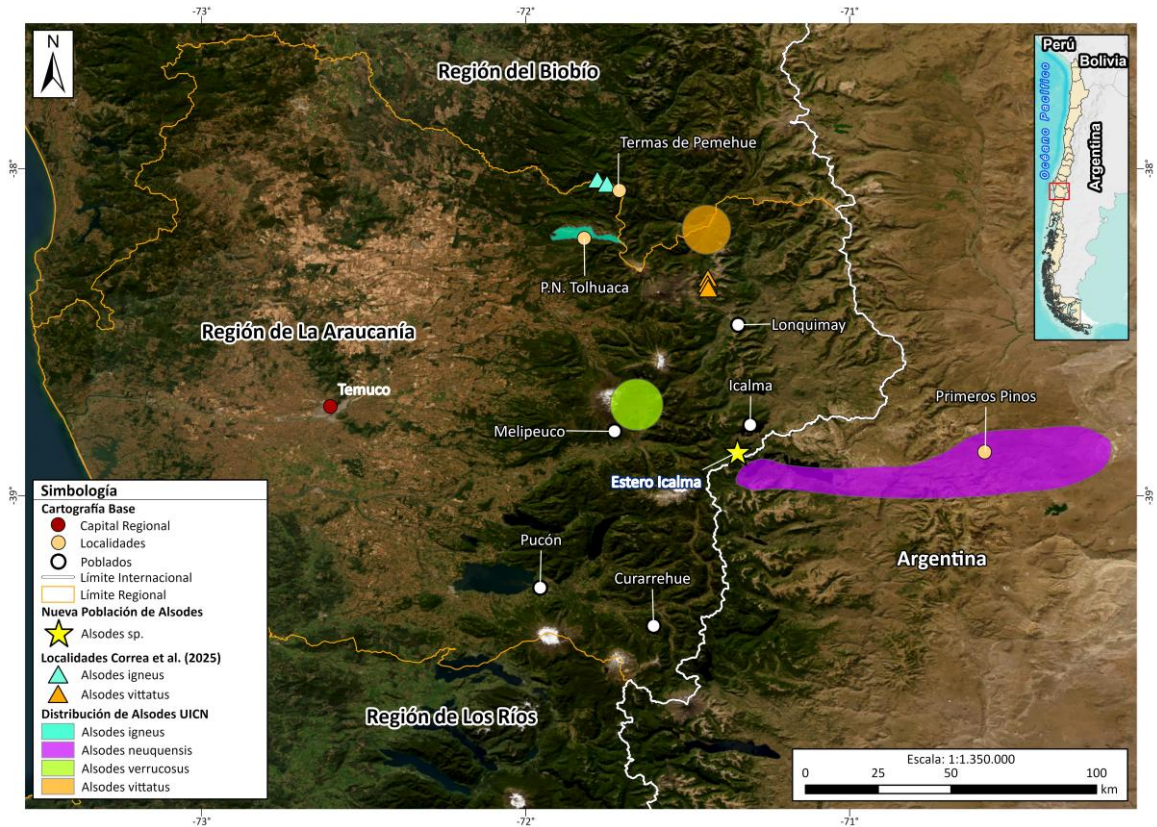


Figura 2. Distribución geográfica de *A. igneus*, *A. verrucosus* y *A. vittatus* en la Araucanía andina, además de *A. neuquensis* en Argentina, según UICN (2025) y Correa et al. (2025). La nueva población de *Alsodes* sp. descubierta en Icalma y que originó esta investigación, se indica con una estrella.

En lo que respecta a los estados de conservación, las cuatro especies de *Alsodes* que habitan en esta sección de los Andes (*A. igneus*, *A. neuquensis*, *A. verrucosus* y *A. vittatus*; ver Figura 3) se encuentran amenazadas en la actualidad. El Decreto Supremo N°38/2015 del Ministerio del Medio Ambiente de Chile clasifica a *A. igneus* como Vulnerable, mientras que el Decreto Supremo N°42/2011 categoriza a *A. verrucosus* como En Peligro y a *A. vittatus* como En Peligro Crítico. Por su parte, en Argentina, *A. neuquensis* fue categorizada como especie Amenazada (Resolución N°1055/2013 Ex Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable); mientras que la UICN (2019) la clasifica en la categoría En Peligro.



Figura 3. Especies de *Alsodes* de mayor cercanía geográfica a la Araucanía andina: A) *A. igneus*; B) *A. vittatus*; C) *A. neuquensis*; D) *Alsodes* sp. procedente de Icalma. A pesar de su consideración como especie válida, no existen registros verificables de *A. verrucosus* que procedan de la localidad tipo o zonas cercanas.

En el verano de 2020, una prospección herpetológica recreativa efectuada en los alrededores de la Laguna de Icalma, Región de La Araucanía, permitió el descubrimiento de una población totalmente desconocida de anfibios del género *Alsodes*. Tanto esta zona como sus alrededores carecían por completo de registros formales de individuos de este género, lo que originó nuevas expediciones entre 2023 y 2024. Las investigaciones revelaron la existencia de varias poblaciones adicionales de *Alsodes* en la sección andina de este territorio, inserto dentro de los límites de la antigua Provincia de Cautín (ver Figura 1), cerca de la frontera con Argentina. Algunas de estas poblaciones fueron recientemente descritas por Correa et al. (2025) y permitieron documentar el redescubrimiento de *A. vittatus*, una de las especies de anfibios más

raras y enigmáticas de Chile. Además, estas expediciones propiciaron la detección de nuevas poblaciones de *Alsodes* sp. al sur de los registros reportados por Correa et al. (2025). Considerando que el conocimiento biogeográfico de los anfibios en esta porción de los Andes es aún incipiente y que las especies candidatas por proximidad geográfica – *A. igneus*, *A. neuquensis*, *A. verrucosus* y *A. vittatus* – podrían exhibir una superposición espacial en sus rangos de distribución geográfica aún no documentada, el presente estudio tiene como objetivo determinar la posición filogenética de las nuevas poblaciones de *Alsodes* sp., mediante un análisis de filogenia molecular.

2. HIPÓTESIS

Las nuevas poblaciones de *Alsodes* sp. registradas en la sección andina de la Región de La Araucanía representarían un linaje diferenciado a nivel de especie y formalmente desconocido.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Determinar la posición filogenética de las nuevas poblaciones de *Alsodes* sp. procedentes de la Araucanía andina.

3.2. Específicos

1. Caracterizar molecularmente las nuevas poblaciones de *Alsodes* sp. a través de secuencias parciales de los genes mitocondriales *cytb*, 12S rRNA y 16S rRNA.
2. Identificar caracteres morfológicos externos de importancia taxonómica en las nuevas poblaciones de *Alsodes* sp.
3. Evaluar el estatus taxonómico de las nuevas poblaciones de *Alsodes* sp.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Recolección de muestras

En las temporadas de verano 2023 y verano 2024, se llevaron a cabo dos campañas de prospección herpetológica en la vertiente occidental de la cordillera de los Andes, entre los 38°39' - 39°22'S, cubriendo una distancia aproximada de 120 km lineales de la zona montañosa conocida como Araucanía andina (ver Figura 4). En total, se prospectaron 6 sitios localizados entre los 780 y los 1.830 m s.n.m. (Tabla 1), inmersos en bosques caducifolios de *Nothofagus*, bosques resinosos de *Araucaria araucana* y matorrales bajos de altitud (Luebert & Plissock 2017). Los sitios estudiados se ubicaron en la sección superior de las cuencas de los ríos Biobío (tres sitios) y Toltén (tres sitios), y en su mayoría involucraron arroyos de montaña de primer orden (Figura 5). En general, los arroyos presentaron aguas gélidas y cristalinas, poco profundas (<1 m) y de flujo continuo, aunque muy variables en cuanto a caudal. La búsqueda de anfibios se llevó a cabo siguiendo el curso de estos arroyos, mediante transectos pedestres de hasta 250 m de largo y un ancho de 3 m a cada lado, combinando los métodos de encuentro visual y búsqueda de refugios (Crump & Scott, 1994; Díaz-Páez et al., 2002; Correa et al., 2018). La captura de individuos adultos y juveniles se efectuó manualmente, inspeccionando troncos en descomposición, vegetación ribereña y cavidades entre rocas, tanto bajo el agua como en los márgenes de los arroyos, dedicando hasta 2 h de muestreo en cada sitio. En cuanto a las larvas, su búsqueda se focalizó en áreas de remanso y en pozas naturales de poca profundidad, utilizando redes de mano para facilitar su captura. Los sitios se exploraron tanto de día como de noche, empleando linternas frontales durante las expediciones nocturnas.

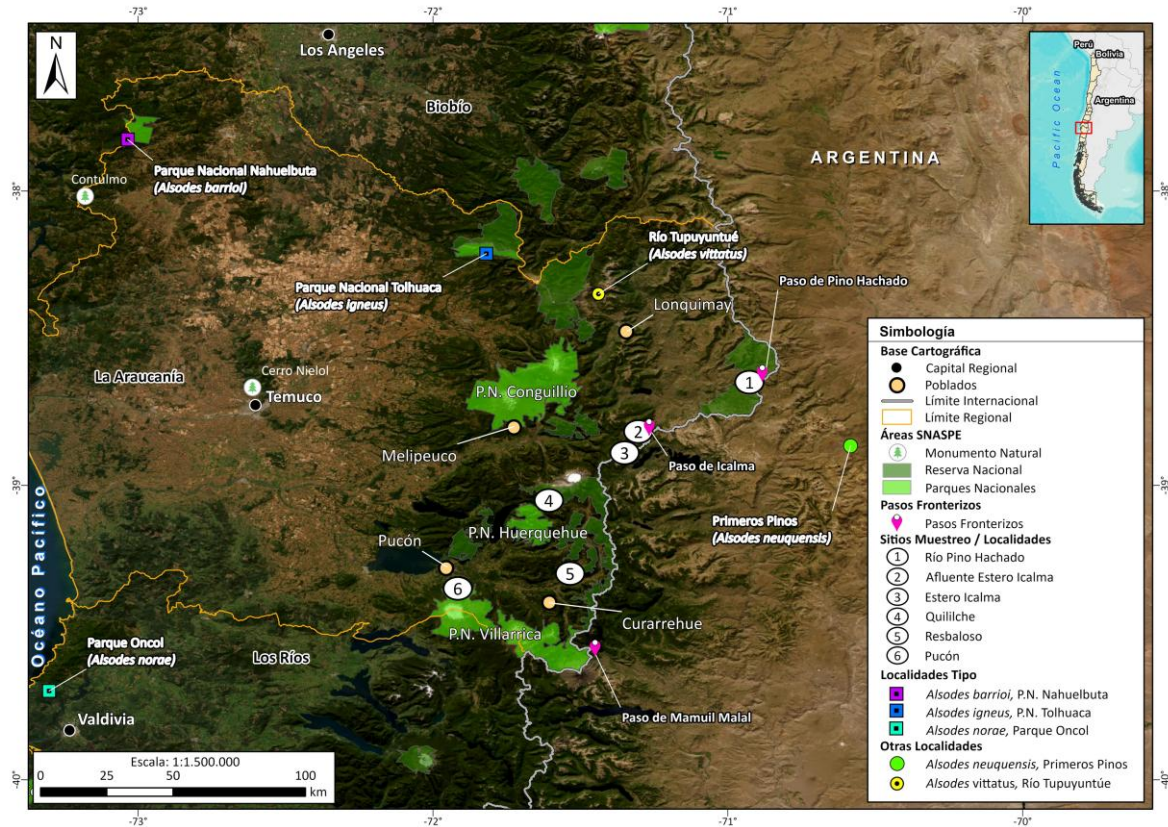


Figura 4. Distribución de los sitios de muestreo de *Alsodes* sp. en la sección andina de la Región de La Araucanía.

Tabla 1. Coordenadas, altitudes y provincias de los seis sitios de muestreo de *Alsodes* sp. considerados en este estudio.

Sitio N°	Localidad	Este ¹	Norte ¹	Altitud	Provincia
1	Río Pino Hachado	332.183	5.720.061	1.830	Malleco ²
2	Afluente estero Icalma	297.765	5.696.241	1.330	Malleco ²
3	Estero Icalma	296.508	5.695.412	1.400	Malleco ²
4	Quililche	273.912	5.673.358	910	Cautín
5	Resbaloso	281.046	5.645.913	780	Cautín
6	Pucón	248.880	5.640.049	810	Cautín ³

Notas: (1). Los sitios están ordenados de norte a sur, según división político-administrativa vigente; coordenadas UTM, Datum WGS 84, Huso 19 S. (2) Según división político-administrativa de 1887, este sitio pertenecía a la antigua Provincia de Cautín, territorio donde se describió *A. verrucosus*. (3) Este sitio pertenecía a la Provincia de Valdivia.

