

Osteología, taxonomía y relaciones filogenéticas de las ranas del género *Telmatobufo* (Leptodactylidae)

Osteology, taxonomy and phylogenetic relationships of the frog genus *Telmatobufo* (Leptodactylidae)

J. RAMÓN FORMAS¹, JOSÉ J. NÚÑEZ & LILA M. BRIEVA

¹Instituto de Zoología, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile, e-mail:
rformas@valdivia.uca.uach.cl

RESUMEN

Se hizo un análisis osteológico de las especies del género *Telmatobufo* (*T. australis*, *T. bullocki*, *T. venustus*), el que completa la definición genérica fundamentada exclusivamente en la osteología de *T. bullocki* y caracteres larvarios. Para cada especie se entrega nueva información distribucional, ecológica, reproductiva, morfométrica, cromosómica, alozímica y molecular. Se presenta una clave para identificar individuos adultos de las tres especies de *Telmatobufo*. Se publica por primera vez una lámina de Philippi perdida por casi un siglo, lo que permite aclarar de manera definitiva la identidad taxonómica de *T. venustus*. Con las distancias de Mahalanobis y las distancias genéticas de Rogers se determinan las similitudes morfológicas y genéticas entre las especies de *Telmatobufo*. Usando las secuencias para ARN 12S mitocondrial, frecuencias alélicas polarizadas de genes estructurales y caracteres morfológicos (osteológicos y morfológicos externos) se propone una hipótesis de relaciones filogenéticas basada en los principios de máxima parsimonia y máxima probabilidad. Finalmente se entrega una proposición acerca de la especiación e historia evolutiva de este grupo de ranas endémicas de los bosques templados del centro-sur de Chile.

Palabras clave: osteología, taxonomía, relaciones filogenéticas, *Telmatobufo*, sur de Chile.

ABSTRACT

An osteological analysis of the three species of the genus *Telmatobufo* (*T. australis*, *T. bullocki*, and *T. venustus*) was done. That analysis completes the generic definition based mainly on the osteology of *T. bullocki* and on morphological larval characters. New information on morphometry, chromosomes, reproductive biology, ecology, geographical range, allozymes, and molecular data is provided for each species. A key for the taxonomic determination of adult specimens of *Telmatobufo* is also presented. An unedited original plate by R.A. Philippi, lost for almost a century, is published for the first time; this plate allowed the restatement of the taxonomical identity of *T. venustus*. Mahalanobis distance and Rogers' genetic distance were employed to assess the morphological and the genetical similarities among the three *Telmatobufo* species. Employing mtRNA12S sequences, in combination with polarized allelic frequencies of structural genes, and morphological (external and osteological) characters, a hypothesis on the phylogenetic relationships of the *Telmatobufo* species is proposed, worked on principles of maximum parsimony and maximum likelihood. Finally, a reconstruction of the evolutionary history and speciation process of this group of endemic frogs of the temperate central southern Chilean forests is proposed.

Key words: osteology, taxonomy, phylogenetic relationships, *Telmatobufo*, southern Chile.

INTRODUCCIÓN

Las ranas del género *Telmatobufo* constituyen un pequeño y escaso grupo de anuros [*T. australis* Formas, 1972, *T. bullocki* Schmidt 1952 y *T. venustus* (Philippi 1899)] endémico de los bosques templados del sur de Chile (35-41 °S; Cei 1962, Formas & Pugin 1979, Formas & Veloso 1982). Desde el punto de vista filogenético *Telmatobufo* está estrechamente relacionado con *Caudiverbera* Laurenti 1768 (Lynch 1978) y am-

bos taxa (únicos géneros de la tribu Calyptrocephalellini) pertenecen a una antigua stirpe de Leptodactylidae (Heyer 1975, Duellman 1979) restringida hoy al extremo sur de Sudamérica (Formas 1979).

Las larvas de *Telmatobufo* son típicos habitantes de arroyos de montaña (Formas 1995) y poseen notables adaptaciones morfológicas a estos particulares ambientes lóticos (cuerpos deprimidos, bocas ensanchadas como ventosas y colas gruesas; Díaz et al. 1983, Formas 1988, Lavilla

1988); por el contrario, *C. caudiverbera* (Linnaeus 1758) habita en ambientes lénticos del centro-sur de Chile (30-42° S, Lynch 1971) y sus renacuajos tienen el cuerpo ovalado con aletas anchas (Lavilla 1988), caracteres larvarios que han sido considerados primitivos para los miembros de la familia Leptodactylidae (Lynch 1971).

La existencia de fósiles de *Caudiverbera* en el Eoceno y Oligoceno de la Patagonia argentina, (Schaeffer 1949, Gasparini & Báez 1975, Báez & Gasparini 1979) sugiere una vieja historia Cenozoica para este género. La historia evolutiva de *Telmatobufo* (grupo hermano de *Caudiverbera*, Lynch 1978) y las relaciones filogenéticas interespecíficas no han sido hipotetizadas.

Desde el punto de vista taxonómico las definiciones y diagnosis de las especies de *Telmatobufo* se fundamentan en un reducido número de especímenes (un adulto, un juvenil y una larva para *T. australis*, dos adultos para *T. bullocki* y dos juveniles para *T. venustus*; Schmidt 1952, Formas 1972, Formas & Veloso 1982). Por esta razón algunos de sus caracteres diagnósticos merecen ser revisados, y otros nuevos podrían aportar información adicional a las definiciones específicas.

