Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza
Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza

"Filogeografía comparada de dos especies codistribuidas de anfibios altoandinos: *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* "

Proyecto de grado presentado como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza.

MARTA CAROLINA MORA ESPINOZA
Médico Veterinario

SANTIAGO-CHILE
2016

HOJA DE APROBACION DE PROYECTO DE GRADO

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Areas Silvestres y Conservación de la Naturaleza

Profesor(a) Guía	Nombre	Claudio Correa Quezada
	Nota	
	Firma	
Profesor(a) Co guía(a)	Nombre	Pedro Cattan Ayala
	Nota	
	Firma	
Profesor(a) Consejero(a)	Nombre	Jaime Hernández
	Nota	
	Firma	
Profesor(a) Consejero(a)	Nombre	Rosita Scherson
	Nota	
	Firma	

Agradecimientos

Mis agradecimientos son principalmente a mi equipo de trabajo que fueron incondicionales en su apoyo Fernanda Soffía e Ismael Horta y que sin ellos esta tesis no se podría haber realizado. También agradecer su colaboración en terreno a Andrés Charrier, Natalie Pozo y guardapaques de Reserva Nacional Rio Cipreses (CONAF).

Financiado por proyecto Fondecyt 1140929: “Genetic Imprinting and Elevation Shifts Associated to Climate Change in Vertebrate Species of Central Chile”.

Índice de contenido

Lista de Figuras 4
Lista de Tablas 5
Resumen 6
Summary 7
Introducción 9
Hipótesis 12
Objetivos 12
Materiales y Métodos 13
Localidades y material de estudio 13
1.- Extracción de DNA y obtención de secuencias mitocondriales 16
2.- Análisis genéticos y filogeográficos 18
Resultados 19
Discusión 31
Bibliografía 33

Lista de Figuras

Tabla 1. Coordenadas y altitudes de las localidades de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* incluidas en este estudio. 16

Tabla 2. Reactivos utilizados en el PCR de esta estudio. 17

Tabla 3. Programa de perfil térmico utilizado en este estudio. 17

Tabla 4. Índices de diversidad del conjunto de muestras de cada especie..... 22

Tabla 5. Índices de variación genética por localidad para *A. montanus*. Los guiones indican valores de cero para los índices..... 22

Tabla 6. Índices de variación genética por localidad para *A. tumultuosus.* Los guiones indican valores de cero para los índices..... 23

Tabla 7. Resultados de los tests D de Tajima y Fs de Fu para *Alsodes montanus*. Los valores de significancia (*p*) mayores a 0,05 no son significativos (n.s.= No significativo). 25

Tabla 8. Resultados de los tests de D de Tajima y Fs de Fu para *Alsodes tumultuosus.* . 26

Tabla 9. Análisis de varianza molecular. Análisis de los componentes de varianza molecular entre grupos y dentro de poblaciones para *Alsodes montanus*. F_{SC}= Entre poblaciones dentro de grupos; F_{ST}= Entre poblaciones; F_{CT}= Entre grupos; g.l.=Grados de libertad. 27

Tabla 10. Análisis de varianza molecular. Análisis de los componentes de varianza molecular entre grupos y dentro de poblaciones para *Alsodes tumultuosus*. F_{SC}= Entre poblaciones dentro de grupos; F_{ST}= Entre poblaciones; F_{CT}= Entre grupos; g.l.=Grados de libertad. 28

Tabla 11. Matriz de distancias geográficas (kilómetros) entre localidades sobre la diagonal y por debajo la diferenciación genética (F_{ST}) para *Alsodes montanus*..... 29

Tabla 12. . Matriz de las distancias geográficas (kilómetros) entre localidades sobre la diagonal y por debajo la diferenciación genética (F_{ST}) para *Alsodes tumultuosus.* 29

Lista de Tablas

Tabla 1. Coordenadas y altitudes de las localidades de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* incluidas en este estudio. 16

Tabla 2. Reactivos utilizados en el PCR de esta estudio. 17

Tabla 3. Programa de perfil térmico utilizado en este estudio. 17

Tabla 4. Índices de diversidad del conjunto de muestras de cada especie..... 22

Tabla 5. Índices de variación genética por localidad para *A. montanus*. Los guiones indican valores de cero para los índices..... 22

Tabla 6. Índices de variación genética por localidad para *A. tumultuosus.* Los guiones indican valores de cero para los índices..... 23

Tabla 7. Resultados de los tests D de Tajima y Fs de Fu para *Alsodes montanus*. Los valores de significancia (*p*) mayores a 0,05 no son significativos (n.s.= No significativo). 25

Tabla 8. Resultados de los tests de D de Tajima y Fs de Fu para *Alsodes tumultuosus.* . 26

Tabla 9. Análisis de varianza molecular. Análisis de los componentes de varianza molecular entre grupos y dentro de poblaciones para *Alsodes montanus*. F_{SC}= Entre poblaciones dentro de grupos; F_{ST}= Entre poblaciones; F_{CT}= Entre grupos; g.l.=Grados de libertad. 27

Tabla 10. Análisis de varianza molecular. Análisis de los componentes de varianza molecular entre grupos y dentro de poblaciones para *Alsodes tumultuosus*. F_{SC}= Entre poblaciones dentro de grupos; F_{ST}= Entre poblaciones; F_{CT}= Entre grupos; g.l.=Grados de libertad. 28

Tabla 11. Matriz de distancias geográficas (kilómetros) entre localidades sobre la diagonal y por debajo la diferenciación genética (F_{ST}) para *Alsodes montanus*..... 29

Tabla 12. . Matriz de las distancias geográficas (kilómetros) entre localidades sobre la diagonal y por debajo la diferenciación genética (F_{ST}) para *Alsodes tumultuosus.* 29

Resumen

La tasa de declinación de anfibios a nivel global se ha incrementado notablemente en los últimos cuarenta años. Las principales causas de esta declinación son la introducción de especies invasoras, destrucción de hábitat, enfermedades emergentes y el cambio climático. Nuevas aproximaciones tales como la genética de la conservación han permitido focalizar y priorizar las estrategias de acción en las especies que se encuentren más amenazadas.

En este estudio se compararon los patrones filogeográficos de dos especies de anfibios endémicas de Los Andes de Chile central, *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus*, utilizando secuencias del gen mitocondrial citocromo b. Estas especies se encuentran en categoría de conservación Vulnerable (según la IUCN) y en Peligro-Rara (según el Reglamento de Clasificación de Especies del MMA), distribuyéndose entre la Región Metropolitana y la Región del Libertador Bernardo O'Higgins entre los 1.200-2.600 msnm. Se aplicó una técnica no invasiva de obtención de muestras utilizando tórulas para extraer mucosa bucal. Los individuos fueron capturados en siete localidades representativas de las principales cuencas hidrográficas que conforman las distribuciones de ambas especies, incluyendo algunas áreas protegidas: La Parva, Lagunillas, Potrero Grande, Pangal, Reserva Nacional Cipreses, Termas del Flaco y Alto Huemul.

Los resultados indican que ambas especies presentan niveles de variación genética intrapoblacional muy bajos; sin embargo, *Alsodes montanus* presenta mayor variación genética a nivel de especie en comparación con *A. tumultuosus*. En *A. montanus* se observa un alto nivel de estructura genética, con tres linajes bien definidos a lo largo de su distribución, mientras que en *A. tumultuosus* la estructura genética es muy baja.

Para detectar señales de expansión demográfica se usaron los tests D de Tajima y Fs de Fu con las agrupaciones genéticas entregadas por el programa GENELAND. Mientras que para *Alsodes montanus* no se detectaron señales de expansión, en el caso de *A. tumultuosus* solo se pudieron detectar señales de expansión poblacional en la localidad de Alto Huemul, que representa el extremo sur de su distribución. El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en que las localidades se agruparon por cuencas hidrográficas mostró valores altos de variación entre grupos para ambas especies, sugiriendo que gran parte de la diferenciación genética intraespecífica puede explicarse por el aislamiento por cuencas hidrográficas, siendo este efecto mayor en *Alsodes montanus*.

El test de Mantel, usado para evaluar si la variación genética a nivel de toda la distribución de cada especie se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia, mostró significancia sólo en el

caso de *A. tumultuosus*.
Basándose en los patrones de variación genética observados en este estudio, la mayor parte de la variación genética interpoblacional de ambas especies está representada en áreas protegidas de la Región de O'Higgins. Sin embargo, las estrategias de conservación deben ser orientadas principalmente a las poblaciones de La Parva y Potrero Grande para el caso de *A. montanus*, y de La Parva para el caso de *A. tumultuosus*, ya que representan linajes genéticamente diferenciados que no están protegidos formalmente.

Palabras claves: anfibios altoandinos, filogeografía, *Alsodes*.