Los individuos recolectados fueron sometidos a eutanasia mediante sobredosis de anestésico, utilizando una solución de benzocaína tamponada a una concentración de 250 - 350 mg/l. Tras una hora de inmersión, se fijaron en etanol absoluto (99,8%) para su posterior análisis en laboratorio. El hidrocloreuro de benzocaína es ampliamente reconocido como un método de eutanasia efectivo y aceptable para anfibios (Close et al., 1996; AVMA, 2020). Por otro lado, para los individuos adultos o juveniles que no fueron recolectados se obtuvieron muestras de mucosa bucal utilizando hisopos Copan 516CS01, secados con gel de sílice (Correa et al., 2018, 2025). Los individuos examinados fueron liberados inmediatamente en el mismo sitio de captura. Finalmente, tanto los individuos recolectados como las muestras de mucosa bucal se llevaron al Laboratorio de Sistemática y Conservación de Herpetozoos (SyCoH) de la Universidad de Concepción, donde se realizaron los análisis posteriores.



Figura 5. Sitios de muestreo de *Alsodes* sp. en la sección andina de la Región de La Araucanía: 1) Río Pino Hachado, 2) Afluyente estero Icalma, 3) Estero Icalma, 4) Quililche, 5) Resbaloso y 6) Pucón.

4.2. Obtención de ADN y secuencias mitocondriales

El ADN genómico se extrajo de diferentes tipos de tejido según la etapa de desarrollo ontogénico del individuo y de si fue o no recolectado. Para los adultos y juveniles recolectados se utilizaron muestras de músculo del muslo o lengua, mientras que para los renacuajos se extrajo músculo de la cola (Correa et al., 2013, 2025). Para los individuos no recolectados se usaron las muestras de mucosa bucal obtenidas en terreno. La extracción de ADN se realizó con un kit comercial (Promega ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La amplificación del ADN mitocondrial (mtDNA) se efectuó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los partidores (*primers*) indicados en la Tabla 2. Los productos

de PCR fueron fragmentos parciales de genes mitocondriales con distintos niveles de variación: citocromo b (*cytb*), ARN ribosomal 12S (12S), ARN ribosomal 16S rRNA (16S) y un fragmento intermedio entre 12S-16S, que incluye el gen tRNA-Val (12S-16S/tRNA-Val). Estos genes fueron seleccionados por su uso previo (individualmente o en conjunto) en diversos estudios enfocados en resolver las relaciones de parentesco dentro de *Alsodes* (Blotto et al., 2013; Charrier et al., 2015; Correa et al., 2018, 2020, 2025; Barrasso et al., 2022; Mella-Romero et al., 2022; Rabanal et al., 2022), donde demostraron ser útiles para este tipo de análisis. Las concentraciones finales o cantidades de reactivos de la mezcla de PCR fueron: 3 mM de MgCl₂, 120 μM de cada dNTP, 83.3 nM de cada partidor, 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen, *Thermo Fisher Scientific*, USA) y 10-150 ng de ADN total. El perfil térmico utilizado para amplificar los genes 12S, 16S y 12S-16S/tRNA-Val comprendió un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, seguido de 38 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 segundos, alineamiento a 56°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 50 segundos, concluyendo con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. El perfil térmico para el gen *cytb* fue similar, con un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 segundos, alineamiento a 56°C por 50 segundos y extensión a 72°C por 50 segundos, finalizando también con una extensión a 72°C durante 10 minutos. Para verificar la amplificación de los fragmentos de los genes de interés, los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, lo que permitió confirmar la presencia de los amplicones con los tamaños esperados. Finalmente, los productos obtenidos se secuenciaron en ambas direcciones utilizando un secuenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Macrogen Inc., Corea).

Tabla 2. Partidores usados para PCR y secuenciación.

Gen	Partidor	Secuencia (5' - 3')	Referencia
Cytb	MVZ15-L	GAACTAATGGCCACACWWTACGNAA	Moritz et al. (1992)
Cytb	CytbAR-H	TAWAAGGGTCTTCTACTGGTTG	Goebel et al. (1999)
12S	H1478	TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT	Kocher et al. (1989)
12S	L1091	AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT	Kocher et al. (1989)
16S	16Sar-L	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Palumbi et al. (1991)
16S	16Sbr-H	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Palumbi et al. (1991)
12S-16S/tRNA-Val ¹	1216H	TGATTACGCTACCTTYGCACGGT	Correa et al. (2008)
12S-16S/tRNA-Val ²	1216LN	CCAAYACGTCAGGTCAAGGTG	Correa et al. (2008)

Notas: (1) El fragmento 12S-16S incluye el gen tRNA-Val; modificado del partidor L2751 de Richards & Moore (1996). (2) El fragmento 12S-16S incluye el gen tRNA-Val, modificado del partidor Hedges16H10 de Hedges (1994).

4.3. Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron inspeccionadas y editadas utilizando el *software* BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999). En el análisis se incorporaron secuencias de 56 individuos que pertenecen a 17 de las 19 especies actualmente reconocidas para el género *Alsodes*, excluyendo únicamente a *A. kaweshkari* y *A. monticola*. Las secuencias se obtuvieron de los trabajos previos de Faivovich et al. (2005), Blotto et al. (2013), Charrier et al. (2015) y Correa et al. (2020, 2025). Utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), integrado en MEGA 11 (Tamura et al., 2021), se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias agrupadas para cada gen, manteniendo los parámetros predeterminados. Los alineamientos resultantes fueron concatenados en una matriz única mediante el *software* Mesquite v3.81 (Maddison & Maddison, 2023).

Para inferir las relaciones evolutivas de las nuevas poblaciones de *Alsodes* sp. se llevó a cabo un análisis filogenético basado en Inferencia Bayesiana (IB), utilizando el clúster en línea CIPRES

Science Gateway v3.3 (Miller et al., 2010). El análisis se aplicó de forma independiente a dos conjuntos de datos: el fragmento 12S-16S y el gen *cytb*, para el cual se consideró cada posición de codón como una partición distinta (cuatro particiones en total). Para cada partición se implementó el método *model jumping*, cuyo algoritmo permite explorar dinámicamente los múltiples submodelos de sustitución dentro del espacio definido por el modelo Tiempo General Reversible (GTR). Este enfoque incorporó además los parámetros de heterogeneidad de tasas gamma (Γ) y la proporción de sitios invariables (I). El modelo GTR+ Γ +I ha sido empleado consistentemente en los estudios moleculares más recientes en *Alsodes* (eg. Correa et al., 2018, 2020, 2025; Mella-Romero et al., 2022; Rabanal et al., 2022). El análisis se realizó en MrBayes v3.2.7a (Ronquist et al., 2012) ejecutado en XSEDE, con 4 cadenas independientes iteradas durante 20 millones de generaciones y una frecuencia de muestreo cada 1.000 generaciones. El primer 25% (5 millones) de los árboles se descartó como *burn-in*, tras confirmar la estacionariedad de las probabilidades de los árboles filogenéticos mediante la inspección de las verosimilitudes logarítmicas en Tracer v1.7.1 (Rambaut et al., 2018). Para evaluar la convergencia y robustez del análisis, se examinaron tres parámetros estadísticos: la desviación estándar promedio de las frecuencias divididas (ASDSF), el tamaño efectivo de muestra (ESS) y el factor de reducción de escala potencial (PSRF). Los valores de ASDF $<0,01$; ESS >200 y PSRF $\leq 1,0$ se consideraron adecuados. Siguiendo trabajos previos (eg. Correa et al., 2018, 2025; Mella-Romero et al., 2022; Rabanal et al., 2022), el árbol de consenso resultante fue enraizado con un espécimen de *Eupsophus calcaratus*, que corresponde al género hermano de *Alsodes* (Blotto et al., 2013). Finalmente, el árbol filogenético obtenido se visualizó en FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2018), incorporando los valores de probabilidad posterior de los nodos.

4.4. Observaciones morfológicas

Se identificaron los principales caracteres morfológicos externos de los individuos adultos de *Alsodes* sp., utilizando una lupa estereoscópica y un pie de metro digital de 0,01 mm de precisión. Para facilitar la comparación de los individuos examinados con las descripciones taxonómicas de las especies congénicas de mayor proximidad geográfica a la Araucanía andina, se adoptó la terminología y los caracteres morfológicos externos habitualmente reportados en anuros, siguiendo a Cei (1962, 1980). De este modo, la inspección de los individuos se centró en el reconocimiento de rasgos diagnósticos de relevancia para la diferenciación taxonómica dentro del género, tales como la textura de la piel dorsal y ventral, patrones de coloración, forma del hocico, disposición y forma de los tubérculos palmares y plantares, grado de desarrollo del pliegue supratimpánico y de las membranas interdigitales, entre otros.

5. RESULTADOS

5.1. Recolección de muestras

Las prospecciones herpetológicas realizadas en los seis sitios de muestreo permitieron la recolección de 21 individuos de *Alsodes*, que abarcaron distintos estados ontogénicos (Figura 6): dos machos y dos hembras adultas, 6 juveniles y 11 larvas (Tabla 3). En todas las localidades se registraron individuos en fase larval (letra A; Figura 6), con mayor abundancia en remansos de arroyos de corriente moderada y en pozas someras. De acuerdo con la clasificación de Orton (1953), las larvas de *Alsodes* sp. corresponden al tipo central generalizado y presentan una fase larval de vida libre. Se alimentan de forma exotrófica y exhiben un ecomorfotipo lótico-bentónico, conforme a los gremios propuestos por Altig & Johnston (1989). En varios sitios se observó la coexistencia de larvas de distintos tamaños (hasta 60 mm), presumiblemente pertenecientes a cohortes de diferentes temporadas reproductivas, lo que sugiere un periodo larval prolongado, que excede un ciclo anual. Los juveniles (letra B; Figura 6), por su parte, se localizaron fundamentalmente en los bordes de los arroyos y en el sotobosque, ocultos en oquedades o bajo troncos caídos. Finalmente, los individuos adultos (letras C y D; Figura 6) se detectaron en el interior de los arroyos, ocultos entre rocas y troncos, tanto en el cauce como en sus márgenes inmediatos. Excepcionalmente, se registró un macho adulto refugiado en el interior de una cavidad horizontal de al menos 50 cm de longitud, ubicada en uno de los costados del afluente principal al estero Icalma.



Figura 6. Individuos de *Alsodes* sp. en distintos estados ontogénicos. A) Larva; B) Juvenil; C) Macho adulto; D) Hembra adulta.

Tabla 3. Muestras de *Alsodes* sp. obtenidas en los distintos sitios de muestreo

Sitio N°	Localidad	N° de Muestras	Código Muestras
1	Río Pino Hachado	3 larvas	RPHL1
2	Afluente estero Icalma	2 juveniles – 4 larvas	ERP1 - ERP2; ERL1 a ERL4
3	Esteros Icalma	2 machos – 2 hembras – 2 juveniles	EIc1 a EIc6
4	Quililche	1 juvenil	QuiJ1
5	Resbaloso	1 juvenil – 1 larva	ResJ1 - ResL1
6	Pucón	3 larvas	PucL2 - PucL3

5.2. Alineamiento de secuencias de ADN

La matriz concatenada (Figura 7) incluyó 2.954 sitios nucleotídicos, considerando posiciones con gaps, de los cuales 2.001 correspondieron al fragmento 12S-16S y 953 al gen cytb. Este último mostró un mayor nivel de variabilidad, con un 39,1% de sitios variantes, en contraste con 12S-16S, que presentó un 18,6% y fue más conservado. Complementariamente, se estimó el número de sitios informativos por parsimonia, como un indicador de la variabilidad cruda del alineamiento. En la matriz de secuencias, el fragmento 12S-16S presentó 210 sitios informativos, mientras que cytb incluyó 282.