A nivel genérico *Telmatobufo* se basa exclusivamente en la morfología externa y la osteología de *T. bullocki* (Schmidt 1952, Lynch 1971, 1978); la carencia de información osteológica (los caracteres más adecuados para definir géneros de Leptodactylidae, Lynch 1971) para *T. australis* y *T. venustus* es un argumento que permite poner en duda las adscripciones genéricas de estas dos especies.

Las peculiares características larvarias de los tres taxa asignados al género *Telmatobufo* son atributos que dan buena consistencia a la definición del género (Lavilla 1988). Sin embargo, esta hipótesis de clasificación debería ser validada con otro tipo de caracteres (osteológicos y/o moleculares).

La recolección de especímenes adicionales (adultos y larvas) de las tres especies de *Telmatobufo* y la obtención de información morfológica, morfométrica, isoenzimática y molecular, son nuevos antecedentes que permiten estudiar la taxonomía y sistemática de este grupo de ranas endémicas del centro-sur de Chile.

En este trabajo se hace un análisis de la morfología externa, morfometría, y loci enzimáticos de las tres especies de *Telmatobufo* con el propósito de incorporar nuevos caracteres que permitan una mejor definición y diagnosis de las especies y al mismo tiempo se pueda establecer su grado de similitud morfométrica y genética.

El estudio osteológico comparado tiene por objeto redefinir el género *Telmatobufo* y verificar la correcta adscripción genérica de *T. australis* y *T. venustus*. Con el objeto de establecer la monofilia de *Telmatobufo* y las relaciones filogenéticas intragenéricas, se hace un análisis cladístico de las secuencias del ARN 12S mitocondrial, las frecuencias alélicas de 13 loci estructurales y 14 caracteres morfológicos (osteológicos, larvarios y morfológicos externos).

Con los patrones de distribución geográfica, los cladogramas y los hipotéticos tiempos de divergencia (generados al comparar las secuencias del ARN 12S mitocondrial) se propone una hipótesis narrativa sobre la historia evolutiva de *Telmatobufo* y su probable modo de especiación.

Finalmente y con el propósito de elucidar en forma definitiva la identidad de *T. venustus* (= *Bufo venustus* Philippi 1899) se publica por primera vez una lámina original de Philippi, perdida por casi un siglo, y que debía acompañar la descripción de *T. venustus* (= *Bufo venustus*) en el "Suplemento a los Batraquios chilenos descritos en la Historia Física i Política de Chile de Don Claudio Gay" (Philippi 1902) y que nunca salió a la luz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 38 especímenes de *T. australis* (seis machos, tres hembras, un adulto de sexo indeterminado, cuatro juveniles y 24 larvas), 22 de *T. bullocki* (nueve machos, dos hembras, un juvenil y 10 larvas), 29 de *T. venustus* (tres machos, tres hembras, tres juveniles y 20 larvas) y ocho de *C. caudiverbera* (tres machos, dos hembras, un juvenil y dos larvas). Además se examinaron tres lotes de huevos de *T. australis* y uno de *T. venustus* (Anexo 1). Los animales se midieron con un pie de metro de 0,1 mm de precisión. En los adultos se consideraron cinco variables morfométricas: (1) distancia hocico-cloaca, (2) largo de la cabeza (medida desde la articulación mandibular hasta el extremo del hocico), (3) ancho de la cabeza, (4) largo de la tibia, y (5) largo de la glándula parotoidea. Las mediciones se hicieron de acuerdo a Cei (1962, 1980) y Duellman (1970). En las larvas se consideraron ocho variables morfométricas: (1) largo total, (2) largo del cuerpo, (3) alto del cuerpo, (4) alto máximo de la aleta, (5) distancia narina-hocico, (6) distancia narina-ojo, (7) diámetro del ojo y (8) ancho del disco oral. Las medidas de los renacuajos se hicieron de acuerdo a Formas (1992) y los estados larvarios se determinaron según Gosner (1960).

El estudio osteológico está basado en el examen de dos esqueletos de ejemplares adultos de *T. australis* (IZUA 3164, 3170), dos de *T. venustus* (IZUA 3166, 3167), uno de *T. bullocki* (IZUA 3157), y tres de *C. caudiverbera* (IZUA 952-954). Los esqueletos de las especies de *Telmatobufo* se tiñeron con la técnica de Hollister (1934); en el caso de *C. caudiverbera* se usaron esqueletos secos sin diafanizar.

El análisis discriminante se hizo con el programa computacional STATGRAPH 4.2. Previo a este análisis multivariado se determinó la normalidad de los datos no transformados con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

La similitud morfométrica entre las especies se estableció con la técnica de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) descrito por Crisci & López (1983). El fenograma se construyó en base a la matriz de distancia de Mahalanobis (sumas de las diferencias al cuadrado de los centroides entre pares de especies) obtenida a partir del análisis discriminante.