Summary

The rate of decline of amphibians globally has dramatically increased over the last forty years. The main causes of this declination are the introduction of invasive species, habitat destruction, emerging diseases and climate change. New approaches such as genetics conservation have made it possible to focus and prioritize strategies of plans on species that are most threatened.
In this study the phylogeographic patterns of two species of endemic amphibians in the Andes of central Chile, *Alsodes montanus* and *A. tumultuosus*, using sequences of mitochondrial cytochrome b gene were compared. These species are categorized as Vulnerable (IUCN) and Endangered-Rare (RCE), distributed between the Metropolitan Region and the Region of Libertador Bernardo O'Higgins between 1.200-2.600 meters.
A noninvasive technique for obtaining samples using swabs to remove buccal mucosa was applied. Individuals were captured in seven representative locations in the major river basins that make the distributions of both species, including some protected areas: La Parva, Lagunillas, Potrero Grande, Pangal, Cipreses National Reserve, Termas del Flaco and Alto Huemul.
The results indicate that both species have very low levels of genetic variation within populations; however, *Alsodes montanus* has greater genetic variation at the species level compared to *A. tumultuosus*. In *A. montanus* a high level of genetic structure is observed, with three lineages well defined along all their distribution, whereas in *A. tumultuosus* the genetic structure is very low.
In order to detect signs of demographic expansion, the D of Tajima y Fs of Fu test were used with genetic groupings provided by the GENELAND program. While for *Alsodes montanus* no expansion signals were detected in the case of *A. tumultuosus* population expansion can be

seen in Alto Huemul. Molecular Analysis of Variance (AMOVA) by watershed showed higher values of variation between groups for both species, suggesting that the reason for the differences is genetic isolation by watersheds, being higher the percentage change in *Alsodes montanus*.

Mantel test used to evaluate the correlation between geographical distances and genetic differentiation for both species showed significance only for the case of *A. tumultuosus*.

Based on the results obtained in this study, conservation strategies should be focused on Potrero Grande in the case of *A. montanus*, and La Parva in the case of *A. tumultuosus*.

Key words: high andean amphibians, phylogeography, *Alsodes.*

Introducción

Los efectos del cambio climático global sobre la biodiversidad han sido foco de activa investigación en los últimos años (Bellard et al., 2012; Shen & Ma 2014). Entre los efectos ecológicos y evolutivos atribuidos al cambio climático se han descrito alteraciones en la fenología, parámetros fisiológicos, estrategias de vida, probabilidad de extinción y colonización, y la habilidad de dispersión de diversas especies (Parmesan, 2006; Bellard et al., 2012). Aunque el cambio climático actual se enmarca dentro del último período interglacial en el Holoceno, los futuros cambios climáticos y efectos en los biomas serán distintos a los observados durante esta era (Benito-Garzón et al., 2014). Uno de los ambientes que está siendo afectado en mayor grado por el cambio climático es el de alta montaña (Nogués-Bravo et al., 2007; Dirnböck et al., 2011). Históricamente, las respuestas de las poblaciones que habitan en las montañas frente a las glaciaciones pleistocénicas han sido muy variadas, por ejemplo, se han documentado procesos de extinción, retracción o expansión (latitudinal y/o altitudinal), sin embargo, estos efectos se han acelerado con el cambio climático actual (Spellman et al., 2007; Gottfried et al., 2012).

En los últimos años, se han realizado diversos estudios que han evaluado el efecto del cambio global desde una aproximación filogeográfica (Petit et al., 2005; Provan & Bennet, 2008). La filogeografía es la disciplina que permite identificar qué procesos históricos y evolutivos han modificado las distribuciones geográficas de las especies (Hickerson et al., 2010). Definida como “el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes de genes” (Avise, 2000), la filogeografía se basa en que la mayoría de las especies presentan una estructura genética asociada a la geografía en que habitan (Domínguez-Domínguez & Vásquez-Domínguez, 2009). Este tipo de aproximación permite describir la distribución de la diversidad genética e identificar los factores que pueden estar actuando sobre el flujo génico (Zeisset & Beebee, 2008), lo cual indicaría dónde se debiesen enfocar los esfuerzos de conservación. Además, los estudios filogeográficos que involucran más de una especie son esenciales para la conservación, ya que permiten identificar áreas con alto nivel de endemismo, riqueza de especies, focos geográficos de procesos evolutivos y cambios en los patrones de distribución (Rissler et al., 2006; Avise, 2000), permitiendo indicar las especies prioritarias para su conservación y proteger los procesos evolutivos que mantienen la diversidad biológica (Moritz, 2002).

A nivel mundial se considera que los anfibios presentan ventajas como un modelo para estudios filogeográficos, por su amplia distribución y el alto nivel de estructura genética que

presentan la mayoría de las especies (Zeisset & Beebee, 2008), lo cual ha sido atribuido a una baja capacidad de dispersión, acompañada generalmente de una alta filopatría (Beebee, 1996). Además, los anfibios son el grupo de vertebrados con mayor grado de amenaza a nivel mundial, debido principalmente a la destrucción de sus hábitats y los efectos ambientales provocados por el cambio global (Stuart et al., 2004), y particularmente vulnerables por sus estrechas preferencias de hábitat y distribución restringida (Wake & Vredenburg 2008). Chile no está ajeno a esta problemática, ya que aproximadamente un tercio de las 63 especies descritas en la actualidad tienen problemas de conservación (Lobos et al., 2013). Además, presentan un alto grado de endemismo (Correa et al., 2011; Correa et al., 2016), debido a la diversidad geográfica y climática de nuestro país, y a las barreras naturales que lo aíslan, por ejemplo, el desierto de Atacama, la Cordillera de Los Andes, el Océano Pacifico y los glaciares del extremo sur.

En Chile, se han realizado diversos estudios genéticos y filogeográficos en anfibios, los cuales involucran especies de amplia distribución (e.g. Victoriano et al., 1995; Formas & Brieva, 2000; Correa et al., 2008, 2010; Núñez et al., 2011; Vásquez et al., 2013). Sin embargo, el conocimiento de la historia evolutiva de los anfibios de Los Andes en Chile, donde se encuentran varias especies endémicas con distribución reducida, es escaso, limitándose a estudios filogenéticos y filogeográficos en el extremo norte, como por ejemplo, en *Rhinella spinulosa* (Correa et al., 2010) y *Telmatobius* (Sáez et al., 2014; Victoriano et al., 2015). Actualmente no se han realizado estudios similares en los ecosistemas andinos de Los Andes de Chile central, zona que fue afectada por las glaciaciones pleistocénicas (Duellman, 1979; Strecker et al., 2007) y donde se distribuyen cinco especies del género *Alsodes* (Cuevas & Formas, 2005). Dos de estas especies son endémicas de Los Andes de Chile y están codistribuidas entre los 33 y 35°S: *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus*.

Alsodes montanus fue descrito por Lataste (en Phillipi, 1902) como *Telmatobius montanus.* Posteriormente, Veloso et al., (1982) y Díaz & Valencia (1985a) describieron que dicha especie presentaba características más similares a las especies del género *Alsodes* que a *Telmatobius*, renombrándolo finalmente como *Alsodes montanus*. Por su parte, Cei (1962) lo describe como un anfibio de tamaño pequeño, robusto, de cabeza muy corta, con dientes vomerianos evidentes y membranas interdigitales que llegan hasta las puntas de los dedos en las extremidades posteriores. Además, es una especie de hábitos estrictamente nocturnos y acuáticos, que se refugia entre piedras y rocas durante el día. Es endémica de Chile y se encuentra clasificada como Vulnerable de acuerdo a la IUCN (2016) y En Peligro/Rara según el Reglamento de Clasificación de Especies (RCE). Se distribuye entre la Región Metropolitana y

la Región de O'Higgins, entre los 1.350 y 3.000 msnm (Araya & Riveros, 2008; Correa et al., 2008; Horta et al., 2014; Mora et al., 2015). Por otra parte, *A. tumultuosus*, descrito por Veloso et al., (1979), es un anfibio de tamaño mediano, que se caracteriza por tener una membrana interdigital incompleta en sus miembros traseros y porque los machos presentan parches espinosos protuberantes en el pecho y en sus primeros dígitos. En comparación con *A. montanus* esta especie no es estrictamente acuática, y de acuerdo a Lobos et al., (2013) se distribuye sólo en La Parva y Potrero Grande (Región Metropolitana), aunque hay registros recientes que extienden su distribución hasta Sierras de Bellavista (Región de O'Higgins) (Horta et al., 2014, Correa et al., datos no publicados). Se encuentra en la categoría Vulnerable de acuerdo a la IUCN (2016) y En Peligro/Rara según el RCE.