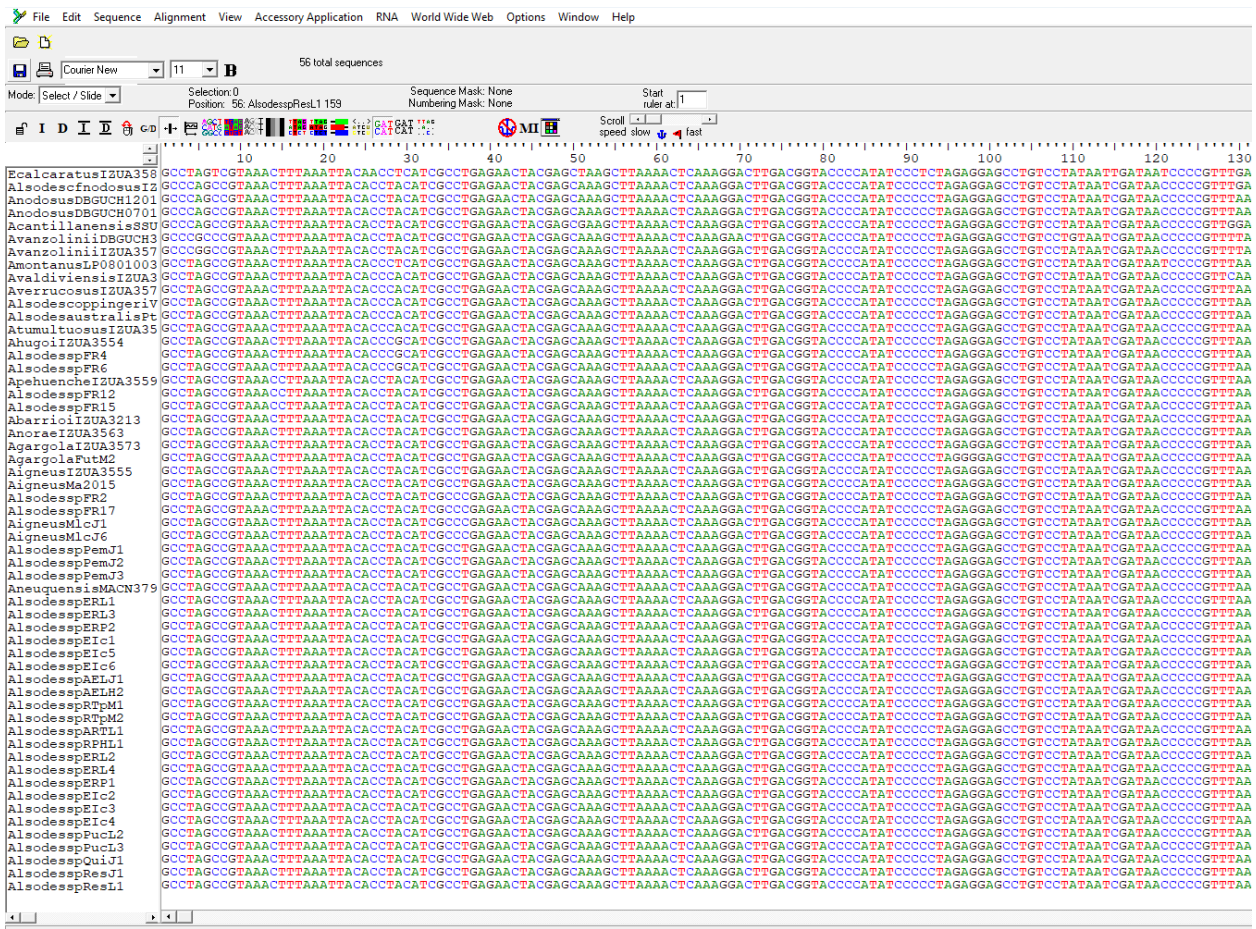


Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias mitocondriales concatenadas utilizado para el análisis filogenético (vista parcial).

5.3. Relaciones filogenéticas

De acuerdo con la topología del árbol consenso (Figura 8), *Alsodes* es recuperado como un grupo monofilético que se divide primariamente en dos clados principales (que aquí se nombran de acuerdo con la primera especie nominal descrita dentro de cada agrupamiento): el primero con tres especies [Nodo A, Figura 8], representado por *A. nodosus* (Duméril y Bibron, 1841), que también incluye a *A. vanzolinii* (Donoso-Barros, 1974) y *A. cantillanensis* Charrier, Correa, Castro y Méndez, 2015; y un segundo clado que agrupa a las 14 especies restantes incluidas en el análisis [Nodo B, Figura 8], representado por *A. coppingeri* (Günther, 1881). En este último clado [Nodo B] se reconocen agrupamientos que son congruentes con varios estudios previos, particularmente con los más recientes (eg. Mella-Romero et al., 2022; Rabanal et al., 2022; Correa et al., 2025), y a su vez se subdivide en tres clados secundarios. El primero es el clado de *A. montanus* (Lataste, 1902), que se recupera como monoespecífico y muestra una divergencia temprana respecto a sus grupos hermanos, además de una longitud de rama proporcionalmente más larga, lo que indica una mayor acumulación de cambios evolutivos en este linaje. El segundo clado secundario [Nodo C, Figura 8] comprende a *A. valdiviensis* Formas, Cuevas y Brieva, 2002; que internamente es recuperado como grupo hermano del subclado representado por *A. coppingeri*, que también incluye a *A. verrucosus* y *A. australis* Formas, Úbeda, Cuevas y Nuñez, 1997. El tercer y último clado secundario [Nodo D, Figura 8] está representado en su conjunto por *A. vittatus* (Philippi, 1902) y se separa en tres subclados: El primero incluye a *A. tumultuosus* Veloso, Iturra y Galleguillos, 1979; *A. hugoi* Cuevas y Formas, 2001 y a una población de *Alsodes* sp. originaria del Fundo El Rosario (FR4 y FR6), reportada por Correa et al. (2020) y cuyo estatus taxonómico es incierto. El segundo subclado [Nodo E, Figura 8] está constituido por *A. pehuenche* Cei, 1976; el cual se recupera como grupo hermano de un linaje

adicional indeterminado, también procedente del Fundo El Rosario (FR12 y FR15). Por último, el tercer subclado [Nodo F, Figura 8] incluye a *A. vittatus* y presenta una politomía no resuelta. El nodo basal de este subclado muestra un bajo soporte estadístico, con un valor de probabilidad posterior (PP)=0,88; lo que indica una falta de resolución con respecto al clado que incluye a *A. pehuenche*. Dentro del subclado de *A. vittatus* se reconocen seis linajes, la mayoría respaldados por altos valores de soporte nodal y que en general coinciden con diferentes especies nominales. Entre ellos se encuentran los linajes de *A. norae* Cuevas, 2008; *A. gargola* Gallardo, 1970; *A. barrioi* Veloso, Diaz, Iturra y Penna, 1981 y de *A. igneus* Cuevas y Formas, 2005. Los dos linajes restantes están representados por *A. vittatus* y *Alsodes* sp., los cuales incluyen a las nuevas poblaciones descubiertas en la Araucanía andina. De forma equivalente a lo obtenido por Correa et al. (2025), un espécimen de *A. vittatus* (RTpM1) muestra una estrecha relación (PP=0,91) con *A. neuquensis* Cei, 1976 de Primeros Pinos, en Argentina (MACN 37942). Asimismo, el espécimen RTpM2 evidencia un vínculo evolutivo cercano (PP=0,97) con la nueva población ubicada en el río Pino Hachado (RPHL1, sitio 1) y en el afluente del estero Icalma (ERL1 y ERL3, sitio 2, Figura 8). Por último, en este agrupamiento también se aprecia la alta proximidad evolutiva (PP=0,96) entre las poblaciones del estero Icalma y su afluente (sitios 2 y 3, Figura 8). Finalmente, el linaje de *Alsodes* sp. se distribuye en la sección más austral de la Araucanía andina, incluyendo los sitios 3 a 6 en la Figura 8. El nodo basal de esta agrupación presenta un soporte máximo (PP=1), lo que indica un linaje evolutivo diferenciado, que molecularmente no está vinculado a ninguna especie nominal.

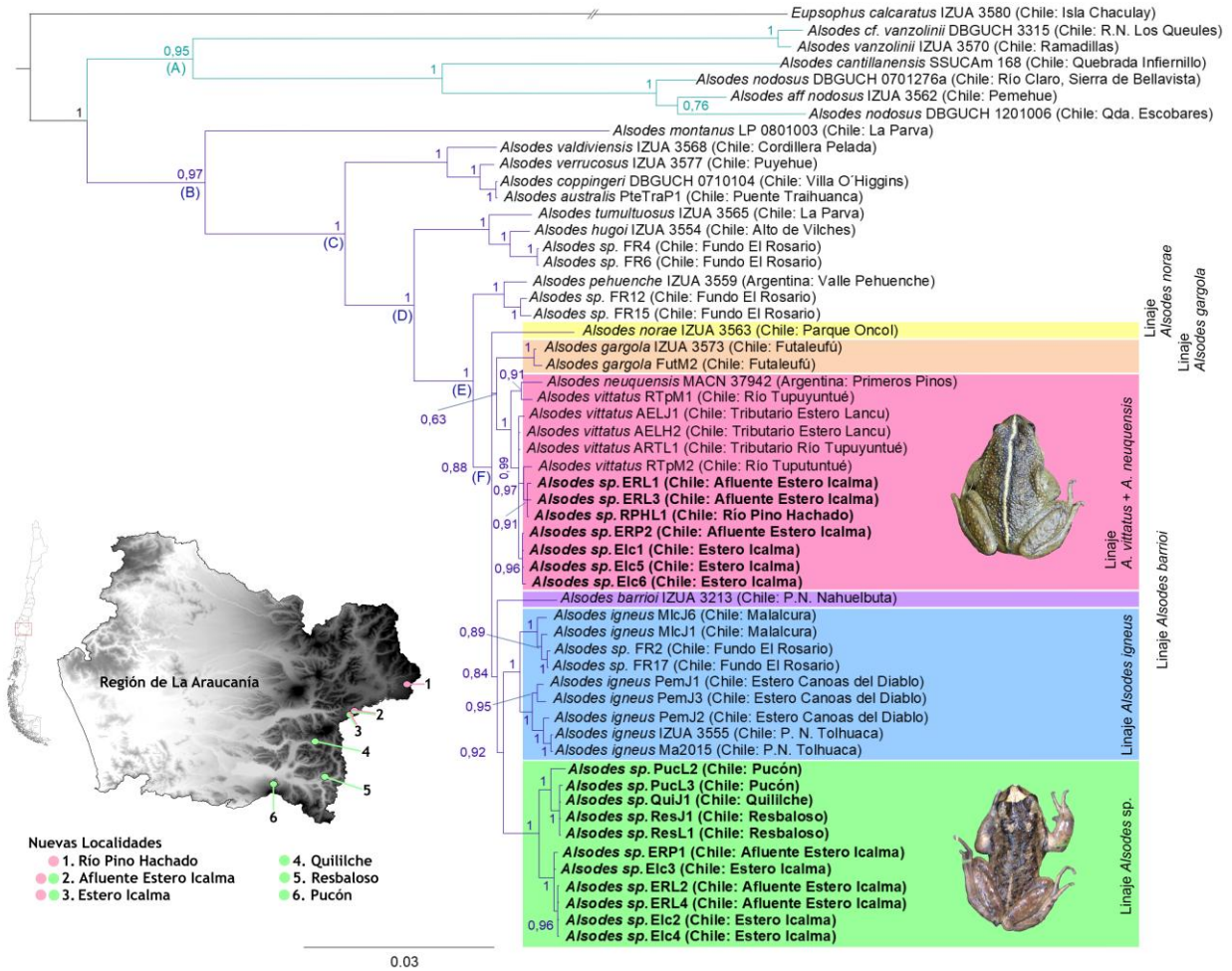


Figura 8. Árbol de consenso bayesiano del género *Alsodes* (regla de la mayoría del 50%) que exhibe la posición filogenética de las nuevas poblaciones identificadas en la Araucanía andina. Las letras entre paréntesis representan los nodos de los clados principales. Los seis linajes identificados en el subclado (F) de *A. vittatus* se muestran en colores. Los individuos de las nuevas poblaciones están resaltados en negrita. Los números junto a los nodos corresponden a las probabilidades posteriores y la barra de escala debajo del árbol representa las sustituciones esperadas por sitio a lo largo de las ramas.

5.4. Observaciones morfológicas

La inspección de los caracteres morfológicos externos en los ejemplares adultos de *Alsodes* sp., representados por el macho E1c3 (LHC=50,1 mm; Figura 9) y la hembra E1c4 (LHC=55,7 mm), ambos recolectados en el estero Icalma, reveló que sus configuraciones morfológicas no se ajustan plenamente a la diagnosis de ninguna de las especies nominales consideradas candidatas por su cercanía geográfica (*A. igneus*, *A. neuquensis*, *A. verrucosus* y *A. vittatus*), lo que sugiere la existencia de una entidad morfológica diferenciada. La marcada heterogeneidad y falta de estandarización en la descripción de los caracteres diagnósticos consignados en los holotipos de estas especies (ver Anexo 3), imposibilitaron una comparación morfológica simultánea y exhaustiva, restringiendo el análisis comparativo a los únicos caracteres mencionados en las descripciones originales, especialmente en *A. verrucosus* y *A. vittatus*. A pesar de estas limitaciones, la combinación de caracteres observados en los individuos de *Alsodes* sp. muestran mayor afinidad fenotípica con *A. igneus* que con las demás especies candidatas; sin embargo, las diferencias detectadas no permiten la asignación inequívoca a esta especie. Un resumen comparativo de las diferencias morfológicas de mayor relevancia encontradas en los caracteres externos de *Alsodes* sp. y las especies candidatas, se presenta en la Tabla 4.

Por otra parte, en el estero Icalma también se recolectaron los individuos adultos E1c5 (hembra, LHC=55,4 mm) y E1c6 (macho, LHC=59,8 mm), los cuales, según el análisis filogenético, exhiben alta afinidad con *A. vittatus*. No obstante, ambos individuos mostraron ciertas diferencias fenotípicas respecto a E1c3 y E1c4, distanciándose de la morfología consignada en el holotipo de *A. vittatus*. En las hembras, E1c4 exhibió un patrón de coloración dorsal marrón más claro, un patrón dorsal con manchas más definidas y un pliegue supratimpánico menos desarrollado, limitado a la región anterior de la inserción del brazo, en contraste con E1c5. En los

machos, se observaron variaciones en la forma del tubérculo metacarpal interno, redondo en E1c3 y ovalado en E1c6, así como en el tubérculo subarticular del dedo I, más prominente en E1c6. Además, se detectaron diferencias en los caracteres sexuales secundarios, con excrecencias nupciales restringidas al dedo I en E1c3, mientras que en E1c6 se extienden a los dedos I y II, aunque esta diferencia podría atribuirse al estado ontogénico de E1c3, por corresponder más bien a un subadulto. La validez e importancia relativa de estas diferencias potencialmente diagnósticas requiere confirmación mediante una muestra de especímenes adultos más amplia, que incluya representantes de las nuevas poblaciones de *Alsodes* sp. registradas al sur del estero Icalma (Quililche, Resbaloso y Pucón), donde solo se registraron juveniles pequeños y larvas.