En el estudio electroforético de las especies de *Telmatobufo* se emplearon los siguientes especímenes (su lugar de origen se indica entre paréntesis): *T. australis*, tres larvas, estados 31-33 y ocho adultos (Cordillera Pelada); *T. bullocki*, 14 larvas, estados 30-35 (Ruca-Pehuén); *T. venustus*, 15 larvas, estados 35-41 (Alto de Vilches). Adicionalmente y con fines comparativos se analizaron 15 larvas de *C. caudiverbera* provenientes de la ciudad de Valdivia. Ejemplares controles están depositados en la Colección de Anfibios del Instituto de Zoología de la Universidad Austral de Chile (IZUA).

Larvas y adultos, mantenidos a -76 °C, se homogenizaron con 10 mM Tris-Edta y 1mM b-mercaptoetanol, pH 7,5. Trozos de músculo (0,5 g) de los adultos de *T. australis* recibieron un tratamiento similar al de las larvas. Los homogenizados se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min, el sobrenadante se guardó a -76 °C. El homogenizado de cada espécimen se analizó electroforéticamente en geles horizontales de almidón (12,5%). En las tinciones enzimáticas se procedió según la metodología de Selander et al. (1971), Ayala et al. (1972) y Harris & Hopkinson (1976). Se analizaron las siguientes isoenzimas: malato deshidrogenasa NAD⁺ (MDH-1, MDH-2, Código Internacional de Enzimas [EC] 1.1.1.37), glutamato oxalacetato transaminasa (GOT-1, GOT-2, EC 2.6.1.1), sorbitol deshidrogenasa (SOR-2, EC 1.1.1.14), fosfoglucomutasa (PGM, EC 2.7.5.1), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD-1, GPD-2, EC 1.1.1.8), isocitrato deshidrogenasa (ICD, EC 1.1.1.42), esterasa (ES-1, EC 3.1.1.1), fosfoglucoisomerasa (GPI, EC

5.3.1.9), xantina deshidrogenasa (XDH, EC 1.1.1.204), y superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1). Los electromorfos (alelos) de cada locus fueron designados alfabéticamente de acuerdo al orden decreciente de movilidad en el gel.

La similitud genética entre las tres especies de *Telmatobufo* se representó por medio de un árbol de Wagner (Swofford & Selander 1989) el que no asume una tasa constante de evolución molecular. La construcción del fenograma se basó en una matriz de distancias genéticas de Rogers (1972) generada a partir de las frecuencias alélicas de cada especie. Como grupo comparativo se usó una población de *C. caudiverbera*. Para el cálculo de las frecuencias alélicas, distancias genéticas y construcción del árbol de Wagner se empleó el programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander 1989).

El ADN genómico de *T. australis*, *T. bullocki*, *T. venustus* y *C. caudiverbera* se aisló de tejido muscular mediante extracción fenólica estándar (Maniatis et al. 1982). La secuencia parcial del segmento del gen para ARN 12S mitocondrial se obtuvo a través de amplificación enzimática (PCR) (Saiki et al. 1988) utilizando los partidores 12S A-5 y 12S B-3 descritos por Palumbi (1996). La reacción de amplificación contuvo 100 ng de ADN genómico, 25 pmoles de cada partidador, 200 mM de cada dNTP, 90 mM de MgCl₂, 5,0 µl de tampón de reacción 10X y 0,2 unidades de polimerasa Amplitaq (Perkin-Elmer). La reacción se llevó a cabo en un termociclador durante 35 ciclos, constandingo cada uno de 45 seg de denaturación a 92 °C, 1 min de reasociación a 50 °C y 45 seg de extensión a 72 °C. La secuenciación de los segmentos amplificados se realizó sobre las dos hebras en la empresa Biosource US International. Se utilizó el principio de Sanger et al. (1977) usando dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia y un secuenciador automático.

Las hipótesis de relaciones filogenéticas entre las especies de *Telmatobufo* se basaron en datos provenientes de las secuencias parciales (380 pares de bases) para ARN 12S mitocondrial, 13 loci presuntos y 14 caracteres morfológicos (externos, larvarios y osteológicos). Las secuencias nucleotídicas se alinearon con el programa CLUSTAL W 1.6 (Thompson et al. 1994). Con el programa MEGA (Kumar et al. 1993) se determinó el número de bases compartidas, proporción de nucleótidos y tasa de sustitución. Las secuencias de las cinco especies están depositadas en GenBank bajo los siguientes números de acceso: AF144716 (*T. australis*), AF194533 (*T. bullocki*), AF194535 (*T. venustus*), AF194534 (*C. caudiverbera*) y AF145387 (*Telmatobius dankoi* Formas et al. 1999). En los análisis filogenéticos de las secuencias se usaron los principios de

máxima parsimonia y máxima probabilidad. En el primer análisis (máxima parsimonia) se empleó el programa PAUP* 4.0 (Swofford 1998) y no se consideraron los sitios no resueltos (N) ni las deleciones (-). El árbol de consenso se obtuvo después de hacer 100 iteraciones a través de "bootstrap", utilizándose sólo sitios filogenéticamente informativos. Para la búsqueda del árbol más parsimonioso se empleó la rutina "branch and bound". Para el análisis de máxima probabilidad se utilizó el programa PHYLIP 3.57c (Felsenstein 1995), opción DNAML. El árbol de consenso se obtuvo después de 250 iteraciones con las opciones BOOTSTRAP y CONSENSE. En ambos análisis se usaron como grupos externos *Caudiverbera caudiverbera* y *Telmatobius dankoi*. La elección de *C. caudiverbera* como grupo externo se fundamenta en la proposición de Lynch (1978) quién considera a *Telmatobufo* y *Caudiverbera* como grupos hermanos; la inclusión de *Telmatobius dankoi* como grupo externo adicional se justifica porque esta especie pertenece a otra tribu (*Telmatobiini*) de telmatobinos que tiene marcadas diferencias morfológicas y moleculares con *Telmatobufo* (Formas et al. 1999).