En este estudio se aplicó un enfoque de filogeografía comparada en las especies codistribuidas *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus*, las cuales probablemente han experimentado los mismos procesos históricos, como la orogénesis andina y las glaciaciones pleistocénicas. Si bien a escala regional estas especies coexisten en los ecosistemas altoandinos de Chile central, a una escala local se segregan altitudinalmente: *A. tumultuosus* se encuentra generalmente a mayor altura que *A. montanus*. Además, difieren marcadamente en su dependencia del agua (*A. montanus* es acuática, mientras que *A. tumultuosus* es más bien terrestre), lo cual podría influir en cómo los procesos evolutivos y las dinámicas demográficas que ambas especies experimentan afectan sus estructuras poblacionales. El objetivo de este estudio es describir desde un punto de vista histórico cómo estas especies han sido afectadas por los cambios climáticos pleistocénicos, y por ende cómo podrían responder al cambio climático actual, proporcionando a su vez información geográfica y genética relevante para su conservación.

Hipótesis

Debido a que las poblaciones de ambas especies de *Alsodes* han estado sometidas a los mismos procesos geológicos ocurridos en los ecosistemas altoandinos de Chile central, las diferencias en la estructura genética de estas especies estarían principalmente determinadas por las diferencias en sus capacidades de dispersión. De este modo, se hipotetiza que *Alsodes montanus*, por ser una especie acuática, con menor capacidad de dispersión, presentará una mayor estructura genética entre sus poblaciones en comparación con *A. tumultuosus*.

Objetivos

Objetivo general: Comparar los patrones filogeográficos de dos especies de anfibios altoandinas codistribuidas.

Objetivo específico 1: Describir los patrones filogeográficos de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* a lo largo de toda su distribución.
Objetivo específico 2: Estimar los niveles de variación genética intra e interpoblacional de ambas especies.
Objetivo específico 3: Detectar señales de expansión poblacional y cuellos de botella en ambas especies.
Objetivo específico 4: Inferir los procesos históricos y evolutivos que han producido los patrones de variación genética de ambas especies.
Objetivo específico 5: Identificar las áreas de mayor variación y/o diferenciación genética para ambas especies, en relación a las áreas protegidas presentes en sus rangos de distribución.

Materiales y Métodos

Localidades y material de estudio

Se capturaron individuos de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* (**Figura** 1) en localidades donde ambas especies cohabitan. Las localidades muestreadas se definieron según las principales cuencas hidrográficas que conforman la distribución de estas especies (**Figura** 2; **Tabla** 1). Las localidades incluidas fueron La Parva, Potrero Grande, Lagunillas, Reserva Nacional Cipreses, Pangal, Termas del Flaco y Santuario de la Naturaleza Alto Huemul (**Figura 3**).

Se utilizaron para el estudio adultos y juveniles, de los cuales se obtuvieron muestras de mucosa bucal con tórulas Copan. Posteriormente, todos los individuos fueron liberados en el mismo sitio de captura.

El estudio fue realizado con permiso del Servicio, Agrícola y Ganadero (SAG), resolución Nº1875/2015.

Figura 1. A la izquierda ejemplar adulto de *Alsodes montanus*; a la derecha un individuo adulto de *A. tumultuosus.*

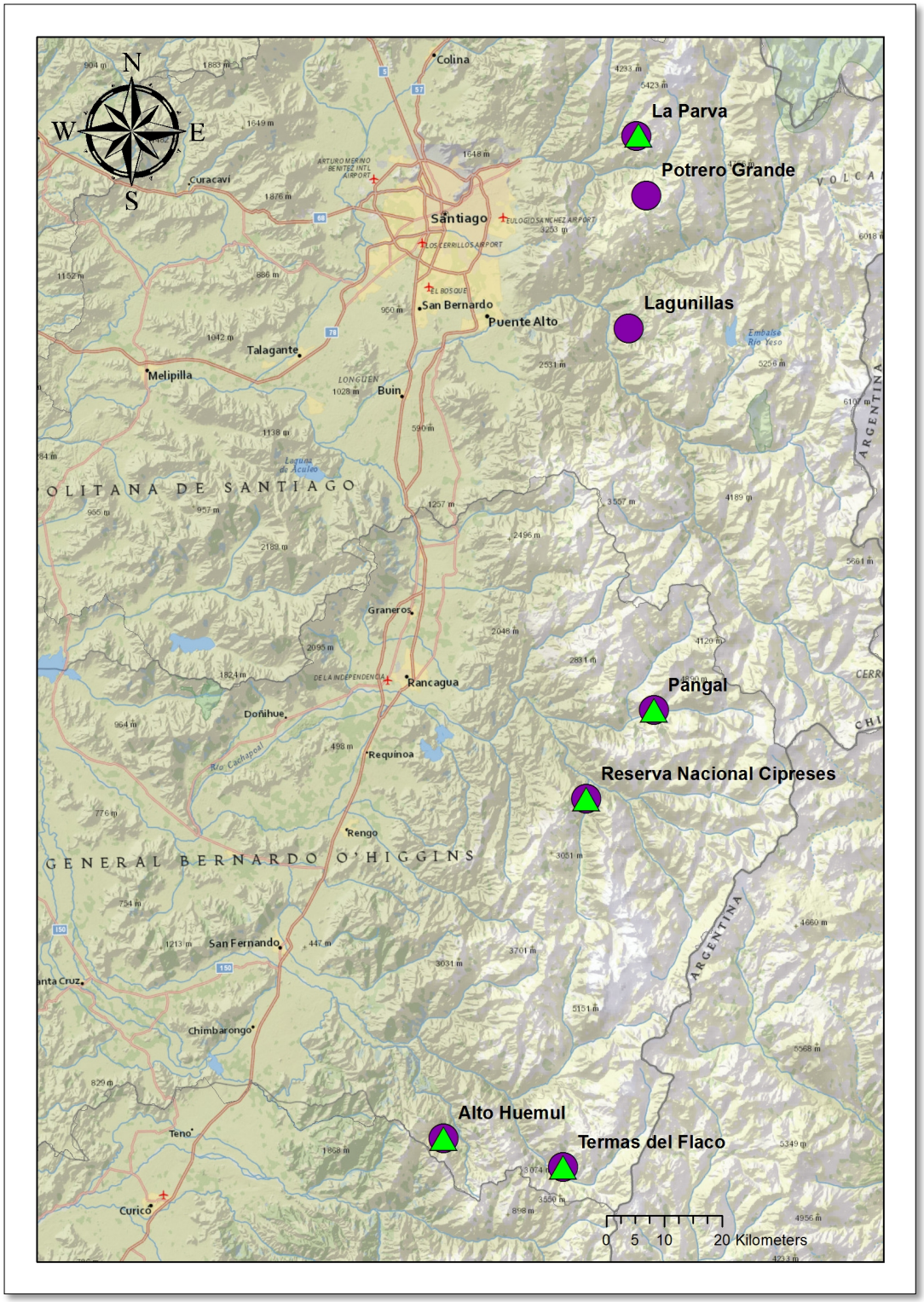

Figura 2. Ubicación geográfica de las localidades de *Alsodes montanus* (círculos) y *A. tumultuosus* (triángulos) incluidas en este estudio.

Figura 3. Algunas localidades de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* incluidas en este estudio. A. La Parva, Región Metropolitana (ambas especies). B. Reserva Nacional Cipreses, Región del Libertador Bernardo O'Higgins (*A. montanus*). C. Reserva Nacional Cipreses (*A. tumultuosus*). D. Lagunillas, Región Metropolitana (*A. montanus*) E. Pangal, Libertador Bernardo O'Higgins (ambas especies).

Tabla 1. Coordenadas y altitudes de las localidades de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* incluidas en este estudio.

Localidad	Región	Cuenca hidrográfica	UTM E	UTM N	Altitud (msnm)	Especie capturada
La Parva	Metropolitana	Maipo	0379285	6311037	2.630	*A.montanus* *A.tumultuosus*
Potrero Grande	Metropolitana	Maipo	0380947	6300721	2.586	*A. montanus*
Lagunillas	Metropolitana	Maipo	0378203	6278211	1.501	*A. montanus*
Pangal	Libertador Bernardo O'Higgins	Cachapoal	0369537	6210146	1.311	*A.montanus* *A.tumultuosus*
Reserva Nacional Cipreses	Libertador Bernardo O'Higgins	Cachapoal	0370732	6196663	1.231	*A.montanus* *A.tumultuosus*
Termas del Flaco	Libertador Bernardo O'Higgins	Tinguiririca	0358029	6141151	1.251	*A.montanus* *A.tumultuosus*
Alto Huemul	Libertador Bernardo O'Higgins	Tinguiririca	0345921	6138030	1.608	*A.montanus* *A.tumultuosus*

1.- Extracción de DNA y obtención de secuencias mitocondriales

La extracción de DNA se realizó utilizando el kit ReliaPrep™ Gdna Tissue Miniprep System (Promega) de acuerdo al protocolo del fabricante.