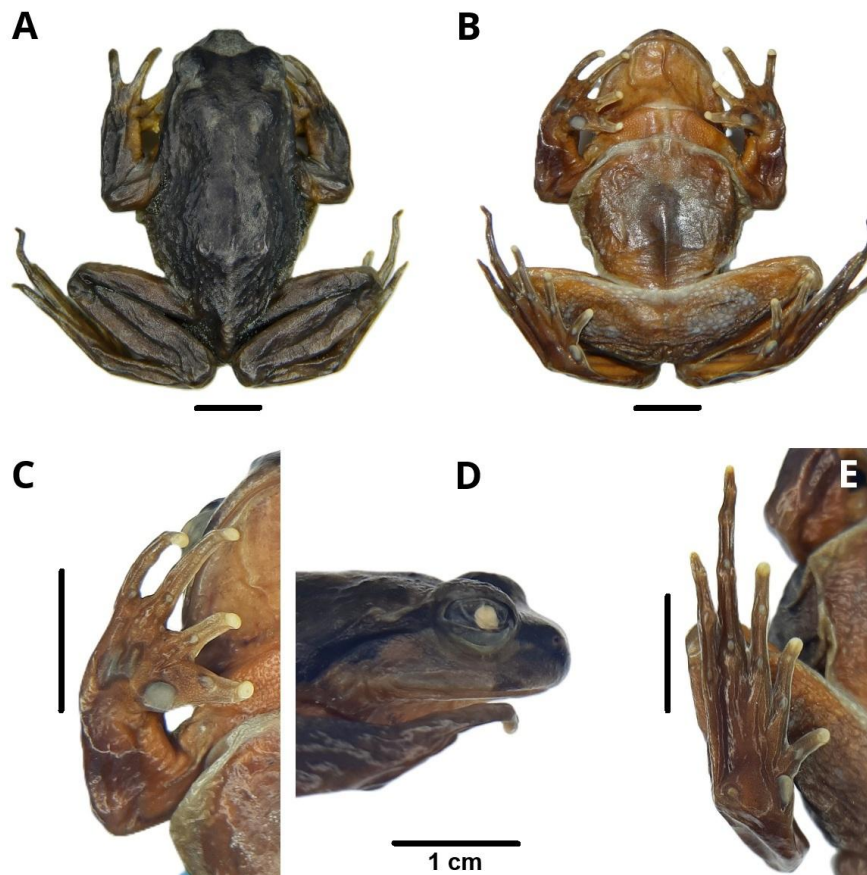


Figura 9. Detalles morfológicos externos del macho E1c3 de *Alsodes* sp. A) Vista dorsal; B) Vista ventral; C) Vista de la superficie palmar; D) Vista lateral de la cabeza; E) Vista de la superficie plantar.

Tabla 4. Resumen de las diferencias morfológicas diagnósticas entre *Alsodes* sp. y las especies congénéricas de mayor proximidad geográfica.

	<i>A. verrucosus</i> ¹	<i>A. vittatus</i> ²	<i>A. neuquensis</i> ³	<i>A. igneus</i>	<i>Alsodes</i> sp. Macho E1c3 (LHC: 50,1 mm) / Hembra E1c4 (LHC=55,7 mm)
Rasgo	Holotipo: No informado (LHC: 47 mm)	Holotipo: No informado (LHC: 41 mm)	Holotipo: Macho (LHC: 52 mm)	Holotipo: Hembra (LHC: 66,6 mm)	
Narinas				Narinas ligeramente protuberantes y situadas a medio camino entre la punta del hocico y el borde anterior de los ojos	Hembra: Narinas no protuberantes, situadas más cerca de la punta del hocico que del borde anterior de los ojos
<i>Canthus rostralis</i>				Con <i>canthus rostralis</i> bien desarrollado	Hembra: El <i>canthus rostralis</i> es obtuso, redondeado y desarrollo moderado.
Dorso	Cuerpo por encima negruzco, sin manchas	La parte superior del cuerpo es de un negro más o menos intenso a excepción de una banda blanca o amarilla, que corre de la punta del hocico hasta el ano			Macho: Dorso marrón oscuro, con machas evidentes. No presenta línea vertebral que recorre todo el dorso y cabeza.
Tubérculos	En la palma de las manos y en la planta de los pies los tubérculos, así como los tubérculos subarticulares de los dedos son muy poco pronunciados		Tubérculos metacarpales y subarticulares moderados		Macho: Tubérculo palmar (metacarpal) interno redondo y prominente; externo bilobulado y prominente. Tubérculos plantares (metatarsales) subarticulares redondos y moderados.

Pliegues		Pliegue supratimpánico es débil	Pliegue supratimpánico bien desarrollado, no alcanza la inserción del brazo	Hembra: Pliegue supratimpánico bien desarrollado, alcanza la inserción del brazo, más extendido en el macho.
Piel	Piel lisa	La piel es lisa, con escasas glándulas en la espalda		Macho: Piel con numerosas glándulas en la espalda

Notas: Especies descritas originalmente como (1) *Borborocoetus verrucosus*; (2) *Cystignathus vittatus*; (3) *Alsodes gargola neuquensis*. Longitud hocico-cloaca (LHC).

6. DISCUSION

La compleja orografía y el difícil acceso a la cordillera andina de la Región de La Araucanía han representado un desafío histórico para la exploración científica, lo que ha producido importantes vacíos en el conocimiento de su biodiversidad, incluyendo la fauna de anfibios del género *Alsodes*. Entre las contribuciones más significativas sobre la distribución del grupo en este territorio se encuentra Philippi (1902), con la descripción de *A. verrucosus* (*Borborocoetus verrucosus*) y *A. vittatus* (*Cystignathus vittatus*), así como Cuevas & Formas (2005), con la descripción de *A. igneus*. Más recientemente, Correa et al. (2025) ratificaron, por primera vez en más de un siglo, la existencia de *A. vittatus* y también documentaron nuevos registros de *A. igneus* al norte de su localidad tipo. Si bien estas referencias sustentan el conocimiento actual del género en esta sección de los Andes, también manifiestan una clara asimetría en la cobertura geográfica de la información, ya que los datos disponibles se concentran en la porción septentrional de la Araucanía andina, mientras que extensas áreas del centro y sur de este territorio han permanecido prácticamente inexploradas y sin registros formales de *Alsodes*. En este contexto, el presente estudio representa un avance sustancial en la comprensión biogeográfica del género en los Andes araucanos, al reportar seis nuevas poblaciones al sur de los registros de Correa et al. (2025) y establecer su posición filogenética mediante el análisis molecular más exhaustivo realizado hasta la fecha para este grupo. Los resultados revelaron que esas seis poblaciones representan dos linajes mitocondriales, uno completamente nuevo (*Alsodes* sp.), que no está asociado a ninguna especie descrita, y otro estrechamente relacionado con *A. vittatus*. Ambos linajes tienen distribuciones principalmente alopátricas, pero coexisten en el estero Icalma y su afluente principal. A su vez, en las localidades ubicadas al sur de Icalma solo se detectó el linaje mitocondrial de *Alsodes* sp., mientras que hacia el norte únicamente se

identificó el linaje mitocondrial relacionado con *A. vittatus*. Las implicancias taxonómicas y biogeográficas derivadas de estos hallazgos se abordan en los párrafos siguientes.

La reconstrucción filogenética realizada mediante inferencia bayesiana incluyó 17 de las 19 especies actualmente reconocidas para el género, siendo el análisis más completo y actualizado hasta la fecha. Los resultados fueron congruentes con hipótesis evolutivas previamente propuestas, tanto aquellas basadas en datos mitocondriales (Correa et al., 2018, 2020, 2025; Mella-Romero et al., 2022; Rabanal et al., 2022) como las que integran evidencia mitocondrial y nuclear (Blotto et al., 2013; Charrier et al., 2015). En concordancia con estos estudios, *Alsodes* se recuperó como un grupo monofilético, estructurado en dos clados principales con alto soporte estadístico. El primero agrupó a *A. nodosus*, *A. vanzolinii* y *A. cantillanensis*, especies endémicas de la zona central de Chile; mientras que el segundo incluyó a las 14 especies restantes consideradas en este análisis, mayoritariamente distribuidas en la vertiente occidental de los Andes, desde la zona centro-sur hasta la Patagonia. Dentro de este segundo clado se incluyen los dos linajes mitocondriales correspondientes a las seis poblaciones nuevas, que se agrupan junto a varias especies en lo que aquí se denomina el subclado de *A. vittatus* (conformado por las especies nominales *A. vittatus*, *A. gargola*, *A. neuquensis*, *A. barrioi*, *A. igneus* y *A. norae*). Las relaciones internas dentro de esta agrupación no se pueden considerar resueltas debido a que sus ramas basales son muy cortas y los nodos basales tienen valores bajos de respaldo estadístico. Sin embargo, las nuevas poblaciones se reparten en dos grupos sustentados por altos valores de probabilidad posterior, uno que incluye a *A. vittatus* y *A. neuquensis* (recuperado también por Correa et al., 2025) y otro que incluye solo a las poblaciones no descritas. Estas dos agrupaciones no se relacionan directamente, ya que uno sería el grupo hermano de *A. gargola* y el otro el grupo hermano de *A. igneus*, aunque hay que destacar que en ambos casos estas

relaciones están débilmente soportadas (Figura 8). Otro resultado importante es que los especímenes del estero Icalma y su afluente principal están representados en estos dos linajes. A diferencia del linaje estrechamente relacionado con *A. vittatus*, que como se mencionó anteriormente, también incluye a *A. neuquensis*, el segundo linaje es completamente nuevo y no está vinculado a ninguna especie previamente descrita, por lo que ha sido provisionalmente denominado *Alsodes* sp. Al compararlo con las demás agrupaciones del subclado de *A. vittatus*, se observa que este nuevo linaje presenta un nivel de diferenciación equivalente al de aquellas agrupaciones que sí corresponden a especies nominales, lo que sugiere que podría representar una especie distinta.

Desde el punto de vista morfológico, los ejemplares adultos del estero Icalma asociados al linaje de *A. vittatus* (E1c5 y E1c6) y al de *Alsodes* sp. (E1c3 y E1c4) no mostraron correspondencia fenotípica con ninguna de las especies nominales consideradas candidatas por su proximidad geográfica, tanto de la vertiente oriental (*A. neuquensis*, *A. verrucosus*) como occidental (*A. igneus*, *A. verrucosus* y *A. vittatus*) de los Andes. Esta falta de correspondencia sugiere la existencia de una entidad morfológicamente diferenciada. Sin embargo, la dificultad para determinarla taxonómicamente podría estar fuertemente influenciada por la alta heterogeneidad y escasa estandarización en las descripciones de los holotipos, restringiendo las comparaciones a los únicos caracteres mencionados en las descripciones originales. Esta limitación fue particularmente evidente en el caso de *A. verrucosus* y *A. vittatus*, especies someramente descritas por Philippi (1902). A pesar de estas restricciones, los individuos adultos de *Alsodes* sp. presentaron una mayor afinidad fenotípica con *A. igneus* que con las restantes especies candidatas. No obstante, las diferencias morfológicas observadas impiden una asignación taxonómica inequívoca.

La superposición de caracteres morfológicos parece ser una condición recurrente en *Alsodes*, donde las diagnósis específicas suelen fundamentarse en combinaciones de caracteres, más que en características externas únicas y consistentemente diagnósticas. De hecho, existe evidencia creciente de que atributos como los patrones de coloración dorsal, la forma del hocico, el grado de desarrollo de las membranas interdigitales o la presencia de línea vertebral exhiben una notable variabilidad geográfica. Lo anterior ha sido documentado en especies como *A. gargola*, *A. hugoi*, *A. igneus* y *A. vittatus* (Blotto et al., 2013; Correa et al., 2018, 2020, 2025) y se ha interpretado como resultado de polimorfismos intra e interpoblacionales, más que como una diferenciación fenotípica con valor diagnóstico.

La ausencia de ejemplares adultos durante las prospecciones realizadas en las localidades situadas al norte (río Pino Hachado) y al sur (Quililche, Resbaloso y Pucón) del estero Icalma y su afluente, limitó la evaluación del rango geográfico del morfotipo detectado en este estudio. Dado que la identidad taxonómica de la población de Icalma no puede establecerse únicamente sobre la base de evidencia genética mitocondrial (Correa et al., 2020) y considerando las divergencias fenotípicas observadas respecto a las especies nominales, el estatus taxonómico de esta población permanece incierto.