En el análisis filogenético de los loci isoenzimáticos se usó el programa PAUP* 4.0 (Swofford 1998) y no se consideraron aquellos loci monomórficos compartidos (no informativos). Se utilizó cada locus como carácter y la combinación de alelos como estados de carácter. En el caso de caracteres con varios estados, estos se consideraron como no ordenados. El árbol más parsimonioso se buscó con la rutina "branch and bound", después de 100 iteraciones mediante "bootstrap". Para este análisis se empleó a *C. caudiverbera* como grupo externo.

El análisis filogenético de los caracteres morfológicos se hizo con el programa PAUP* 4.0 (Swofford 1998). El árbol más parsimonioso se buscó del mismo modo que en el caso de los loci isoenzimáticos. Los caracteres morfológicos se polarizaron con relación a *C. caudiverbera*.

La nominación de las especies de anuros corresponde a la nomenclatura de Frost (1985).

OSTEOLOGÍA

Cráneo

El cráneo de las especies de *Telmatobufo* se muestra en la Fig. 1. En los tres taxa es bien osificado, y 1,3 veces más ancho que largo. Los frontoparietales son pareados, fusionados medialmente (*T. australis*, *T. bullocki*) o parcialmente suturados (*T. venustus*); no se sueldan con

los proóticos. Posteriormente son anchos, descansan sobre el otooccipital, y en los bordes laterales se observan los canales óseos de las arterias occipitales. Anteriormente los frontoparietales descansan sobre el esfenotmoides y tocan los prevómeres. El esfenotmoides es ancho, contacta dorsalmente con los nasales, a los que sobrepasa anteriormente. Los nasales son anchos y no tocan a los frontoparietales ni al proceso maxilar. Este no alcanza a contactar la pars facialis de la mandíbula en *T. australis* y *T. bullocki*; en *T. venustus* la toca levemente. En *T. bullocki* y *T. venustus* el borde interno de los nasales se superpone sobre el borde lateral del esfenotmoides, en *T. australis* sólo lo tocan.

El arco mandibular es completo. El premaxilar es estrecho con un proceso alar corto, dirigido posterodorsalmente; pars palatina delgada en *T. australis* y *T. venustus*, en *T. bullocki* es más expandida formando un corto proceso palatino. Dientes premaxilares puntiagudos; 15 en *T. australis*, 21 en *T. bullocki* y 16 en *T. venustus*. La pars facialis del premaxilar es moderadamente alta y no toca los palatinos (*T. australis* y *T. bullocki*) o los contacta levemente (*T. venustus*). Los dientes maxilares (61 *T. australis*, 65 *T. bullocki* y 55 *T. venustus*) no sobrepasan el proceso pterigoides de la mandíbula. Pars palatina del maxilar estrecha anteriormente, ensanchada al contactar con el pterigoides. El cuadradoyugal es de tamaño moderado y se articula ampliamente con la mandíbula. Otooccipital bien osificado con eminencias epióticas bajas. Crestas paróticas cortas y gruesas. Opérculo presente, columela ausente. Los cóndilos occipitales carecen de pedúnculos y se contactan levemente en el plano medio. La rama zigomática del occipital es larga y se curva anteriormente; la rama ótica es ancha, se desplaza medialmente en forma de una placa ancha que se superpone con la cresta parótica.

El paraesfenoides es trirradiado, con el proceso cultriforme delgado (*T. australis*, *T. venustus*) o grueso (*T. bullocki*), alcanzando el borde posterior de los prevómeres. Alas del paraesfenoides orientadas en ángulo recto en relación con el proceso cultriforme. Posteromedialmente el paraesfenoides está hendido. El pterigoides es macizo, su rama anterior articula con el proceso palatino de la maxila, la rama mediana descansa apenas sobre el paraesfenoides, pero ampliamente sobre el proótico. Este hueso carece de borde ventral. Los neopalatinos son casi horizontales en *T. australis* y levemente oblicuos en *T. bullocki* y *T. venustus*. Medialmente son delgados y contactan sólo con el esfenotmoides, lateralmente son más anchos y tocan la maxila. Los vómeres son pequeños (*T. australis*) o medianos (*T. bullocki*, *T. venustus*),

ampliamente separados, y con odontóforos prominentes entre las coanas. Estos son puntiagudos y su número es variable: cuatro en *T. australis*, nueve *T. bullocki* y seis *T. venustus*. Mandíbula con mentomeckeliano bien desarrollado y dentario y ángulo-esplénico de igual tamaño.