Se amplificó por PCR un fragmento del gen mitocondrial citocromo b de aproximadamente 1100 pares de bases utilizando los partidores Cytb A-L (5'GAA TYG GRG GWC AAC CAG TAG AAG ACC C-3´) y ControlP-H (5´-GTC CAT AGA TTC AST TCC GTC AG-3´).

Los reactivos y perfil térmico del PCR se describen en las Tablas 2 y 3, respectivamente. El producto de PCR fue secuenciado en ambas direcciones en un secuenciador automático (Aplied Biosystems) en la empresa Macrogen Inc., Corea (www.macrogen.com).

Tabla 2. Reactivos utilizados para los procesos de PCR en este estudio.

Mezcla	uL
H_2O	20,3
Buffer (10X)	3
$MgCl_2$ (25mM)	3,6
dNTPs (2,5mM)	1,4
Partidor H (10uM)	0,25
Partidor L (10uM)	0,25
Taq (5U/uL)	0,2
DNA	1
Total	30

Tabla 3. Programa de perfil térmico utilizado en este estudio.

Perfil térmico	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	1'
Desnaturalización	94	4”
Annealing	56	50”
Extensión	72	50”
Extensión final	72	8'
Reposo	10	Infinito

2.- Análisis genéticos y filogeográficos

Las secuencias fueron editadas y alineadas con el programa Bioedit versión 7.2.5 (Hall, 1999). Con los resultados obtenidos se generó una red de haplotipos con el método median-joining (Bandelt et al., 1999) para estimar y visualizar las relaciones entre los haplotipos de cada especie, utilizando el programa Network versión 5.0 (http://www.fluxusengineering.com/sharenet.htm). En las redes obtenidas, los círculos corresponden a los distintos haplotipos, cuyo tamaño es proporcional a la frecuencia dentro de la muestra, y el largo de las ramas representa el número de mutaciones entre ellos.

Se realizó un análisis de varianza molecular (Analysis of MOlecular VAriance, AMOVA) agrupando a las localidades según las principales cuencas hidrográficas donde se ubican, para establecer si los límites entre las cuencas que conforman la distribución de las dos especies habrían actuado como barreras geográficas.

La estructura filogeográfica de ambas especies fue evaluada con un análisis en GENELAND versión 1.0.7 (Guillot et al., 2005a, Guillot et al., 2005b), para evaluar la presencia de estructura poblacional en un conjunto de datos genotípicos georeferenciados a través de la inferencia y localización de discontinuidades genéticas.

Para estimar la variación genética a nivel intrapoblacional de cada una de las especies, se calcularon las siguientes medidas de diversidad genética: número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (H, indica la probabilidad de que al elegir dos haplotipos al azar, éstos sean diferentes) y diversidad nucleotídica (π, indica el número de diferencias promedio que existe entre todos los pares de secuencias que hay en la muestra).

Para detectar señales de expansión demográfica, se calcularon los estadísticos D de Tajima (Tajima, 1989) y Fs de Fu (Fu, 1997), con el programa DnaSP versión 5 (Librado & Rozas 2009) utilizando como unidades las “poblaciones” definidas por GENELAND.

Finalmente, para evaluar si la variación genética de estas especies se ajustó a un modelo de aislamiento por distancia (es decir, para determinar si hay menos diferencias genéticas entre localidades cercanas que entre localidades lejanas), se determinó si existe una relación significativa entre la diferenciación genética (F_{ST}) y las distancias geográficas de las localidades calculadas con el programa R, por medio de una prueba de Mantel (Mantel, 1967) realizado en el programa Arlequin.

Resultados

Objetivo específico 1: Describir los patrones filogeográficos de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* a lo largo de toda su distribución.

Con las secuencias obtenidas de cada especie se construyó una red de haplotipos con el método median-joining. Al comparar las redes de haplotipos se puede observar patrones filogeográficos completamente distintos entre sí: *Alsodes montanus* presenta una mayor diversidad genética, con nueve haplotipos y alta divergencia entre algunos de ellos, a diferencia de *A. tumultuosus* que presenta sólo siete haplotipos con baja divergencia entre ellos. Sin embargo, existe un patrón común en ambas, que es una variación genética muy baja dentro de sus localidades.

Alsodes montanus

De las 63 secuencias, se obtuvieron nueve haplotipos distintos (K), con 87 sitios correspondientes a sitios polimórficos (S), una diversidad haplotípica de 0,839 (H) y el número de diferencias entre pares de secuencias (π) igual a 0,03059 (**Tabla** 4).

El análisis de median-joining mostró tres haplogrupos (A, B y C) separados por al menos 14 pasos mutacionales. El primer grupo incluyó las localidades de la Región Metropolitana de La Parva y Potrero Grande (haplogrupo A), el haplogrupo B incluyó localidades de la Región Metropolitana Lagunillas y Región del Libertador Bernardo O'Higgins correspondientes a Reserva Nacional Cipreses, Pangal y Termas del Flaco y el tercer grupo sólo incluyó a la localidad de Alto Huemul (haplogrupo C) (**Figura** 4).

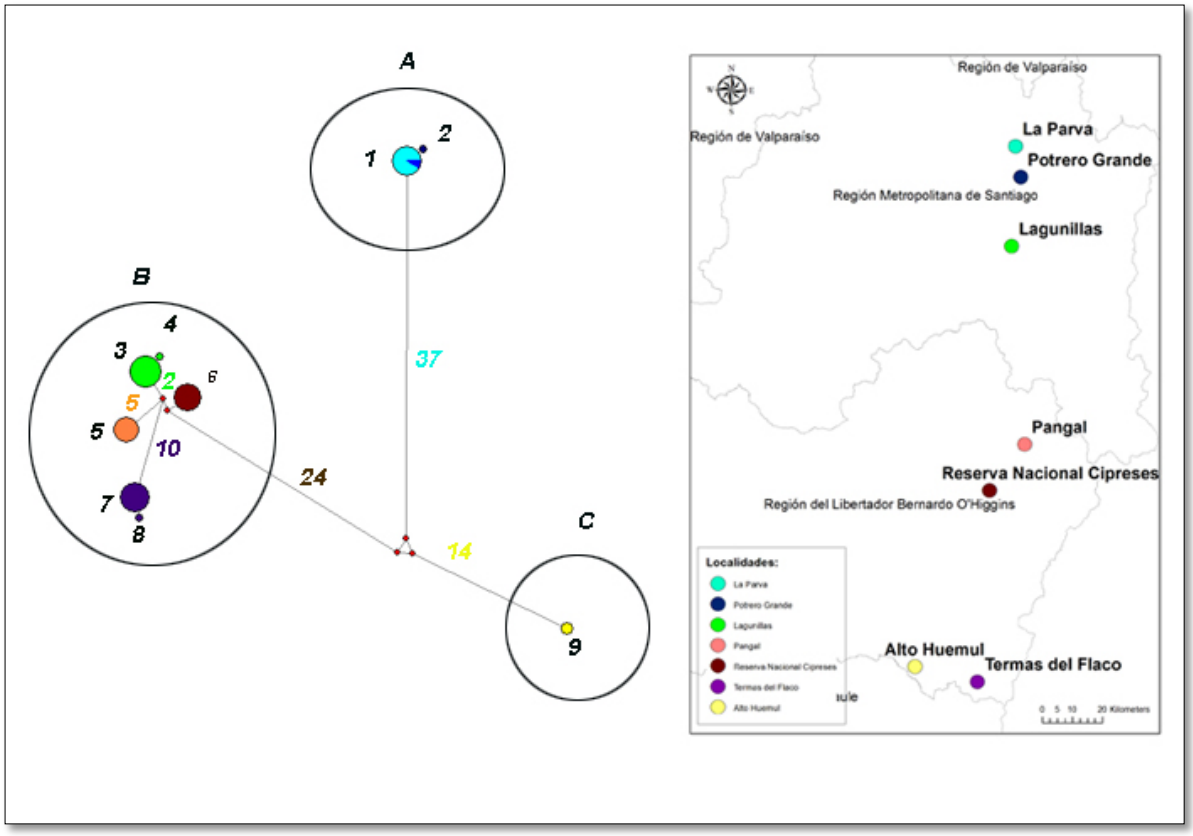

Figura 4. Red de haplotipos de *Alsodes montanus* muestreados en siete localidades representativas de toda su distribución. Cada círculo de color es un haplotipo, identificado con un número de color negro. Los números de colores indican los pasos mutacionales entre haplotipos y las letras junto a cada círculo indican los haplogrupos.

Alsodes tumultuosus

De las 43 secuencias, el número de haplotipos (K) para este conjunto de datos fue de siete, 12 sitios correspondieron a sitios polimórficos (S), la diversidad haplotípica fue de 0,0796 y el número de diferencias entre pares de secuencias (π) igual a 0,00487 (**Tabla** 4).