Según los resultados de la reconstrucción filogenética, el linaje de *Alsodes* sp. presenta una distribución que se extiende desde el estero Icalma y su afluente hacia el sur, alcanzando la localidad de Pucón. En contraste, el linaje emparentado con *A. vittatus* se distribuye desde Icalma hacia el norte, hasta el sector del río Pino Hachado. En consecuencia, el estero Icalma y su afluente constituyen las únicas localidades, en más de 100 km muestreados, donde se detectó la coexistencia de ambos linajes mitocondriales. Esta es la primera evidencia de mezcla de linajes mitocondriales dentro de una misma población en la Región de La Araucanía y, por

consiguiente, en la zona sur del país. Antes de este estudio, tal condición solo se había registrado en dos poblaciones, Cajón de Plaza, en la Región del Maule (Correa et al., 2018) y Fundo El Rosario, en la Región de Ñuble (Correa et al., 2020). La coexistencia de ambos linajes en Icalma, sugiere que esta área podría corresponder a una zona de contacto secundario, planteando nuevas interrogantes sobre la ocurrencia de posibles eventos históricos de hibridación o introgresión mitocondrial, las que deberán ser abordadas mediante la incorporación de datos genómicos nucleares, excediendo el alcance de la presente investigación.

La extensa zona que se extiende entre Icalma y Pucón alberga una importante variedad de pisos de vegetación, que van desde bosques perennifolios dominados por *Araucaria araucana* y *Nothofagus dombeyi*, hasta bosques caducifolios mixtos donde predominan *Nothofagus pumilio* y *Araucaria araucana* (Luebert & Pliscoff, 2017). En este territorio, la identificación del linaje de *Alsodes* sp. se basó exclusivamente en el análisis de individuos juveniles y larvas. Por esta razón, aunque se hipotetice la posibilidad de que podría representar una especie no descrita, su reconocimiento formal requiere ampliar la muestra con especímenes adultos y complementar la información mitocondrial con distintas líneas de evidencia (morfológica, ecológica, genética nuclear, entre otras), que permitan sustentar sólidamente esta propuesta. Por ahora, y con la información disponible, este linaje debe considerarse como representativo de una especie putativa, asociada a los bosques montanos andinos de *Araucaria araucana* y *Nothofagus* spp.

Por otro lado, además de Icalma, el linaje relacionado con *A. vittatus* fue registrado en el nacimiento del río Pino Hachado, cerca de la frontera con Argentina. Esta población se encuentra a unos 38 km en línea recta de Primeros Pinos (localidad tipo de *A. neuquensis*) y aproximadamente a 55 km del río Tupuyuntué, donde Correa et al. (2025) documentaron ejemplares que atribuyeron a *A. vittatus*. En ese estudio, las poblaciones de *A. vittatus* mostraron

una estrecha afinidad filogenética con un individuo de *A. neuquensis*, lo que llevó a plantear la hipótesis de que ambas entidades podrían corresponder a una misma especie. Los resultados de la presente investigación recuperan la misma topología filogenética y ubican al individuo del río Pino Hachado dentro del linaje compartido por *A. vittatus* y *A. neuquensis*. Esta nueva población, situada a más de 1.800 m s.n.m. y en una zona de matorral bajo dominado por los arbustos espinosos *Discaria chacaye* y *Berberis empetrifolia* (Luebert & Pliscoff, 2017), se encuentra en una posición intermedia entre el río Tupuyuntué y Primeros Pinos. Por lo tanto, esta nueva localidad otorga conectividad geográfica a la distribución de este linaje, aportando evidencia adicional que refuerza la hipótesis de conespecificidad entre ambas entidades. Al igual que en otras poblaciones analizadas, la ausencia de ejemplares adultos en las muestras del río Pino Hachado (solo se recolectaron larvas) impidió una evaluación taxonómica concluyente. Por ello, la confirmación de la presencia de *A. vittatus* en esta localidad sigue siendo tentativa y la extensión formal de su distribución geográfica aun requiere validación morfológica.

En relación con la simpatría de *A. verrucosus* y *A. neuquensis* reportada por Cei (1987) en las proximidades de Primeros Pinos, Correa et al. (2025) ponen en duda tal coexistencia, argumentando que la presencia o ausencia de la línea vertebral en los individuos observados en esta localidad, podría deberse a un polimorfismo intraespecífico de *A. neuquensis*. Esto implicaría que esta última sería la única especie del género presente en esa zona y sus alrededores. Por otra parte, las secuencias mitocondriales que Formas & Vera (1983) atribuyeron a *A. verrucosus* provienen del Parque Nacional Puyehue, ubicado a más de 180 km al sur de la localidad tipo descrita por Philippi (1902) como “los Andes de la Provincia de Cautín”. En el presente estudio, dichas secuencias se agruparon con máximo soporte dentro del clado secundario representado por *A. coppingeri* (nodo C en la Figura 8), el cual no está directamente

relacionado con el linaje compartido por *A. vittatus* y *A. neuquensis*. Esto sugiere que los ejemplares de Puyehue identificados como *A. verrucosus* por Formas & Vera (1983), muy probablemente correspondan a otra especie, con distribución más austral. Además, la caracterización original de *A. verrucosus* no proporciona suficientes rasgos diagnósticos, al mismo tiempo que establece una localidad tipo extremadamente amplia, ya que en la época de Philippi la Provincia de Cautín abarcaba casi completamente la actual Región de La Araucanía (Figura 1). En consecuencia, las nuevas poblaciones de *Alsodes* aquí reportadas se localizan dentro del área geográfica descrita por Philippi para *A. verrucosus*, pero a pesar del extenso esfuerzo de muestreo realizado en este estudio, no se detectaron poblaciones atribuibles a esta especie, incluyendo el morfotipo identificado en Icalma. De esta manera, todos estos antecedentes permiten sugerir que *A. verrucosus* no está presente ni en Primeros Pinos ni en Puyehue. Además, este estudio y el de Correa et al. (2025), que en conjunto abarcan gran parte de la sección andina de la antigua Provincia de Cautín, tampoco registraron individuos atribuibles a esta especie, por lo que resulta razonable cuestionar su validez taxonómica. Tal como sugiere Correa et al. (2025), es posible que la diagnosis original de Philippi se haya basado en un ejemplar polimórfico de *A. vittatus*, idea que pareciera tener sentido desde un enfoque biogeográfico.

En síntesis, este estudio constituye un avance significativo en términos filogenéticos y biogeográficos, al demostrar que la distribución del género *Alsodes* en la sección andina de la Región de La Araucanía es considerablemente más extensa y que hay una mayor diversidad filogenética de lo que se había documentado hasta ahora, incluyendo un linaje mitocondrial que podría llegar a representar una nueva especie. No obstante, el actual conocimiento biogeográfico y evolutivo del género en esta sección de los Andes es limitado y aún incipiente. Por ello, resulta

fundamental continuar explorando nuevas localidades, con el fin de comprender mejor la diversidad específica del grupo y resolver algunos de los problemas taxonómicos pendientes, como la validez de *A. verrucosus* o la conespecificidad de *A. vittatus* y *A. neuquensis*.

Finalmente, las prospecciones realizadas revelaron un panorama preocupante para la conservación de *Alsodes*, marcado por la convergencia de amenazas de origen antrópico y climático. La recurrencia de incendios forestales, la presencia de ganado en arroyos y bosques, y la introducción de peces exóticos, son amenazas presentes en la mayoría de los sitios visitados, tal como señalan Correa et al. (2025) para la sección norte de la Araucanía. Al interactuar, estas amenazas pueden intensificar los efectos de la escasez hídrica asociada al cambio climático, afectando tanto la calidad como la disponibilidad de microhábitats húmedos, esenciales para el ciclo de vida de *Alsodes*. La mayoría de las nuevas poblaciones se localizaron en cursos de agua de primer orden, con larvas presentes en sectores puntuales. Por su parte, los adultos se registraron en solo una de las seis poblaciones estudiadas, pese a que los muestreos se realizaron en verano e incluyeron búsquedas nocturnas, cuando su actividad es mayor. Abordar estas amenazas mediante una gestión adaptativa es clave para conservar estas poblaciones y mantener la funcionalidad de los ecosistemas andinos, relevantes tanto para la biodiversidad como para el bienestar humano.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio representan un avance sustancial en el conocimiento filogenético y biogeográfico del género *Alsodes* en la sección andina de la Región de La Araucanía, revelando una diversidad no documentada previamente.

A través de un muestreo intensivo y el análisis de secuencias mitocondriales (cytb, 12S y 16S), se identificaron seis nuevas poblaciones que corresponden a dos linajes genéticamente diferenciados, uno estrechamente relacionado con *A. vittatus* y otro completamente nuevo, que no se agrupó con ninguna especie congénica conocida. Este linaje, denominado *Alsodes* sp., presentó niveles de divergencia equivalentes a los observados entre especies nominales del subclado de *A. vittatus*, lo que respalda su consideración como especie putativa, asociada a bosques montanos andinos de *Araucaria araucana* y *Nothofagus* spp. Ambos linajes mitocondriales identificados presentaron distribuciones principalmente alopátricas, pero convergen en el estero Icalma y su afluente principal, debido a posibles eventos históricos de hibridación o introgresión mitocondrial.

Los ejemplares adultos del estero Icalma, asociados a ambos linajes (*A. vittatus* y *Alsodes* sp.), no mostraron una correspondencia fenotípica clara con especies nominales consideradas candidatas por su proximidad geográfica, aunque muestran una mayor afinidad con *A. igneus*. Las limitaciones impuestas por descripciones históricas poco precisas, la superposición de caracteres diagnósticos entre especies y la ausencia de adultos en las otras localidades estudiadas, impidieron una asignación taxonómica concluyente.

El nuevo linaje (*Alsodes* sp.) se distribuye hacia el sur de Icalma, abarcando las localidades de Quililche, Resbaloso y Pucón. Aunque constituye una entidad filogenética diferenciada, no se pudieron examinar ejemplares adultos de estas localidades para establecer si comparten el

morfotipo identificado en Icalma, por lo cual el estatus taxonómico de estas poblaciones es incierto.

Por otra parte, el linaje relacionado con *A. vittatus* se extiende hacia el norte, hasta el nacimiento del río Pino Hachado. En este caso, tampoco se dispuso de ejemplares adultos de esta localidad, por lo que no se pudo ratificar la presencia de esta especie desde el punto de vista morfológico. Sin embargo, el hallazgo del linaje de *A. vittatus* en el río Pino Hachado refuerza la hipótesis de conespecificidad entre esta especie y *A. neuquensis*, propuesta en una investigación previa (Correa et al. 2025).

A pesar del esfuerzo de muestreo intensivo realizado en gran parte de la sección andina de la antigua Provincia de Cautín, no se registraron poblaciones atribuibles a *A. verrucosus*. Además, su presencia histórica en Primeros Pinos (Argentina) y otras localidades más australes, incluyendo Puyehue (Región de Los Lagos), es controversial. Estos antecedentes aportan evidencia adicional para cuestionar la validez taxonómica de *A. verrucosus*.

En conjunto, estos hallazgos no solo amplían el conocimiento sobre la diversidad genética y la distribución del género *Alsodes* en los Andes de la Región de La Araucanía, sino que también destacan la necesidad de estudios integrativos adicionales, que permitan resolver los problemas taxonómicos pendientes, como la validez de *A. verrucosus* o la conespecificidad de *A. vittatus* y *A. neuquensis*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Altig, R., & Johnston, G. F. (1989). Guilds of anuran larvae: Relationships among developmental modes, morphologies, and habitats. *Herpetological Monographs*, 3, 81–109.
- Alveal, N., Díaz-Páez, H., & Correa, C. (2021). Nueva localidad de *Alsodes igneus* Cuevas & Formas 2005 (Anura, Alsodidae) en la Región del Biobío, Chile. *Boletín Chileno de Herpetología*, 8, 84–87.
- American Veterinary Medical Association. (2020). AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
- Barrasso, D. A., Úbeda, C. A., Cotichelli, L., & Basso, N. G. (2022). On the presence of *Alsodes coppingeri* (Anura, Alsodidae) in Argentina, with comments on other southern *Alsodes*. *Neotropical Biodiversity*, 8(1), Article e4. <https://ikiam.researchcommons.org/neotropical-diversity/vol8/iss1/4/>
- Blotto, B. L., Núñez, J. J., Basso, N. G., Úbeda, C. A., Wheeler, W. C., & Faivovich, J. (2013). Phylogenetic relationships of a Patagonian frog radiation, the *Alsodes* + *Eupsophus* clade (Anura: Alsodidae), with comments on the supposed paraphyly of *Eupsophus*. *Cladistics*, 29(2), 113–131. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2012.00417.x>
- Cei, J. M. (1958). Las láminas originales del suplemento a los batraquios chilenos de Philippi: Primera impresión y comentarios. *Investigaciones Zoológicas Chilenas*, 4, 265–288.
- Cei, J. M. (1962). *Batracios de Chile*. Ediciones Universidad de Chile.
- Cei, J. M. (1976). Remarks on some Neotropical amphibians of the genus *Alsodes* from southern Argentina (Anura: Leptodactylidae). *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale di Torino*, 117(3–4), 159–161.