Columna vertebral

La columna vertebral de las especies de *Telmatobufo* se muestra en la Fig. 2. El atlas y el

axis están fusionados; la columna vertebral tiene ocho vértebras presacrales procélicas, pero sólo se ven siete elementos. Los cóndilos cervicales están estrechamente separados. Los arcos neurales no están imbricados completamente y las espinas neurales son bajas y prominentes. Vértebras II-IX llevan procesos transversos sin costillas. Los procesos transversos de las vértebras II y VI están orientados horizontalmente, los de las III, IV y V posteriormente y los de las VII y VIII anteriormente. Diapófisis sacral dilatada; articulación sacro-coccígea bicondilar. Coxis con prominen-

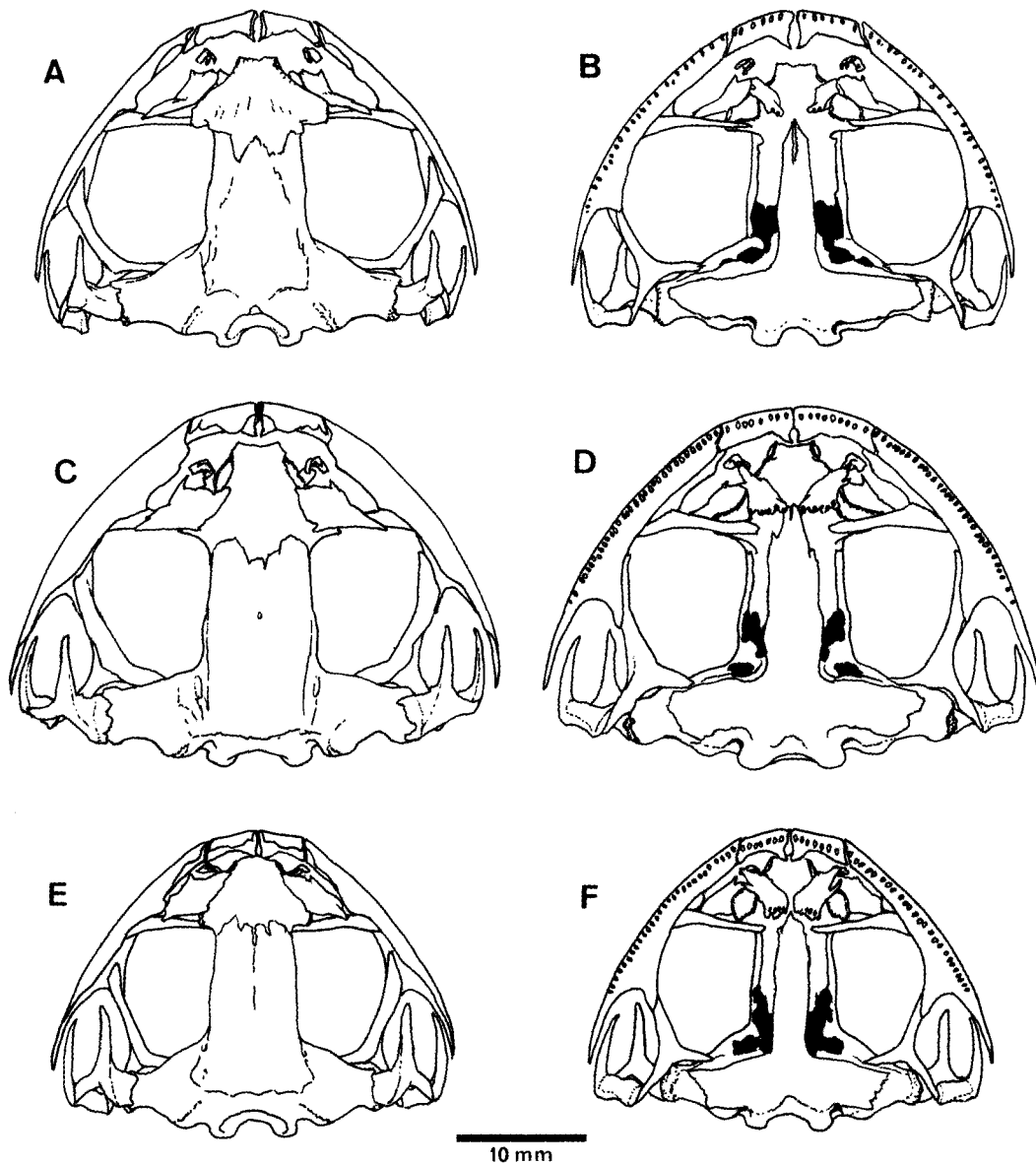


Fig. 1: Vista dorsal y ventral de los cráneos de *Telmatobufo australis* (A, B), *T. bullocki* (C, D) y *T. venustus* (E, F).

Dorsal and ventral view of skulls of *Telmatobufo australis* (A, B), *T. bullocki* (C, D), and *T. venustus* (E, F).