El análisis de median-joining no mostró haplogrupos evidentes para *A. tumultuosus* (**Figura** 5).

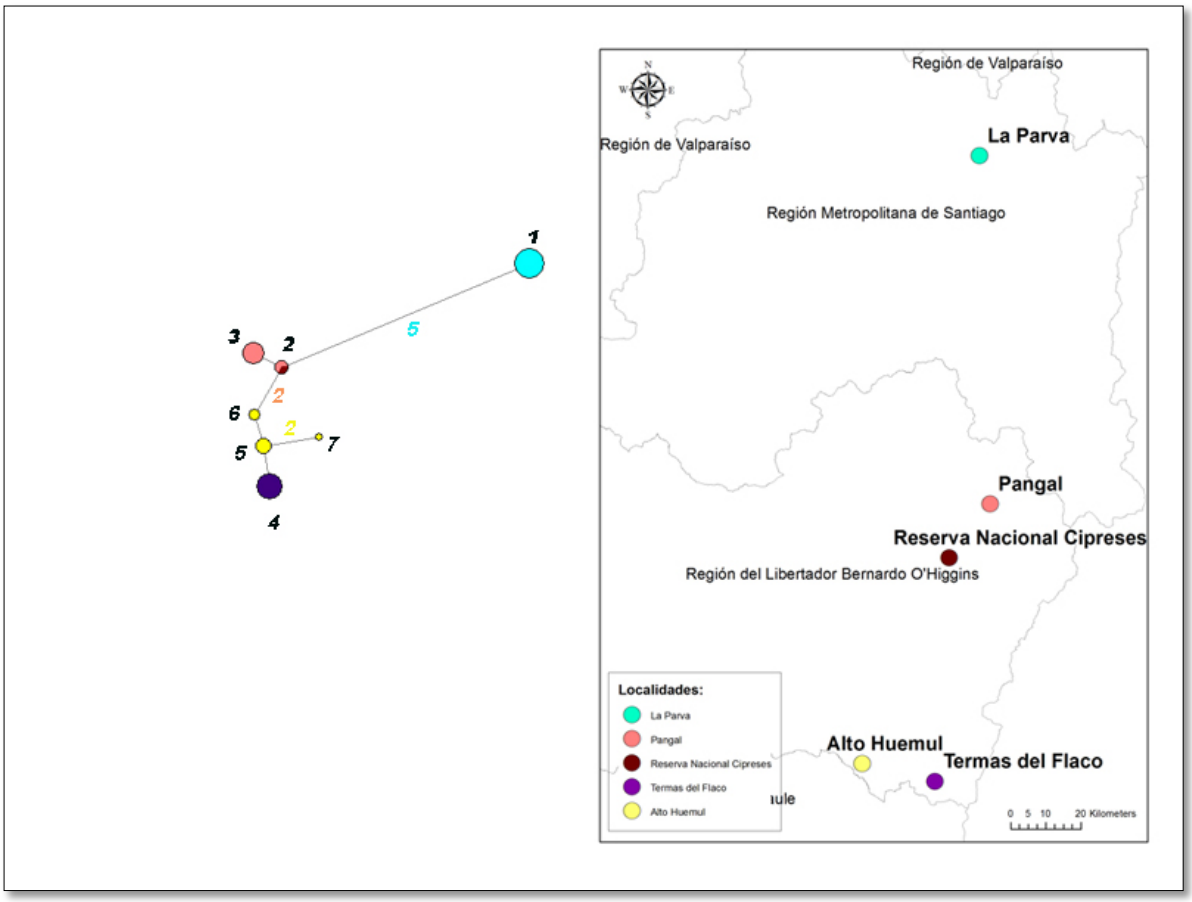

Figura 5. Red de haplotipos mediante el método median-joining de *Alsodes tumultuosus* muestreados en cinco localidades a lo largo de toda su distribución. Cada círculo de color es un haplotipo, identificado con un número de color negro. Los números de colores indican los pasos mutacionales entre haplotipos.

<u>Objetivo específico 2:</u> Estimar los niveles de variación genética intra e interpoblacional de ambas especies.

Los resultados obtenidos por el programa DnaSP mostraron valores de diversidad genética extremadamente bajos tanto para *Alsodes montanus* como para *A. tumultuosus*. Sin embargo, al comparar las dos especies *A. montanus* presenta una diversidad genética notablemente mayor.

En la **Tabla** 4 se señalan los valores de los cuatro índices de diversidad calculados: sitios polimórficos (S), número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (H) y diversidad nucleotídica (π) para cada una de las especies. En las **Tablas** 5 y 6 se muestran los valores obtenidos por localidad de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus*, respectivamente.

Tabla 4. Índices de diversidad del conjunto de muestras de cada especie.

Especie	Nº secuencias	K	S	H	π
Alsodes montanus	63	9	87	0,839	0,03059
Alsodes tumultuosus	43	7	12	0,0796	0,00487

Tabla 5. Índices de variación genética por localidad para *A. montanus*. Los guiones indican valores de cero para los índices.

Localidad	Nº secuencias	Índice de diversidad			
		K	S	H	π
La Parva	9	1	-	-	-
Potrero Grande	4	2	1	0,5	0,00056
Lagunillas	15	2	1	0,133	0,00015
Pangal	9	1	-	-	-
Reserva Nacional Cipreses	11	1	-	-	-
Termas del Flaco	13	2	1	0,1538	0,00017
Alto Huemul	2	1	-	-	-
Total	63				

Tabla 6. Índices de variación genética por localidad para *A. tumultuosus.* Los guiones indican valores de cero para los índices.

Localidad	Nº secuencias	Índice de diversidad			
		K	S	H	π
La Parva	14	1	-	-	-
Pangal	10	2	1	0,3556	0,00039
Reserva Nacional Cipreses	1	1	-	-	-
Termas del Flaco	11	1	-	-	-
Alto Huemul	7	3	3	0,6667	0,00114
Total	43				

Objetivo específico 3: Detectar señales de expansión poblacional y cuellos de botella en ambas especies.

Para detectar señales de expansión poblacional se utilizaron las agrupaciones genéticas entregadas por el programa GENELAND. El resultado del análisis GENELAND para *Alsodes montanus* reconoció cinco grupos: 1.- La Parva, Potrero Grande 2.-Lagunillas 3.- Pangal 4.- Reserva Nacional Cipreses 5.-Termas del Flaco, Alto Huemul. Para *A. tumultuosus* GENELAND reconoció cuatro poblaciones: 1.- La Parva 2.- Pangal, Reserva Nacional Cipreses 3.-Termas del Flaco 4.- Alto Huemul (**Figura** 6).

En base a estas poblaciones se realizaron los análisis de expansión poblacional: tests D de Tajima y Fs de Fu para ambas especies. Los resultados indican que no hay evidencia de expansión poblacional en *Alsodes montanus* (**Tabla** 7) y en el caso de *A. tumultuosus*, sólo la localidad de Alto Huemul sugiere una reciente expansión poblacional con un Fs de Fu de -8,32107 significativo (p = 0,001) (**Tabla** 8).