Cei, J. M. (1980). Amphibians of Argentina (Monitore Zoologico Italiano, N.S., Monografía 2). Italian Zoological Union.

Cei, J. M. (1987). Additional notes to “Amphibians of Argentina”: An update, 1980–1986. *Monitore Zoologico Italiano - Italian Journal of Zoology*, 21(3), 209–272.

Charrier, A., Correa, C., Castro, C., & Méndez, M. A. (2015). A new species of *Alsodes* (Anura: Alsodidae) from Altos de Cantillana, central Chile. *Zootaxa*, 3915(4), 540–550.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3915.4.5>

Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals*, 30(4), 293–316.
<https://doi.org/10.1258/002367796780739871>

Correa, C. (2022). Lista viva de las especies de anfibios de Chile (Versión 2022.1). Asociación Red Chilena de Herpetología (RECH). <https://www.herpetologiadechile.cl>

Correa, C., Morales, J., Schussler, C., & Ortiz, J. C. (2020). An enigmatic population of *Alsodes* (Anura, Alsodidae) from the Andes of central Chile with three species-level mitochondrial lineages. *Mitochondrial DNA Part A*, 31(1), 25–34.
<https://doi.org/10.1080/24701394.2019.1704744>

Correa, C., Riveros-Riffo, E., & Donoso, J. P. (2025). Lost for more than a century: The rediscovery of *Alsodes vittatus* (Philippi, 1902) (Anura, Alsodidae), one of the rarest and most elusive amphibians from Chile. *ZooKeys*, 1230, 195–212.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.1230.135523>

Correa, C., Zepeda, P., Lagos, N., Salinas, H., Palma, R. E., & Vásquez, D. (2018). New populations of two threatened species of *Alsodes* (Anura, Alsodidae) reveal the scarce

biogeographic knowledge of the genus in the Andes of central Chile. *Zoosystematics and Evolution*, 94(2), 349–358. <https://doi.org/10.3897/zse.94.25189>

Cuevas, C. C. (2008). A new species of the genus *Alsodes* (Anura: Neobatrachia) from the Nothofagus forest, coastal range, southern Chile, identified by its karyotype. *Zootaxa*, 1771, 43–53.

Cuevas, C. C., & Formas, J. R. (2003). Cytogenetics analyses of four species of the genus *Alsodes* (Anura: Leptodactylidae), with comments about the karyological evolution of the genus. *Hereditas*, 138, 138–147.

Cuevas, C. C., & Formas, J. R. (2005). A new frog of the genus *Alsodes* (Leptodactylidae) from the Tolhuaca National Park, Andes Range, southern Chile. *Amphibia-Reptilia*, 26, 39–48.

Crump, M. L., & Scott, N. J., Jr. (1994). Visual encounter surveys. In W. R. Heyer, M. A. Donnelly, R. W. McDiarmid, L. C. Hayek, & M. S. Foster (Eds.), *Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians* (pp. 84–92). Smithsonian Institution Press.

Díaz, N. (1989). Phenetic and phylogenetic relationships of the Chilean *Alsodes* and *Telmatobius* (Amphibia, Leptodactylidae) and proposal of a new genus. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 24(1), 25–33. <https://doi.org/10.1080/01650528909360772>

Díaz, N., & Núñez, H. (1988). Nuevo hallazgo de *Alsodes verrucosus* (Philippi, 1902) en Chile y descripción de su larva (Anura: Leptodactylidae). *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural de Chile*, 41, 87–94.

Díaz-Páez, H., Williams, C., & Griffiths, R. A. (2002). Diversidad y abundancia de anfibios en el Parque Nacional Laguna San Rafael (XI Región, Chile). *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*, 51, 135–145.

- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. Johns Hopkins University Press.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elgueta, E., Reid, S., Plischoff, P., Méndez, M. A., Núñez, J., & Smith-Ramírez, C. (2006). Catastro de vertebrados terrestres y análisis en seis hábitats presentes en la Reserva Nacional Futaleufú, provincia de Palena, X Región, Chile. *Gayana (Concepción)*, 70(2), 195–205. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000200006>
- Espinoza, E. (1897). *Jeografía descriptiva de la República de Chile: Arreglada según las últimas divisiones administrativas, las más recientes exploraciones i en conformidad al censo jeneral de la República levantado el 28 de noviembre de 1895*. Imprenta i Encuadernación Barcelona. <https://www.memoriachilena.gob.cl/602/w3-article-8110.html>
- Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., & Wheeler, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1–240. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2005\)294\[0001:SR0TFF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2005)294[0001:SR0TFF]2.0.CO;2)
- Formas, J. R. (1995). Anfibios. In J. A. Simonetti, M. T. K. Arroyo, A. E. Spotorno, & E. Lozada (Eds.), *Diversidad biológica de Chile* (pp. 314–325). Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT).
- Formas, J. R., & Brieva, L. M. (2004). The tadpoles of *Alsodes vanzolinii* and *A. verrucosus* (Anura: Leptodactylidae), with descriptions of their internal oral and chondrocranial morphology. *Amphibia-Reptilia*, 25, 151–164.

Formas, J. R., & Vera, M. I. (1983). Karyological relationships among frogs of the genus *Alsodes*, with description of the karyotypes of *A. vanzolinii* and *A. verrucosus*. *Copeia*, 1983, 1101–1107.

Frost, D. R. (2024). *Amphibian Species of the World: An online reference (Version 6.2)*. American Museum of Natural History. <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>

García-Rodríguez, A., Pérez-Peña, P., Oberle, B., & Wiens, J. J. (2021). Amphibian speciation rates support a general role of mountains as biodiversity pumps. *The American Naturalist*, 198(3), E68–E79. <https://doi.org/10.1086/715500>

Goebel, A. M., Donnelly, J. M., & Atz, M. E. (1999). PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(1), 163–199. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0538>

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.

Hedges, S. B. (1994). Molecular evidence for the origin of birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(7), 2621–2624. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2621>

IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2016). *Alsodes vittatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T56322A79811780. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T56322A79811780.en>

IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2019). *Alsodes neuquensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T45477280A45477430. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T45477280A45477430.en>

IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2019). *Alsodes verrucosus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T56321A79811666. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T56321A79811666.en>

IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2020). *Alsodes igneus* (amended version of 2019 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T61800A175788081. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T61800A175788081.en>

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196–6200. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>

Luebert, F., & Plissock, P. (2017). *Sinopsis bioclimática y vegetal de Chile* (2.^a ed.). Editorial Universitaria.

Lynch, J. D. (1968). The identity of the Chilean frog *Alsodes monticola* Bell, and the status of the genus *Alsodes* (Amphibia: Leptodactylidae). *Herpetologica*, 24(4), 255–257.

Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2023). *Mesquite: A modular system for evolutionary analysis* (Version 3.81). <http://www.mesquiteproject.org>

McDiarmid, R. W., & Altig, R. (Eds.). (1999). *Tadpoles: The biology of anuran larvae*. University of Chicago Press.

Mella-Romero, J., & Lamilla-Maulén, P. (2019). *Alsodes verrucosus* (Philippi, 1902) (Anura, Alsodidae): A new locality for a very poorly known species. *Check List*, 15(5), 811–814. <https://doi.org/10.15560/15.5.811>

Mella-Romero, J., Mella, J., Muñoz, C., & Correa, C. (2022). Range extension of Cathedral spiny-chest frog, *Alsodes gargola* Gallardo, 1970: A record in an unknown road of the Chilean Patagonia. *Gayana*, 86(1), 22–29. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382022000100022>

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>

Ministerio del Medio Ambiente. (2012, abril 11). Decreto Supremo N° 42/2011: Aprueba y oficializa clasificación de especies según estado de conservación, séptimo proceso. *Diario Oficial de la República de Chile*.

Ministerio del Medio Ambiente. (2015, diciembre 4). Decreto Supremo N° 38/2015: Aprueba y oficializa clasificación de especies según estado de conservación, undécimo proceso. *Diario Oficial de la República de Chile*.

Moritz, C., Schneider, C. J., & Wake, D. B. (1992). Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, 41(3), 273–291. <https://doi.org/10.1093/sysbio/41.3.273>

Orton, G. L. (1953). The systematics of vertebrate larvae. *Systematic Zoology*, 2, 63–75.

Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., & Grabowski, G. (1991). The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii.

Philippi, R. A. (1902). *Suplemento a los batraquios chilenos descritos en la Historia Física i Política de Chile de don Claudio Gay*. Librería Alemana de José Ivens. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.104403>

Rabanal, F. E., Correa, C., & Gargiulo, M. (2022). Fin a la incertidumbre: Extensión de distribución de *Alsodes valdiviensis* Formas, Cuevas & Brieva, 2002 (Anura: Alsodidae) hacia el sur de Chile confirma la presencia del género en la Isla Grande de Chiloé. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 5(2), 54–64.

<https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2022.2.408>

Rabanal, F., & Formas, J. R. (2008). Complementary diagnosis of the genus *Insuetophrynus* (Anura: Cycloramphidae) based on larval characters. *Zootaxa*, 2116, 59–67.

Rambaut, A. (2018). FigTree v1.4.4 [Software]. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904.

<https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

Richards, C. M., & Moore, W. S. (1996). A molecular phylogenetic study of the New World blackbirds (Icterinae) using mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6(2), 213–229.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542.

Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. (2013). Resolución 1055/13. Boletín Oficial de la República Argentina, 12 de septiembre de 2013.

<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=219633>

Servicio Nacional de Geología y Minería (SERNAGEOMIN). (2018). Chile: Territorio volcánico. SERNAGEOMIN.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Úbeda, C. A. (2021). Estrategias reproductivas, hábitats y otros aspectos ecológicos de los anfibios altoandinos en la vertiente oriental de la Cordillera de los Andes. *Boletín Chileno de Herpetología*, 8, 10–21.

<http://www.boletindeherpetologia.com/uploads/3/2/2/9/32291217/2.ubeda2021.pdf>

Úbeda, C. A., Basso, N. G., & Blotto, B. (2012). *Alsodes gargola neuquensis* (Cei, 1976). En: Categorización del estado de conservación de la herpetofauna de la República Argentina. Ficha de los taxones. *Anfibios. Cuadernos de Herpetología*, 26(Supl. 1), 187.
<https://aha.org.ar/herpetofauna/alsodes-gargola-neuquensis/>

Vellard, J. (1947). Dos batracios interesantes de la región de Bariloche. *Acta Zoológica Lilloana*, 4, 145–153.

Wake, D. B., & Koo, M. S. (2018). Amphibians. *Current Biology*, 28(21), R1237–R1241.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.028>

Wells, K. D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press.

9. ANEXOS

Anexo 1. Permisos de captura con fines de investigación



RESOLUCIÓN EXENTA N°: 4394/2022

AUTORIZA AL SR. EDVIN RIVEROS RIFFO, LA CAPTURA DE ANFIBIOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN

Santiago, 02/08/2022

VISTOS:

Lo solicitado por el interesado con fecha julio de 2022: la Ley N° 18.755, Orgánica de este Servicio; la ley N°4.601, de Caza, modificada por la Ley N° 19.473, de 1996; el D.S. N° 5, de 1998, del Ministerio de Agricultura, y la Resolución N° 2.433 del 27 de abril de 2012 del Director Nacional del Servicio Agrícola y Ganadero, modificada por la Res. Exenta N° 437, del 21 de enero de 2013.

CONSIDERANDO:

1. Que para fines de investigación, el Sr. Edvin Riveros Riffo, solicita permiso de captura de especies protegidas de la fauna silvestre.

RESUELVO:

1. Autorízase al Sr. Edvin Riveros Riffo, Rut N° 15.319.387-8, con domicilio en [REDACTED], Región Metropolitana, la captura de anfibios bajo las condiciones de la presente resolución.

2. Se autoriza la captura de ejemplares de anfibios y de larvas del género *Isodes* sp., mediante captura manual o con chingulillo o red de pesca, en el sector de río Ranquíl y sus afluentes, río Traihue y sus afluentes, río Pino Hachado y sus afluentes, Estero Icalma y sus afluentes en la Comuna de Lonquimay, sector de río Mauchín y sus afluentes, río Pangui y sus afluentes y río Trancura y sus afluentes en la Comuna de Curarrehue, Región de La Araucanía, desde la fecha de esta Resolución hasta el 31 de julio de 2023.

3. Los ejemplares capturados una vez identificados, deberán ser liberados en los mismos sitios de captura, debiendo ser mantenidos en todo momento en condiciones tales que aseguren su adecuado bienestar.

Para la manipulación de los ejemplares, deberán utilizarse las medidas de bioseguridad respectivas, que aseguren la protección de la fauna y de los investigadores. En el caso de los anfibios se debe evitar la contaminación cruzada.

Se autoriza la eutanasia de 5 ejemplares adultos y 5 larvas por sector de captura, un total de 70 ejemplares, por inmersión para ser trasladados a la Colección Zoológica de la Universidad de Concepción.

En caso de captura de ejemplares de especies de fauna silvestre catalogadas como perjudiciales o dañinas, según el Artículo 6 del Reglamento de la Ley de Caza, estos no podrán ser devueltos al medio.