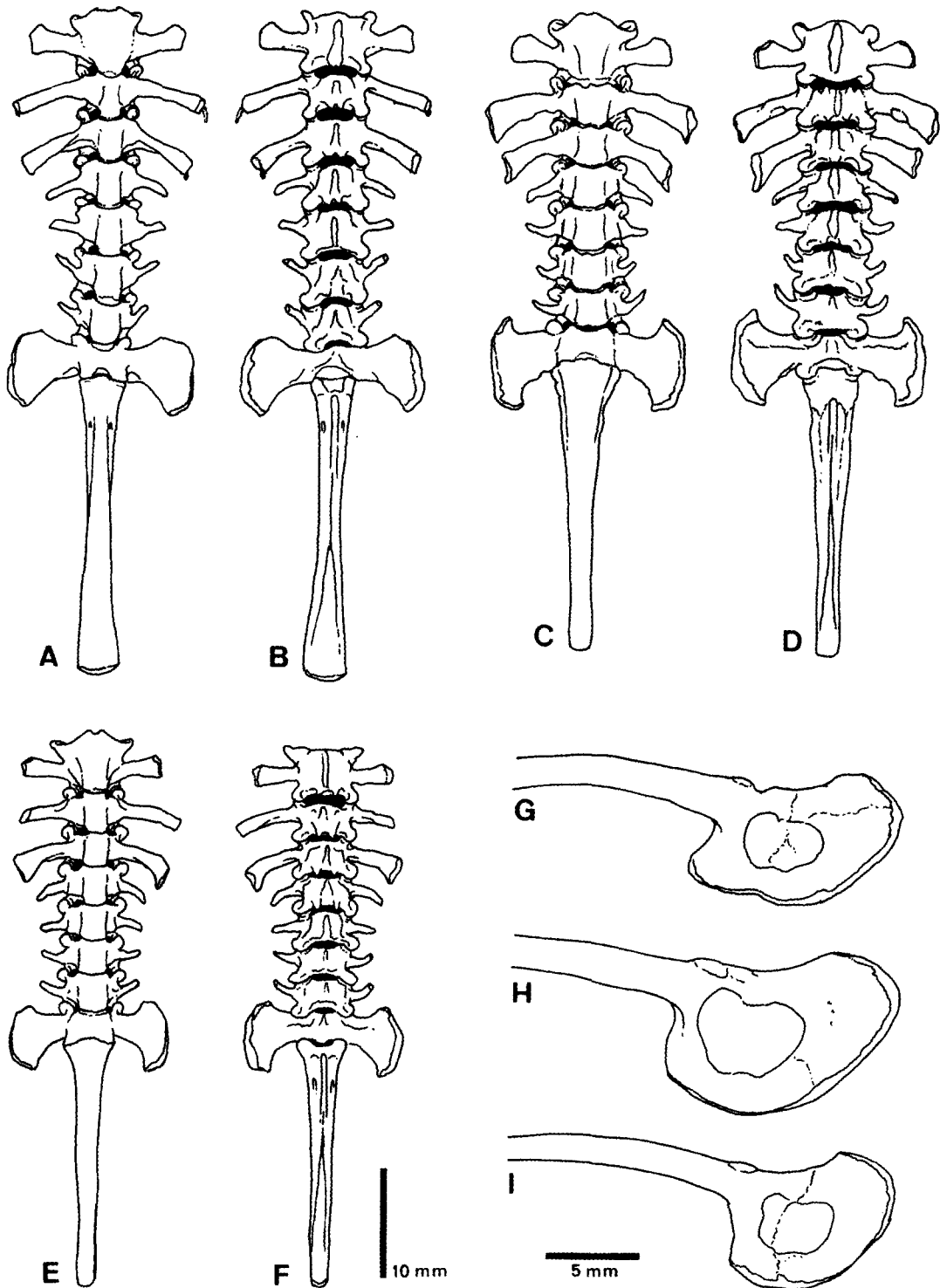


Fig. 2: Vista dorsal y ventral de la columna vertebral y acetábulo de *Telmatobufo australis* (A, B), *T. bullocki* (C, D) y *T. venustus* (E, F). Vista lateral del acetábulo de *T. australis* (G), *T. bullocki* (H) y *T. venustus* (I).

Dorsal and ventral view of the vertebral column of *Telmatobufo australis* (A, B), *T. bullocki* (C, D) and *T. venustus* (E, F). Lateral view of the acetabulum of *T. australis* (G), *T. bullocki* (H) and *T. venustus* (I).

cia antero-dorsal ensanchada, reminiscencia de forma vertebral en *T. bullocki* y *T. venustus*. Dos forámenes pequeños en las crestas laterales del coxis en *T. australis* y *T. venustus*. El extremo posterior del coxis aparece más ensanchado en *T. australis* que en *T. bullocki* y *T. venustus*.

Hyoides

La placa hyoídea cartilaginosa es más ancha que larga; seno hyoglosal en forma de U, procesos anterolaterales, posterolaterales y anteriores del hyal, delgados. Los procesos posteromediales son cortos y bien osificados con extremos distales carentes de cartílago.

Cintura pectoral

La cintura pectoral de las tres especies de *Telmatobufo* se muestra en la Fig. 3. Arcífera, fuertemente osificada. Las clavículas arqueadas no se tocan medialmente; fusionadas con la pars acromialis de la escápula. Los coracoides son gruesos, cóncavos en el borde anterior, rectos en el posterior. Escápula bicefálica con la pars acromialis y la pars glenoidea maciza. La supraescápula es ancha, en forma de paleta y fuertemente mineralizada. Sternum ancho, mineralizado y hendido posteriormente. Omosternum corto y expandido en su extremo anterior. Los cartílagos epicoracoides están muy mineralizados.

Cintura pélvica

Las cinturas pélvicas de las especies de *Telmatobufo* se muestran en la Fig. 2. Cresta ilíaca ausente. La protuberancia dorsal es baja, desplazada lateralmente, más gruesa en *T. bullocki*. Expansión acetabular ventral prominente; ángulo preacetabular aproximadamente de 90°. El acetábulo es redondeado, con bordes gruesos, excepto en el área dorsal. Isquio y pubis prominentes y mineralizados.