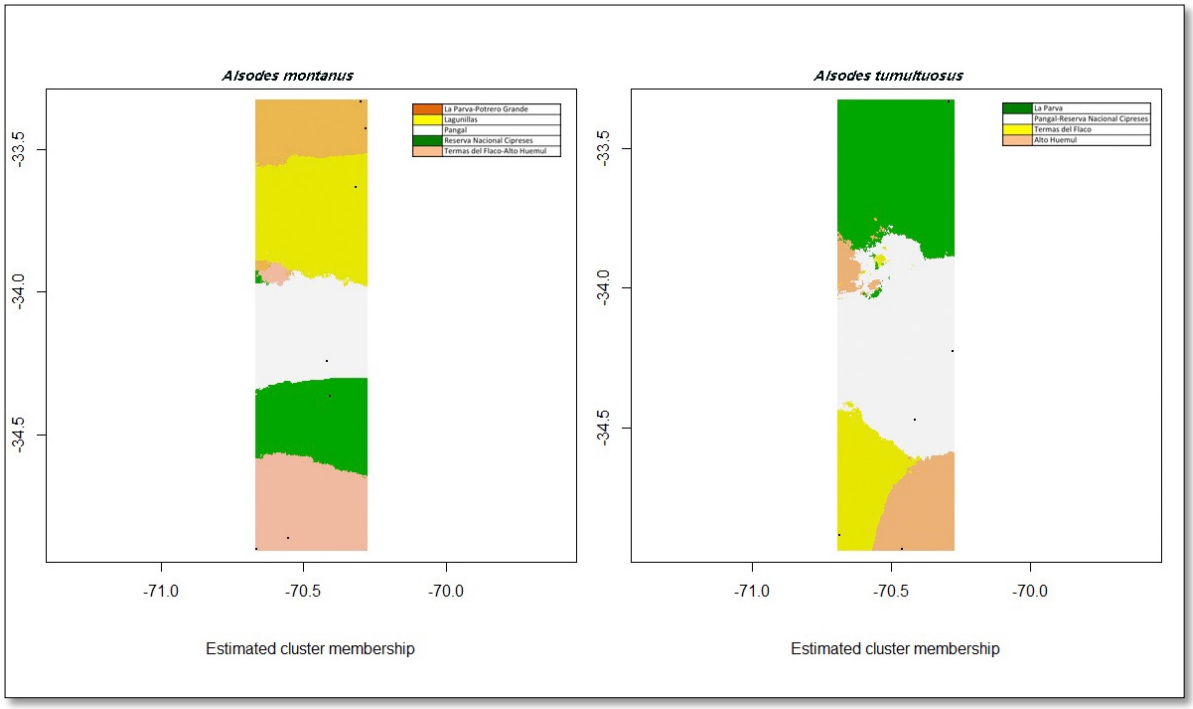

Figura 6. Agrupaciones entregadas por el programa GENELAND con las que se realizaron los test D de Tajima y Fs de Fu. Cada color representa una población y cada punto es una localidad.

Tabla 7. Resultados de los tests D de Tajima y Fs de Fu para *Alsodes montanus*. Los valores de significancia (*p*) mayores a 0,05 no son significativos (n.s.= no significativo).

Alsodes montanus	D de Tajima	Valor de significancia (*p*)	Fs de Fu	Valor de significancia (*p*)
Grupo GENELAND				
La Parva-Potrero Grande	-1,14915	0,15300 n.s.	-0,53714	0,112 n.s.
Lagunillas	-1,15945	0,131 n.s.	-0,64899	0,117 n.s,
Pangal	-	-	-	-
Reserva Nacional Cipreses	-	-	-	-
Termas del Flaco y Alto Huemul	-1,14915	0,176 n.s.	-0,53714	0,111 n.s.
Total	1,4676	0,1 n.s.	28,599	0,0001

Tabla 8. Resultados de los tests de D de Tajima y Fs de Fu para *Alsodes tumultuosus.* Los valores de significancia (*p*) mayores a 0,05 no son significativos (n.s.= no significativo).

Alsodes tumultuosus	D de Tajima	Valor de significancia (*p*)	Fs de Fu	Valor de significancia (*p*)
Grupo GENELAND				
La Parva	-	-	-	-
Pangal-Reserva Nacional Cipreses	0,67135	0,1 n.s.	0,779	0,402 n.s.
Termas del Flaco	-	-	-	-
Alto Huemul	-0,65405	0,2 n.s.	-8,32107	0,001
Total	1,85826	0,1 n.s.	3,459	0,046

Objetivo específico 4: Inferir los procesos históricos y evolutivos que han producido los patrones de variación genética de ambas especies.

Para detectar la presencia de barreras geográficas entre especies se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) por cuencas hidrográficas según la ubicación de las distintas localidades.

Las cuencas hidrográficas asociadas a cada localidad para *Alsodes montanus* fueron:

- Cuenca del río Mapocho: La Parva, Potrero Grande.
- Cuenca del río Maipo: Lagunillas.
- Cuenca del río Cachapoal: Pangal, Reserva Nacional Cipreses.
- Cuenca del río Tinguiririca: Termas del Flaco, Alto Huemul.

Y para las localidades de *Alsodes tumultuosus* se consideraron las siguientes cuencas hidrográficas:

- Cuenca del río Maipo: La Parva
- Cuenca del río Cachapoal: Pangal, Reserva Nacional Cipreses.
- Cuenca del río Tinguiririca: Termas del Flaco, Alto Huemul.

El AMOVA indica para *Alsodes montanus* que la variación entre grupos 66,88% es mayor que la variación entre poblaciones dentro de grupos (32,86%); sin embargo, los resultados de los análisis para esta especie no dieron significativos (p>0,06) (**Tabla** 9). En el caso de *A. tumultuosus* los resultados muestran un porcentaje de variación de 80,68% con una significancia alta de 0,00001 (*p*) (**Tabla** 10)

Los porcentajes de variación entre grupos para ambas especies son altos, sugiriendo que una de las principales causas de la diferenciación genética observada es el aislamiento por cuencas hidrográficas, siendo mayor este efecto en *A. tumultuosus*.

Tabla 9. Análisis de varianza molecular. Análisis de los componentes de varianza molecular entre grupos y dentro de poblaciones para *Alsodes montanus*. F_{SC}= Entre poblaciones dentro de grupos; F_{ST}= Entre poblaciones; F_{CT}= Entre grupos; g.l.=Grados de libertad.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índices de Fijación	Significancia (*p*)
Entre grupos	3	741,598	11,758	66,88	F_{CT} 0,669	0,07331± 0,00930
Entre poblaciones dentro de grupos	3	109,367	5,777	32,86	F_{ST} 0,961	0,06843± 0,0068
Dentro de poblaciones	56	2,606	0,046	0,26	F_{SC} 0,798	0,00001
Total	62					

Tabla 10. Análisis de varianza molecular. Análisis de los componentes de varianza molecular entre grupos y dentro de poblaciones para *Alsodes tumultuosus*. F_{SC}= Entre poblaciones dentro de grupos; F_{ST}= Entre poblaciones; F_{CT}= Entre grupos; g.l.=Grados de libertad.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índices de Fijación	Significancia (*p*)
Entre grupos	2	83,734	2,588	80,68	F_{CT} 0,806	0,00001
Entre poblaciones dentro de grupos	2	5,383	0,494	15,43	F_{ST} 0,961	0,06843 ±0,0068
Dentro de poblaciones	38	4,743	0,124	3,89	F_{SC} 0,798	0,00001
Total	42	93,86	3,207			

Para estimar si existe una correlación entre las distancias geográficas y la diferenciación genética entre las localidades se realizó un test de Mantel con el programa Arlequin. Las matrices utilizadas se entregan en las **Tablas** 11 y 12 para cada especie por separado.

Para *Alsodes montanus* el test de Mantel arrojó un coeficiente de correlación de 0,329 con una significancia de 0,079 (*p*) y para *A. tumultuosus* resultó un coeficiente de correlación de 0,669 con un nivel de significancia de 0,03 (*p*).

Tabla 11. Matriz de distancias geográficas (kilómetros) entre localidades sobre la diagonal y por debajo la diferenciación genética (F_{ST}) para *Alsodes montanus*.

	La Parva	Potrero Grande	Lagunillas	Pangal	Reserva Cipreses	Termas del Flaco	Alto Huemul
La Parva	0	10,5	33,3	101,7	115,2	171,8	177,7
Potrero Grande	0,217	0	23,1	91,6	105,0	161,7	167,8
Lagunillas	0,996	0,996	0	68,5	81,9	138,6	144,8
Pangal	1,000	0,997	0,988	0	13,6	70,1	76,7
Reserva Nacional Cipreses	1,000	0,998	0,980	1.000	0	57,0	64,2
Termas del Flaco	0,998	0,996	0,988	0,993	0,993	0	11,0
Alto huemul	1,000	0,992	0,997	1,000	1,000	0,996	0

Tabla 12. Matriz de las distancias geográficas (kilómetros) entre localidades sobre la diagonal y por debajo la diferenciación genética (F_{ST}) para *Alsodes tumultuosus.*

	La Parva	Pangal	Reserva Cipreses	Termas del Flaco	Alto Huemul
La Parva	0	99,7	127,6	179,4	177,1
Pangal	0,978	0	30,1	80,7	82,6
Reserva Nacional Cipreses	1,000	0,555	0	51,8	52,5
Termas del Flaco	1,000	0,964	1,000	0	21,2
Alto huemul	0,955	0,831	0,650	0,732	0

Objetivo específico 5: Identificar las áreas de mayor variación y/o diferenciación genética para ambas especies en relación a las áreas protegidas presentes en sus rangos de distribución.

Reconociendo que uno de los niveles más importantes que se debe conservar en la naturaleza es la diversidad genética de las especies (McNeely et al., 1990), y en base a los datos genéticos entregados en este estudio, se definieron las localidades que deben tener mayor prioridad para estrategias de conservación.