Teniendo en consideración la contingencia sanitaria mundial, en la cual la Organización Mundial de la Salud ha reconocido la enfermedad del coronavirus (Covid-19) como una pandemia, además de existir la posibilidad de que algunos animales de fauna silvestre se infecten a través del contacto cercano con humanos infectados, se establece que durante todo el manejo de los ejemplares, durante la captura y/o manipulación, deberán utilizarse medidas de bioseguridad que contemplan, a lo menos, el uso de mascarillas, guantes y la desinfección de todos los materiales a utilizar.

4. Para las capturas se autoriza, bajo la supervisión de la investigadora responsable en terreno, al Sr. Claudio Luis Correa Quezada, RUT N°12.245.723-0, del Sr. Claudio Andrés Quezada Romegialli, Rut N°15.018.055-4 y el Sr. Francisco Javier González Pinilla, Rut N°15.799.602-9.

El titular de esta Resolución deberá estar presente en las actividades de captura y supervisar en forma directa las actividades que realizan los participantes autorizados.

La captura y manipulación de los ejemplares, sólo está permitida para las personas autorizadas en esta resolución.

En caso que ocurra la muerte de un ejemplar se deberá dar aviso inmediato al SAG de la Región correspondiente al sitio de captura.

5. Para las capturas, deberá contarse con la autorización expresa de la Corporación Nacional Forestal, en caso que éstas se realicen dentro de Áreas Silvestres Protegidas del Estado, o de los respectivos propietarios, en caso de realizarse fuera de ellas.
6. En forma previa a la colecta, con al menos 5 días hábiles de anticipación, la investigadora deberá informar por escrito, a la Dirección Regional SAG correspondiente Región de La Araucanía, al mail del encargado R.N.R renato.arce@sag.gob.cl, las fechas y sitios específicos de las capturas, además de un número de teléfono y/o dirección de correo electrónico de contacto.
7. Una vez concluidas las actividades de terreno, la titular de esta Resolución, deberá enviar a la Dirección Regional SAG respectiva y al Departamento de Vida Silvestre del SAG Central al correo diporen@sag.gob.cl y a los correos indicados anteriormente, un informe basado en el formato proporcionado por este Servicio, a más tardar 30 días hábiles después de finalizadas las capturas.

En caso de existir alguna publicación originada de la autorización otorgada, deberá hacer referencia en ellas del permiso expedido.

En el caso que la captura de individuos no sea efectuada, el interesado deberá de informar el hecho a la división de Protección de los Recursos Naturales Renovables del SAG central.

8. Toda infracción a las disposiciones contenidas en la Ley de Caza y su Reglamento, y a la autorización que se ha otorgado será sancionada por el Servicio Agrícola y Ganadero.

ANÓTESE Y COMUNIQUESE



MARIA AURORA ESPINOZA SOTO
Jefa (S) División Protección de los
Recursos Naturales Renovables

Anexos

Nombre	Tipo	Archivo	Copias	Hojas
carta comité bioética	Digital	Ver		
solicitud edvin riveros-2	Digital	Ver		

Adjuntos

Documento	Fecha Publicación
225/2022Registro de Ingreso de documento Externo	07/01/2022

RAF/GAR

Distribución:

- Marcela Soledad Céspedes Moya - Secretaria Departamento de Vida Silvestre - Oficina Central
- María Teresa Fernández Cabrera - Directora Regional Servicio Agrícola y Ganadero Región de La Araucanía - Oficina Regional Araucanía



RESOLUCIÓN EXENTA N°: 3917/2023

MODIFICA RESOLUCIÓN N° 4394 DEL 2 DE AGOSTO DE 2022, QUE AUTORIZÓ AL SR. EDVIN RIVEROS RIFFO, LA CAPTURA DE ANFIBIOS CON FINES INVESTIGACIÓN.

Santiago, 22/06/2023

VISTOS:

Lo solicitado por el interesado con fecha de 6 de junio de 2023; la Ley N°18.755, Orgánica de este Servicio; la Ley N°4.601, de Caza, modificada por la Ley N°19.473, de 1996; el D.S.N°5, de 1998, del Ministerio de Agricultura, el D.S.N°389, de 2014, del Ministerio de Agricultura; DFL R.R.A.N°16 de 1963 con las modificaciones introducidas por el DFL N°15 de 1968; la Ley N°17.286; el D.L.N°263; el DFLN°19- 2345 de 1979; la LeyN°16.640 y Decreto exentoN°389 de 14 de noviembre del 2014 y la ResoluciónN°2.433 del 27 de abril de 2012 del Director Nacional del Servicio Agrícola y Ganadero, modificada por la Res. ExentaN°437, del 21 de enero de 2013 y ResoluciónN°908 del 13 de febrero de 2012 del Director Nacional, que Aprueba Instructivo Técnico de Comunicación de Resultados de Laboratorios de Diagnostico Veterinarios.

CONSIDERANDO:

1. Que el Servicio Agrícola y Ganadero autorizó mediante Resolución N° 4394 del 2 de agosto de 2022, al Sr. Edvin Riveros Riffo, la captura de anfibios con fines de investigación.
2. Que para fines de un adecuado desarrollo del estudio, el Sr. Edvin Riveros Riffo solicita ampliar el periodo autorizado para las capturas e incluir nuevos sitios de captura.

RESUELVO:

1. Modifíquese la Resolución N° 4394 del 2 de agosto de 2023, en el sentido de ampliar el periodo autorizado para las capturas hasta el 31 de julio de 2024 e incluir como sitio de captura, manteniendo el total de individuos a capturar (máximo 10 individuos por sitio y un total de 70 individuos), los sitios indicados en la tabla N°1.

Tabla N° 1

Estación	Este	Norte	Área de captura	Comuna
1	285.943	5.755.519	Sector Estero Lancu y afluentes	Lonquimay
2	286.751	5.751.278	Sector Río Tupuyuntue y afluentes	Lonquimay
3	327.993	5.738.445	Sector Laguna Escondida y afluentes	Lonquimay
4	269.972	5.727.163	Sector Baños del Río Blanco y afluentes	Curacautín
5	273.912	5.673.358	Sector Quilliche y esteros	Cunco
6	264.293	5.660.722	Sector Lago Tinquilco y afluentes	Pucón
7	248.880	5.640.049	Sector Valle del Cerduo y esteros	Pucón
8	281.046	5.645.913	Sector Resbaloso y esteros	Curarrehue

2. Manténgase la vigencia de todas las demás disposiciones de la Resolución N° 4394 del 2 de agosto de 2022.
3. Téngase por modificada en los términos indicados, formando parte integrante de la Resolución N° 4394

Anexo 2. Certificado de bioética



CEBB 1197-2022

Concepción, junio de 2022.

CERTIFICADO

El Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción ha revisado el Proyecto de Tesis titulado “**RELACIONES FILOGENÉTICAS DE UNA ENIGMÁTICA POBLACIÓN DE ALSODES (ANURA, ALSODIDAE) DE LA ARAUCANÍA ANDINA (CHILE)**”, cuyo Investigador Responsable es el **SR. EDVIN ANTONIO RIVEROS RIFFO**, candidato al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biodiversidad y Conservación, programa impartido por la Universidad de Valparaíso y cuya acreditación se encuentra prorrogada según la Resolución Exenta RPAP N° 0097-2, junto a su Profesor Codirector de tesis **DR. CLAUDIO LUIS CORREA QUEZADA**, docente adscrito al Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, y ha comprobado que cumple con las normas y procedimientos éticos, bioéticos y de bioseguridad establecidos nacional e internacionalmente para investigación científica que considera la captura o manipulación de animales vertebrados, en este caso anfibios anuros de la familia *Alsodidae*, y el correspondiente manejo de residuos, tanto biológicos como químicos.

En este Proyecto de Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biodiversidad y Conservación por la Universidad de Valparaíso se propone como objetivo general establecer las relaciones filogenéticas de una población no documentada de *Alsodes* sp., procedente de la Araucanía andina, cercanías de Icalma, comuna de Lonquimay, en la Región de la Araucanía

El diseño metodológico prevé la ejecución de 03 (tres) objetivos específicos, a saber: (1) inicialmente pretende caracterizar molecularmente la población de *Alsodes* sp. (genes mitocondriales 12S rRNA, 16S rRNA y cyt b); después, (2) buscará evaluar la presencia de caracteres morfológicos externos en la población de *Alsodes* sp. para, por último, (3) establecer el estatus taxonómico de la nueva población de *Alsodes* sp.

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secreverid@udec.cl
Concepción, Chile



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

El estudio contempla la captura de individuos adultos, juveniles y/o larvas (5 individuos adultos o juveniles y hasta 5 individuos en fase larval; 10 individuos en total por localidad, regularmente autorizada) utilizando un chingullo (red) de pesca o en forma manual, dependiendo de la profundidad del agua, la intensidad de la corriente y la cantidad de refugios que haya en los sistemas hídricos a prospectar. En sitios donde haya poca agua, se realizará una búsqueda activa y captura manual en refugios, entre la vegetación o rocas. Todos los individuos, excepto los que se solicita recolectar, se liberarán en el mismo sitio de captura una vez obtenida la muestra, reintegrándolos a su ambiente natural, por lo que no se contempla el transporte de individuos vivos.

Aun cuando la propuesta de investigación considera el uso de animales, el número de individuos se ajusta al principio de las 3R's (Russell y Burch, 1959. El método de eutanasia que se empleará para esta investigación es aceptable para anfibios (Close *et al.* 1996, Gallo *et al.* 2009, AVMA 2020).

Es importante mencionar que esta investigación se realizará en el entorno de arroyos, esteros y ríos de acceso público. En función de los resultados obtenidos durante las prospecciones en terreno se evaluará realizar muestreos en el interior de unidades pertenecientes al Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado (SNASPE), administrado por la Corporación Nacional Forestal (CONAF), con los permisos y autorizaciones correspondientes y observando las instrucciones del Manual de Procedimientos, Requisitos y Obligaciones para Proyectos de Investigación Científica en el Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado - SNASPE (2013).

Cabe destacar que el Laboratorio de Sistemática y Conservación de Herpetozoos de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción está bajo responsabilidad del Dr. Claudio Luis Correa Quezada, profesor Co-director de Tesis del Investigador Responsable.

Todas las actividades serán ejecutadas observando las medidas sanitarias en contexto de pandemia de COVID-19, así declarada por la Organización Mundial de la Salud (marzo, 2020), adoptadas en la normativa nacional y organizadas en las dependencias de la Universidad de Concepción por el Comité de Crisis de la Corporación (<https://comitedecrisis.udec.cl/node/6>).

Los ejemplares colectados serán donados y formarán parte de la colección científica del Museo de Zoología de la Universidad de Concepción (MZUC-UCCC).

El equipo científico cuenta con la calificación, experiencia y destrezas necesarias para llevar a buen término los diferentes ensayos que se tiene contemplado, bajo la rigurosa aplicación de protocolos de trabajo establecidos y de carácter rutinario en estas dependencias de nuestra Universidad.

El tratamiento y disposición de los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del presente proyecto dentro del Laboratorio de Sistemática y Conservación de Herpetozoos, todo supervisado por el DR. CLAUDIO LUIS CORREA QUEZADA, estarán regulados por MATPEL - Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos (2005), y conforme a las indicaciones del Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (2018) editado por FONDECYT-CONICYT y adoptado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo ANID del Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación del Gobierno de Chile.




Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C - Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

En atención a todo lo anterior y dado que el Proyecto de Tesis titulado “RELACIONES FILOGENÉTICAS DE UNA ENIGMÁTICA POBLACIÓN DE ALSODES (ANURA, ALSODIDAE) DE LA ARAUCANÍA ANDINA (CHILE)”, cuyo Investigador Responsable es el SR. EDVIN ANTONIO RIVEROS RIFFO, candidato al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biodiversidad y Conservación, programa impartido por la Universidad de Valparaíso, junto a su Profesor Co-director de tesis DR. CLAUDIO LUIS CORREA QUEZADA, docente adscrito al Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, no presenta elementos transgresores a la Ley Nº 20.380 sobre Protección de Animales, a las normas y los principios éticos rectores de nuestra Institución Universitaria y a los principios éticos establecidos en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación (Resolución Exenta Nº 157, de 2013 - CONICYT), así como también no vulnera lo dispuesto en el Reglamento de Manejo de Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos, siguió el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL) institucional y observa además, el Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (2018), formalizado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT y adoptado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo – ANID, este Comité concluye que la revisión a la cual fue sometido, proporcionó una base suficiente para conferir el presente Certificado.