Apéndices

Los húmeros son macizos del mismo tamaño que la radioulna, crestas anteriores, laterales y posteriores bien desarrolladas. Fórmula de las falanges de la mano: 2-2-3-3; falanges terminales agudas con extremos redondeados. El prepollex es alargado y plano; en *T. bullocki* el borde externo es más grueso y sobresaliente. La fila proximal del

carpo con dos elementos óseos separados (radial, ulnar). La fila distal con cinco piezas óseas: Distal Carpal 4, Distal Carpal 3, Distal Carpal 2, Central 1 y Central 2. Fémur y tibio-fíbula de similar longitud. Tibial y fibular fusionados en sus extremos proximales y distales. La fórmula de la falange del pie es: 2-2-3-4-3. Extremos distales de las falanges puntiagudos. El tarso con tres elementos óseos de homología desconocida. Prehallux con cinco piezas en *T. venustus* y sólo dos discernibles en *T. australis* y *T. bullocki*.

TAXONOMÍA

Telmatobufo Schmidt

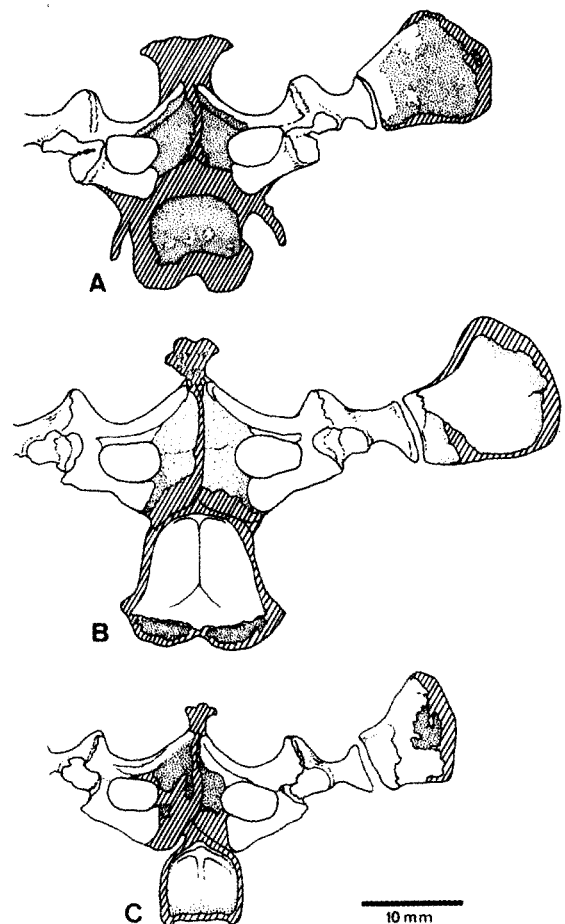


Fig. 3: Cintura pectoral de *Telmatobufo australis* (A), *T. bullocki* (B) y *T. venustus* (C).
Pectoral girdle of *Telmatobufo australis* (A), *T. bullocki* (B) and *T. venustus* (C).

- 1952 *Telmatobufo* Schmidt, Fieldiana Zoology 34: 11-15. Especie tipo *Telmatobufo bullocki*.
- 1962 *Telmatobufo* Cei, Batracios de Chile, Santiago, Universidad de Chile: 53.
- 1962 *Aruncus* Gallardo, Neotrópica 8: 45-48.
- 1965 *Aruncus* Gallardo, Papéis Avulsos 17: 77-87.
- 1971 *Aruncus* Lynch (*nomen dubium*), Miscellaneous Publication Museum of Natural History University of Kansas 53: 1-238.
- 1972 *Aruncus* Donoso-Barros, Boletín de la Sociedad Biología de Concepción XLIV: 109-116.
- 1978 *Telmatobufo* Lynch, Occasional Papers of the Museum of Natural History, The University of Kansas 72: 1-57.
- 1988 *Telmatobufo* Veloso & Navarro, Bolletino del Museo Regionale di Scienze Natural, (Torino) 6: 481-539.

Diagnosis: (1) Leptodactylidae de aspecto bufoniforme de tamaño mediano (60,4 - 83,0 mm; distancia hocico-cloaca), (2) glándulas parotoideas presentes, (3) glándula humeral desarrollada, (4) amplias membranas entre los ortijos (*T. australis* y *T. bullocki*), con menor desarrollo en *T. venustus*, (5) atlas y axis fusionados, (6) columela ausente, (7) xiphisternum ancho, (8) renacuajo del tipo arroyo de montaña (Orton 1953), con disco succionario oral, y cola ensanchada, (9) alelos a SOD y b XDH fijos en homocigosis.

Composición

Se han descrito tres especies: *T. australis* Formas, *T. bullocki* Schmidt y *T. venustus* (Philippi).

Distribución

Las ranas del género *Telmatobufo* se distribuyen en los bosques templados de *Nothofagus* del centro-sur de Chile (35° 30' - 41° 10' S), desde el nivel del mar hasta 1.280 m de altura sobre el nivel del mar; en la cordillera de la Costa y precordillera de los Andes (Fig. 4).

Telmatobufo australis Formas

- 1972 *Telmatobufo australis* Formas, Journal of Herpetology 6: 1-3. Holotipo: IZUA 934-A, Chiverías, Cordillera Pelada, Provincia de Valdivia, Chile.