La diversidad intrapoblacional resultó ser extremadamente baja en ambas especies, sin embargo, *Alsodes montanus* mostró mayor diversidad genética que *A. tumultuosus* (π=0,03059 y π=0,00487, respectivamente). En *A. montanus* se observan tres linajes bien diferenciados representados por tres haplogrupos (**Figura** 5), haplogrupo A: Potrero Grande y La Parva, haplogrupo B: Lagunillas, Pangal, Reserva Nacional Cipreses y Termas del Flaco y el haplogrupo C: Alto Huemul (**Figura** 4). Estos antecedentes junto con las localidades con mayor diversidad nucleotídica (Potrero Grande (π=0,00056), Lagunillas (π=0,00015) y Termas del Flaco (π=0,00017)) pueden ser usados para orientar los esfuerzos de conservación en poblaciones específicas. Los haplogrupos B y C se encuentran representados en dos áreas protegidas, Reserva Nacional Cipreses y Santuario de la Naturaleza Alto Huemul, por lo que estos linajes se encontrarían bajo un menor grado de amenaza. En contraste, el haplogrupo A (que incluye las localidades de La Parva y Potrero Grande) se encuentra actualmente sin protección oficial. Esta condición, sumado a que la mayor diversidad genética la presenta Potrero Grande, indican que esta última localidad debiera ser priorizada para promover la conservación de *Alsodes montanus*.

En el caso de *Alsodes tumultuosus* no fue posible definir haplogrupos, por lo que sólo se pudo analizar según los valores de diversidad genética de cada localidad. Igual que en el caso de *Alsodes montanus,* las poblaciones ubicadas en las localidades de Alto Huemul (Santuario de la Naturaleza) y Reserva Nacional Cipreses se encontrarían con un bajo grado de amenaza. Estas a su vez muestran los mayores valores de diversidad genética (Alto Huemul (π=0,00114) y Pangal (π=0,00039)). Sin embargo, el haplotipo de Pangal está representado en la Reserva Nacional Cipreses, por lo que la única localidad que se encuentra sin protección oficial es La Parva.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la diversidad genética intrapoblacional es muy baja en *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus*. Sin embargo, los patrones filogeográficos de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* son muy distintos entre ambas especies: en la primera se observan tres linajes bien definidos, con distribuciones geográficas exclusivas, y una diversidad genética mayor que la de *A. tumultuosus* y con mayor estructura genética. En *A. tumultuosus* no se identificaron linajes genéticos diferenciados, presentando una mayor diversidad genética en el extremo sur de su distribución (Santuario de la Naturaleza Alto Huemul). Además, se identificó que el aislamiento por cuencas hidrográficas puede explicar gran parte de la diferenciación genética de ambas especies, aunque el efecto fue mayor en el caso de *A. tumultuosus.*

En Chile existen muy pocos estudios de filogeografía en anfibios altoandinos (Correa et al., 2010; Victoriano et al., 2015), los cuales se restringen a la zona norte altiplánica del país. Hasta la fecha no existen estudios similares sobre los anfibios que habitan en Los Andes de la zona central de Chile, donde se han descrito varias especies endémicas del género *Alsodes*. Esta zona actualmente cuenta con una menor superficie protegida, en comparación por ejemplo con la zona altiplánica de las Regiones de Arica y Parinacota y de Tarapacá, y además está amenazada por el desarrollo de numerosos proyectos mineros e hidroeléctricos. Considerando esta situación, este estudio provee información de base para evaluar cómo estos proyectos podrían afectar la diversidad genética de estas especies.

En este estudio, se trabajó con dos anfibios de la cordillera de Los Andes de Chile central que comparten los mismos hábitats y tienen distribuciones simpátricas; sin embargo, sus patrones filogeográficos son muy distintos entre sí, lo que puede explicarse en parte por sus hábitos de vida diferentes. *Alsodes montanus* es una especie estrictamente acuática, lo que limita su dispersión y su potencial conexión con otras localidades. En cambio, *A. tumultuosus* es de hábitos más bien terrestres, lo que le confiere una mayor capacidad de dispersión, lo que a largo plazo puede producir una menor estructura genética. Sin embargo, en otros géneros de anfibios altoandinos no es la misma situación. Un ejemplo de ello es *Rhinella spinulosa* que tiene hábitos terrestres y presenta una alta estructura genética (Correa et al., 2010), y *Telmatobius marmoratus* que es de hábitos acuáticos con una baja estructura genética (Victoriano et al., 2015).

Aunque los niveles de divergencia genética entre ambas especies difieren, ambas

especies muestran una diversidad genética intrapoblacional muy baja, lo que puede asociarse a la inestabilidad de los ambientes cordilleranos donde habitan. La Cordillera de Los Andes se caracteriza por una historia de reiterados e intensos cambios geológicos y climáticos (Veblen 2007). A una escala más local, fenómenos como aluviones o erupciones volcánicas pueden destruir los hábitats y producir cuellos de botella en las poblaciones, lo cual implica una disminución de su diversidad genética. Un bajo nivel de diversidad genética también ha sido reportado en otra especie de anfibio altoandino del mismo género, *Alsodes pehuenche* (Correa et al., 2013; Correa et al., datos no publicados), que habita en una zona modificada profundamente por la actividad volcánica, lo cual sugiere que este patrón podría ser común en las poblaciones de anfibios de Los Andes.

La literatura sobre estas dos especies es muy escasa (Veloso et al., 1979; Díaz & Valencia 1985; Mora et al., 2016), por lo que se cuenta con muy pocos antecedentes biológicos para diseñar, implementar y evaluar estrategias de conservación. En este contexto, la información preliminar sobre la variación genética de *Alsodes montanus* y *A. tumultuosus* obtenida en este estudio puede servir como un marco de referencia inicial para implementar medidas de conservación de sus poblaciones. Sin embargo, es necesario complementarla con estudios genéticos con marcadores nucleares que nos permitan investigar otros aspectos relevantes para la conservación tales como, estructura poblacional, patrones de flujo génico, identificación de cuellos de botella e hibridación entre poblaciones (González, 2003). Además, es imperativo realizar estudios acerca de la demografía, ecología y las potenciales amenazas que puedan afectar la persistencia de sus hábitats, los cuales, en conjunto, son esenciales para implementar medidas efectivas de conservación *in situ*.

Bibliografía

Allentoft M & O´Brien J (2010) Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: a review. Diversity 2: 47-71.

Araya S & Riveros E (2008) Ampliación del rango de distribución geográfica de *Alsodes montanus* (Amphibia, Leptodactylidae) a la Región de O'Higgins. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural 57: 117-123.

Avise J (2000) The history and purview of phylogeography. En: Phylogeography, the history and formation of species. Harvard University Press. Massachusetts.

Bandelt H, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37-48.

Beebee TJC (1996) Ecology and Conservation of Amphibians. Chapman & Hall: London.

Bellard C, Bertelsmeier C, Leadley P, Thuiller W & Courchamp (2012) Impacts of climate change on the future of biodiversity. Ecology Letters 15: 365–377.

Benito-Garzón M, Leadley P & Fernández-Manjarrés J (2014) Assessing global biome exposure to climate change through the Holocene–Anthropocene transition. Global Ecology and Biogeography 23: 235–244.

Bonnet E & Van De Peer Y (2002) ZT: a software tool for simple and partial Mantel tests. Journal of Statistical software 7: 1-12.

Cei JM (1962) Batracios de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile. 61 Pp.

Correa C, Lobos G, Pastenes L & Méndez M (2008) Invasive *Pleurodema thaul* (Anura, Leiuperidae) from Robinson Crusoe Island: Molecular identification of its geographic origin and comments on the phylogeographic structure of this species in mainland Chile. Herpetological Journal 18(2): 77-82.

Correa C, Pastenes L, Sallaberry M, Veloso A & Méndez M (2010) Phylogeography of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) in northern Chile. Amphibia-Reptilia 31: 85-96.

Correa C, Cisternas J & Correa-Solís M (2011) Lista comentada de las especies de anfibios de Chile (Amphibia: Anura). Boletín de Biodiversidad de Chile 6:1-21.

Correa C, Pastenes L, Iturra P, Calderón P, Vásquez D, Lam N, Salinas H & Méndez MA (2013) Confirmation of the presence of *Alsodes pehuenche* Cei, 1976 (Anura, Cycloramphidae) in Chile: morphological, chromosomal and molecular evidence. Gayana 77(2): 117-123.

Correa C, Donoso JP & Ortíz JC (2016) Estado de conocimiento y conservación de los anfibios de Chile: una síntesis de los últimos 10 años de investigación. Gayana 80:103-124.

Cuevas C & Formas R (2003) Cytogenetic analysis of four species of the genus *Alsodes* (Anura: Leptodactylidae) with comments about the karyological evolution of the genus. Hereditas 138: 138-147.

Cuevas C & Formas JR (2005) Novel diploid number and chromosomal formula in a South American frog of the genus *Alsodes* (Amphibia, Leptodactylidae). Italian Journal of Zoology 72:2, 87-91.

Díaz N & Valencia J (1985a) Larval Morphology and Phenetic Relationships of the Chilean *Alsodes*, *Telmatobius*, *Caudiverbera* and *Insuetophrynus* (Anura: Leptodactylidae). Copeia 1985: 175- 181.