DRA. M. ANDREA RODRÍGUEZ TASTETS
PRESIDENTA
COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



Este documento ha sido firmado electrónicamente por:
María Andrea Rodríguez Tastets <andrea@udec.cl>
Certificado por E-Sign S.A. en conformidad a la Ley 19.799

Anexo 3. Tabla comparativa con los caracteres diagnósticos reportados en *Alsodes*

<i>Rasgo</i>	<i>Especie</i>				
	<i>A. verrucosus</i>	<i>A. vittatus</i>	<i>A. neuquensis</i>	<i>A. igneus</i>	<i>Alsodes sp.</i> ¹
Cabeza	No informado	No informado	Cabeza ancha y aplanada.	Cabeza más ancha que larga, más estrecha que el cuerpo	Cabeza más ancha que larga
Hocico	No informado	No informado	Hocico corto, con una longitud igual al diámetro ocular	Hocico corto, ligeramente truncado en vista dorsal; casi redondeado en vista lateral	Hocico corto (longitud menor a diámetro ocular), truncado en vista dorsal y lateral
Narinas	No informado	No informado	No informado	Narinas ligeramente protuberantes orientadas lateralmente	Hembra: Narinas no protuberantes orientadas lateralmente
	No informado	No informado	No informado	Narinas situadas a medio camino entre la punta del hocico y el borde anterior de los ojos	Hembra: Narinas situadas más cerca de la punta del hocico que del borde anterior de los ojos
<i>Canthus rostralis</i>	No informado	No informado	El <i>canthus rostralis</i> es obtuso y redondeado	<i>canthus rostralis</i> bien desarrollado	Hembra: El <i>canthus rostralis</i> es obtuso, redondeado y desarrollo moderado
Región loreal	No informado	No informado	No informado	Región loreal ligeramente redondeada en sección transversal	Región loreal ligeramente redondeada en sección transversal
Ojos	No informado	No informado	Ojos prominentes, ubicados lateralmente	Ojos moderadamente grandes, orientados lateralmente	Ojos prominentes, ubicados lateralmente

Iris	No informado	No informado	No informado	En la vida, el anillo de iris es de color dorado con manchas negras en la parte superior	Iris negro con reticulaciones doradas, pupila horizontal
Tímpano	Sin información	El tímpano es oculto, pero la región en la que está, es de un negro muy reluciente	El tímpano no es evidente	Tímpano ausente	Tímpano ausente
Pliegue supratimpánico	No informado	No informado	El pliegue supratimpánico es débil	Pliegue supratimpánico bien desarrollado, no alcanza la inserción del brazo. Área por encima del pliegue supratimpánico con numerosas granulaciones pequeñas	Hembra: Pliegue supratimpánico bien desarrollado, alcanza la inserción del brazo (más extendido en el macho). Área por encima del pliegue supratimpánico con numerosas granulaciones pequeñas
Manos	En la palma de las manos y en la planta de los pies los tubérculos así como los tubérculos subarticulares de los dedos son muy poco pronunciados	La palma es negruzca, los dedos blanquiscos sobre todo la punta	No informado	No informado	La palma es oscura (más clara en la hembra), punta de los dedos blanquecinos. Tubérculos muy pronunciados, tubérculos subarticulares poco notorios
	No informado	No informado	No informado	En las extremidades anteriores; pliegue de la muñeca dérmico ausente	No observado
	No informado	No informado	Aumento progresivo en la longitud de los dedos en la siguiente secuencia: 2° - 1° - 4° - 3°	Longitud relativa de los dedos III > IV > II > I	Longitud relativa de los dedos III > IV > II > I
	No informado	No informado	Dedos libres, no tienen membranas interdigitales	Membrana interdigital ausente	Dedos libres, no tienen membranas interdigitales

	No informado	No informado	No informado	Puntas de los dedos esféricas, aproximadamente iguales en tamaño	Puntas de los dedos esféricas, dedo I levemente más ancha
Tubérculos palmares	En la palma de las manos y en la planta de los pies los tubérculos, así como los tubérculos subarticulares de los dedos son muy poco pronunciados	Los tuberculos infraarticulares, etc., no me han ofrecido nada en particular	Tubérculos metacarpales y subarticulares moderados	Tubérculo palmar interno ovoide, prominente	Tubérculo palmar (metacarpal) interno ovoide y prominente. Subarticulares moderados
	No informado	No informado	No informado	Tubérculo palmar externo casi redondeado, prominente	Tubérculo palmar (metacarpal) externo bilobulado y prominente
	No informado	No informado	No informado	Tubérculo subarticular proximal presente en cada dedo	No evaluado
	No informado	No informado	No informado	Presente un tubérculo subarticular distal en todos los dedos	No evaluado
	No informado	No informado	No informado	Presente un tubérculo palmar supernumerario	No evaluado
Pies	No informado	No informado	Las patas traseras son grandes y delgadas. Cuando están en reposo, los talones alcanzan la punta del hocico en los machos o llegan más allá de los ojos en las hembras	Miembros posteriores; talón no alcanza el borde posterior del ojo cuando la pierna está doblada	No evaluado
	No informado	No informado	Cuando los fémures están doblados en ángulo recto con el cuerpo, las articulaciones tibio-tarsales se superponen.	No informado	Cuando los fémures están doblados en ángulo recto con el cuerpo, las articulaciones tibio-tarsales se superponen

	No informado	No informado	No informado	Longitud relativa de los dedos IV > III > V > II > I	Longitud relativa de los dedos IV > III > V > II > I en machos; no evaluado en la hembra
	No informado	La planta del pie y los dedos del pie son igualmente negruzcos	Dedos de los pies con membranas interdigitales en dos tercios de su longitud	Membrana reducida en todos los dedos. [También dice Ausencia de membranas interdigitales]	Planta del pie y dedos oscuros. Membranas interdigitales reducidas en todos los dedos, escotadas
	No informado	No informado	No informado	Flecos subarticulares presentes, pero reducidos en todos los dedos	No observados
Tubérculos plantares	En la palma de las manos y en la planta de los pies los tubérculos así como los tubérculos subarticulares de los dedos son muy poco pronunciados	Los tuberculos infraarticulares, etc., no me han ofrecido nada en particular	No informado	Tubérculos subarticulares redondos, prominentes, están distribuidos en los dedos de la siguiente manera: I(1), II(2), III(3), IV(3), V(2)	Tubérculos subarticulares redondos, moderados, están distribuidos en los dedos de la siguiente manera: I(1), II(1), III(2), IV(3), V(2)
			No informado	Presente un tubérculo supernumerario diminuto	Ausente
			Tubérculo metatarsal externo pequeño y redondeado. Tubérculo metatarsal interno fuerte y agrandado	Tubérculo externo ovoide, prominente, aproximadamente de un tercio de la longitud del tubérculo interno	Tubérculo metatarsal externo pequeño y redondeado. Tubérculo metatarsal interno fuerte, ovoide y agrandado; más de tres veces la longitud del externo
Pliegue tarsal	No informado	No informado	El pliegue tarsal es corto y débil	Pliegue tarsal presente, pero reducido, extendiéndose aproximadamente a dos tercios de la longitud del tarso, confluyendo distalmente con un estrecho fleco a lo largo del margen interno del dedo I	Pliegue tarsal presente, extensión mayor a dos tercios de la longitud del tarso, confluyendo distalmente con un estrecho fleco a lo largo del margen interno del dedo I (en región del tubérculo metatarsal interno)

Muslos y piernas	Pardo rojizo este color es más vivo en la cara inferior de los muslos. y la cara inferior de las piernas de una densa granulación áspera	No informado	La piel granulosa en la superficie inferior de los muslos	Piernas carecen de barras oscuras	Coloración general de los muslos pardo rojizo (gris rosáceo en vida; rosado en la hembra), pero con el pliegue discoidal del abdomen y la región inguinal de color crema. Piel granulosa en la superficie inferior de los muslos (mucho más granulosa en la hembra). Parte de estos gránulos son de color crema. Piernas carecen de barras oscuras
Piel	Cuerpo por encima verrugoso	Piel lisa	La piel es lisa, con escasas glándulas en la espalda y granulosa en la superficie inferior de los muslos. Presenta pliegues dérmicos laterales	Piel del dorso granular	Piel con numerosas glándulas en la espalda (mayor numero en la hembra) y muy granulosa en la superficie inferior de los muslos. Presenta pliegues dérmicos laterales
	No informado	No informado	No informado	Superficies dorsales de los brazos y muslos granulares	Hembra: Superficies dorsales de los brazos y muslos casi lisa
	No informado	No informado	No informado	Superficies ventral y posterior de los muslos con numerosas pústulas	Hembra: Superficies ventral y posterior de los muslos con numerosas pústulas
	No informado	No informado	No informado	Superficie ventral y de la garganta lisa	Hembra: Superficie ventral y de la garganta mayormente lisa, con pústulas en los bordes de la garganta

Superficie dorsal	Cuerpo por encima negrusco, sin manchas. Cuerpo arriba verrugoso, arriba subnegro, immaculado. Dorso está densamente cubierto de verrugas blandas	La parte superior del cuerpo es de un negro más o menos intenso a excepción de una banda blanca o amarilla, que corre de la punta del hocico hasta el ano	En el dorso, el color varía entre verdoso o amarillento, con una banda interocular tenue y muchas manchas irregulares oscuras, más pequeñas en la parte posterior	El color de fondo del dorso, las superficies dorsales de los brazos, muslos, manos y pies es de color gris oscuro (caqui en vida)	Las superficies dorsales de los brazos, muslos, manos y pies de color marrón oscuro (más claro en la hembra; marrón arena en vida). Pequeñas manchas negras en la superficie dorsal que no forman un patrón definido. Piel con numerosas glándulas en la espalda (mayor número en la hembra)
	No informado	No informado	No informado	Pequeñas manchas negras en la superficie dorsal de los brazos y las piernas	Hembra: Superficie dorsal de los brazos y las piernas sin manchas
	No informado	No informado	No informado	Una franja triangular de color amarillo grisáceo que se extiende entre los párpados hasta el margen anterior de los ojos (caqui en vida)	Hembra: Un conspicuo triángulo de color marrón grisáceo se extiende desde los párpados hasta la punta del hocico, flanqueado por dos bandas negras
	No informado	No informado	No informado	Labios de color gris claro (amarillo en vida) con una franja negra estrecha cerca del borde anterior del ojo	Hembra: Labios de color marrón grisáceo con dos franjas negras que llegan a la punta del hocico
	No informado	No informado	No informado	Dos bandas dorsales estrechas y oscuras (que convergen anteriormente) por debajo de los cantos rostrales (caqui marrón en vida)	Hembra: Dos bandas negras que se originan en la punta del hocico cruzan las narinas y se dirigen hacia el margen anterior de los ojos, por debajo del <i>canthus rostralis</i>

	No informado	No informado	No informado	Una zona negra triangular retrocede en la cabeza entre los ojos	Hembra: Una mancha marrón oscuro triangular retrocede desde la región interorbital hacia el dorso
	No informado	No informado	No informado	Una banda vertebral y dos paravertebrales irregulares en el dorso (marrón oscuro en vida)	Hembra: La mancha triangular se encuentra flanqueada por dos manchas escapulares más claras; línea de color marrón grisáceo que va desde la región sacra hasta la cloaca
Superficie ventral	Por debajo de un pardo rojizo	El vientre es de un gris moreno muy pálido que tira a veces a amarillo	Ventralmente, es gris amarillento, moteado con pequeños puntos blancos	Las superficies ventrales del vientre, garganta y muslos son de color crema	Hembra: Las superficies ventrales de la garganta, pecho, abdomen y muslos son de color rosado (gris rojizo en el macho). Presenta pequeños puntos blancos en el pecho y abdomen
	No informado	No informado	No informado	Las superficies ventrales de las manos y pies son más oscuras que otras superficies ventrales.	Hembra: Las superficies ventrales de las manos y pies son más oscuras que la superficie de la garganta
	No informado	No informado	No informado	Superficie ventral y de la garganta lisa	Hembra: Superficie ventral y de la garganta mayormente lisa, con pústulas en los bordes de la garganta
Región cloacal	No informado	No informado	No informado	Abertura cloacal dirigida posteriormente a nivel dorsal de los muslos	Hembra: Abertura cloacal dirigida posteriormente a nivel dorsal de los muslos
	No informado	No informado	No informado	Abertura redonda y sin ornamentación	Hembra: Abertura redonda y sin ornamentación, muy granulosa (menos granulosa en el macho)

Caracteres sexuales secundarios	No informado	No informado	Presenta prominentes excrecencias nupciales en los dedos y parches redondeados de espinas negras en el pecho, que son caracteres sexuales secundarios de los machos	No informado	El macho (subadulto) presenta excrecencias nupciales no queratinizadas en el dedo I y dos parches redondeados en el pecho, sin espinas queratinizadas
Distribución y habitat	En los Andes de la Provincia de Cautín	Habita en Araucanía	En arroyos y manantiales poco profundos, dispersos en la meseta volcánica de Lonco-Luan, rodeada por un relicto de <i>Araucaria araucana</i> , <i>Chusquea</i> y <i>Nothofagus</i>	En orilla del lago Malleco, PN Tolhuaca; en sectores boscosos con presencia de <i>Araucaria araucana</i> , <i>Nothofagus obliqua</i> y <i>N. dombeyi</i>	En la sección inicial del estero Icalma, inmerso en bosques de <i>Araucaria araucana</i> y <i>Nothofagus</i>

Notas: (1) Descripciones generales basadas en el macho E1c4. Las descripciones de la hembra E1c3 se incorporan para comparación con *A. igneus*.