Díaz N & Valencia J (1985b) Microhabitat utilization by two leptodactylid frogs in the Andes of central Chile. Oecología 66: 353-357.

Dirnböck T, Essl F & Rabitsch W (2011) Disproportional risk for habitat loss of high-altitude endemic species under climate change. Global Change Biology 17: 990–996.

Dixo M, Metzger JP, Morgante J & Zamudio K (2009) Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. Biological Conservation 142: 1560–1569.

Domínguez- Domínguez O & Vásquez -Domínguez E (2009) Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. Animal Biodiversity and Conservation 32: 59-70.

Duellman W (1979) The south american herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal. Museum of Natural History, University of Kansas.

Excoffier L & Lischer H (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10: 564-567.

Formas JR & Brieva L (2000) Population genetics of the Chilean frog *Batrachyla leptopus* (Leptodactylidae). Genetics and Molecular Biology, 23: 43-48.

Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915–925.

Gallardo C, Correa C, Morales P, Sáez P, Pastenes L & Méndez M (2012) Validation of a cheap and simple nondestructive method for obtaining AFLPs and DNA sequences (mitochondrial and nuclear) in amphibians. Molecular Ecology Resources 12: 1090-1096.

Goebel A, Donnelly J & Atz M (1999) PCR Primers and Amplification Methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome b in Bufonids and Others Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully. Molecular Phylogenetics and Evolution 11: 163-199.

Goottfried M, Pauli H, Futschik A, Akhalkatsi M, barancok P, Alonso J, Coldea G, Dick J, Erschbamer B, Fernández M, Kazakis J, Krajci J, Larsson P, Mallaun M, Michelsen O, Moiseev D, Moiseev P, Molau U, Merzouki A, Nagy L, Nakhutsrishvili G, Pedersen B, Pelino G, Puscas M, Rossi G, Stanisci A, Theurillat JP , Tomaselli M, Villar L, Vittoz P, Vogiatzakis I & Grabherr G (2012) Continent-wide response of mountain vegetation to climate change. Nature Climate Change. 2: 111-115.

González E (2003) Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Graellsia 59(2-3): 377-388.

Guillot G, Estoup A, Mortier F. & Cosson J (2005a) A spatial statistical model for landscape genetics. Genetics 170: 1261–1280.

Guillot G., Mortier F & Estoup A (2005b) GENELAND: a computer package for landscape genetics. Molecular Ecology Notes 5: 712–715.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Versión 5.0.9, 2001. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

Hewitt GM (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 359 (1442): 183–195.

Hickerson M, Carstens B, Cavender-Bares J, Crandall K, Graham C, Johnson J, Rissler L, Victoriano P & Yoder A (2010) Phylogeography's past, present, and future 10 years after Avise, 2000. Molecular Phylogenetics and Evolution 54: 291–301.

Horta I, Soffia MF, Mora M, Aguilar A, Lobos P & Valdovinos C (2014) Antecedentes preliminares del estudio de la batracofauna en la Reserva Nacional Río de Los Cipreses y el Alto Cachapoal, Región del Libertador Bernardo O´Higgins. Biodiversidata, CONAF.

Ihaka R & Gentleman R (1996) R: A Language for Data Analysis and Graphics. Journal of Computational and Graphical Statistics 5: 299–314.

Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H, Valentin F, Wallace I, Wilm A, Lopez R, Thompson J, Gibson T & Higgins D (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947-2948.

Librado P & Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.

Lobos G, Vidal M, Correa C, Labra A, Díaz - Páez H, Charrier A, Rabanal F, Díaz S & Tala C (2013) Anfibios de Chile, un desafío para la conservación. Ministerio del Medio Ambiente, Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y

Red Chilena de Herpetología. Santiago. 104 p.

Mantel N.A (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209–220.

McNeely J.A, Miller K.R, Reid W.V, Mittermeier R.A & Werner T.B (1990) Conserving the world's biological diversity. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US, World Bank, Washington.

Mora M, Horta I, Soffia F, Charrier A, Palma E & Correa C (2015) Estudios para la conservación de los anfibios altoandinos de Chile central. Boletín Chileno de Herpetología 2: 8.

Nogués-Bravo D, Araújo M, Errea M & Martínez-Rica J (2007) Exposure of global mountain systems to climate warming during the 21st Century. Global Environmental Change 17 :420–428.

Núñez J, Wood N, Rabanal, Fontanella F & Sites Jr (2011) Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 58(2): 343-352.

Parmesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 37:637–69.

Pearman P & Garner TW (2005) Susceptibility of Italian agile frog populations to an emerging strain of Ranavirus parallels population genetic diversity. Ecology Letters 8: 401–408.

Petit R, Hampe A & Chedaddi R (2005) Climate changes and tree phylogeography in the mediterranean. Taxon 54: 877-885.

Provan, J & Bennett, KD (2008) Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. Trends in Ecology and Evolution 23: 10.

Rabanal F & Núñez J (2008) Anfibios de los bosques templados de Chile. Primera edición. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, 206 pp.

Rissler J, Hijmans R, Graham C, Moritz C & Wake D (2006) Phylogeographic Lineages and Species Comparisons in Conservation Analyses: A Case Study of California Herpetofauna. The American Naturalist 167:5.

Ruiz M, González A, Estay S, Gaitán J, Barria I, Bartheld J & Bacigalupe L (2014) Impact of global warming at the range margins: phenotypic plasticity and behavioral thermoregulation will buffer an endemic amphibian. Ecology and Evolution 4: 4467-4475.

Sáez P, Fibla P, Correa C, Sallaberry M, Salinas H, Veloso A, Mella J, Iturra P & Méndez M (2014) A new endemic lineage of the Andean frog genus *Telmatobius* (Anura, Telmatobiidae) from the western slopes of the central Andes. Zoological Journal of the

Linnean Society 171 :769–782.

Shaffer H, Gidis M, McCartney-Melstad E, Neal K, Oyamaguchi H, Tellez M & Toffelmier E (2015) Conservation genetics and genomics of amphibians and reptiles. Annual Reviews of Animal Biosciences 3:113–38.

Shen Z & Ma K (2014) Effects of climate change on biodiversity. Chinese Science Bulletin 59: 4637–4638.

Spellman G, Riddle B & Klicka J (2007) Phylogeography of the mountain chickadee (Poecile gambeli): diversification, introgression, and expansion in response to Quaternary climate change. Molecular Ecology 16: 1055–1068.

Strecker M, Alonso R, Bookhagen B, Carrapa B, Hilley G, Sobel E & Traught M (2007) Tectonics and Climate of the southern Central Andes. Annual Review of Earth and Planetary Sciences 35: 747-787.

Stuart S, Chanson J, Cox N, Young B, Rodrigues A, Fischman D & Waller R (2004) Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. Science 306: 1783-1786.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585–595.

Vásquez D, Correa C, Pastenes L, Palma E & Méndez M (2013) Low phylogeography structure of *Rhinella arunco* (Anura: Bufonidae), an endemic amphibian from the chilean mediterranean hotspot. Zoological studies 52:35.

Veblen T.T (2007) Temperate forests of the Southern Andean region. En: Veblen T.T, Orme A, Young K (Eds.) Physical Geography of South America. Oxford University Press 217–231.

Veloso A, Iturra P & Galleguillos R (1979) Evidencias cromosómicas en el género *Alsodes* (Amphibia- Leptodactyilidae), con la descripción de una especie nueva. Physis 38: 91-98.

Veloso A, Sallaberry M, Navarro J, Iturra P, Valencia J, Penna M & Díaz N (1982) Contribución al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile; p. 135-268 In A. Veloso and E. Bustos (eds.), La Vegetación y Vertebrados Ectotérmicos del Transecto Arica-Lago Chungará, Vol. I. Montevideo.ROSTLAC. Wiens, J. J. 1993.

Victoriano P, Ortiz JC, Troncoso L & Galleguillos R (1995) Allozyme variation in population of *Pleurodema thaul* (Lesson, 1826) (Anura; Leptodactylidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 112B:3 487-492.

Victoriano P, Ortiz JC, Benavides E & Adams B (2008) Comparative phylogeography of codistributed species of *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from the central –southern Andean range. Molecular Ecology 17: 2397-2416.

Victoriano P.F, Muñoz-Mendoza C, Sáez P.A., Salinas H.F, Muñoz-Ramírez C, Sallaberry M, Fibla P & Méndez M.A (2015) Evolution and conservation on top of the world: phylogeography of the marbled water frog (*Telmatobius marmoratus* species Complex; Anura,Telmatobiidae) in Protected Areas of Chile. Journal of Heredity 106(S1):546-559.

Zeisset I & Beebee T (2008) Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. Heredity 101: 109-119.