- 1972 *Aruncus valdivianus* Donoso-Barros, Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, XLIV: 109.

- 1978 *Telmatobufo australis* Lynch, Occasional Papers of the Museum of Natural History The University of Kansas 72: 1.

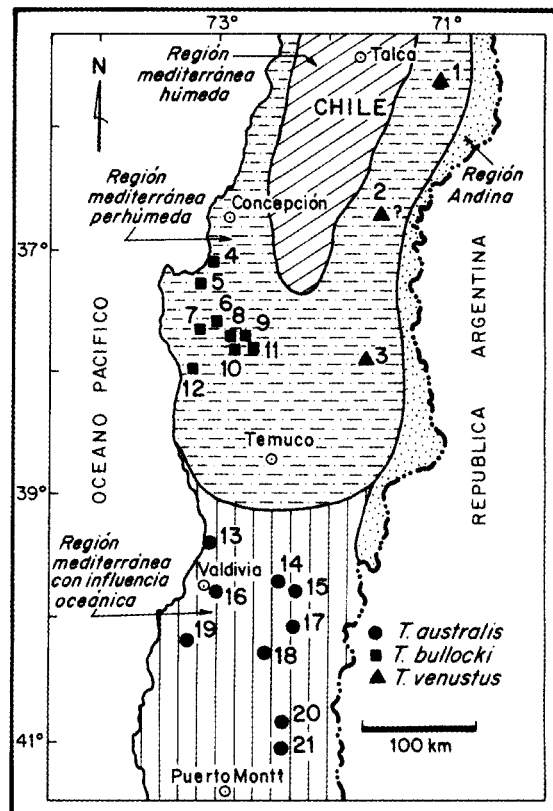


Fig. 4: Distribución geográfica de las especies de *Telmatobufo*. (1) Altos de Vilches, (2) *Cordillera de Chillán (lugar indeterminado), (3) **Ralco, (4) Lota, (5) Ramadillas, (6) Ruca-Pehuén, (7) Río Caramávida, (8) ***Estero Cabrerías, (9) ***Vanerías, (10) ***Vegas de Rucapillán, (11) Los Lleulles, (12) Elicura, (13) Mehuín, (14) Panguipulli, (15) Riñihue, (16) Llancahue, (17) Coñaripe, (18) Río Quimán, (19) Chiverías, (20) Piedras Negras, (21) Cerro Püschel. Según: *Philippi (1899), **Díaz et al. (1983), ***Péfaur (1971).

Geographical distribution of the *Telmatobufo* species. (1) Altos de Vilches, (2) *Cordillera de Chillán (undetermined place), (3) **Ralco, (4) Lota, (5) Ramadillas, (6) Ruca-Pehuén, (7) Caramavida river, (8) ***Estero Cabrerías, (9) ***Vanerías, (10) ***Vegas de Rucapillán, (11) Los Lleulles, (12) Elicura, (13) Mehuín, (14) Panguipulli, (15) Riñihue, (16) Llancahue, (17) Coñaripe, (18) Quimán river, (19) Chiverías, (20) Piedras Negras, (21) Cerro Püschel. According to: *Philippi (1899), **Díaz et al. (1983), ***Péfaur (1971).

Diagnosis: (1) En las hembras la máxima distancia hocico-cloaca alcanza 77,2 mm; en los machos 70,4 mm (Tabla 1), (2) longitud de la glándula parotoidea 1,7 veces el diámetro antero-posterior del ojo, (3) reborde cutáneo postfemoral ancho y grueso, (4) pliegue tarsal ancho y aplana-do, (5) piel dorsal suelta, (6) manchas supraoculares amarillo pálido, (7) dos bandas paravertebrales amarillentas sobre un fondo verde aceitunado, (8) vientre marmóreo con tonos violáceos, (9) alelo característico c GPD-2.

Observaciones ecológicas y distribución

La distribución geográfica de *T. australis* se muestra en la Fig. 4. Esta rana se encuentra en los faldeos occidentales (Mehuín, Provincia de Valdivia) y orientales (Cordillera Pelada, Provincia de Valdivia) de la cordillera de la Costa; faldeos occidentales de la cordillera de los Andes (Cerro Püschel, Provincia de Osorno) y áreas aledañas de los lagos Ranco, Riñihue (Provincia de Valdivia) y Rupanco (Provincia de Osorno). Altitudinalmente se distribuye desde el nivel del mar (Mehuín, Provincia de Valdivia) hasta los 1.020 m (Cordillera Pelada, Provincia de Valdivia). El rango distribucional de *T. australis* (39° 38' S - 40° 53' S) se ubica en la región Oceánica de Influencia Mediterránea (di Castri 1968) que se caracteriza por temperaturas anuales medias de 10,5 °C, humedades relativas de 84 %

y la pluviosidad fluctúa entre 2.000 - 2.500 mm. Los árboles más característicos de esta región son: *Nothofagus dombeyi* (Mirbel) Oersted (Fagaceae), *N. obliqua* (Mirbel) Oersted (Fagaceae), *Drymis winteri* J.R. et G. Fonster (Winteraceae) y *Embothrium coccineum* J.R. et G. Forsted (Proteaceae). En el sotobosque destacan las plantas del género *Chusquea* (Gramineae). Los adultos se han recolectado bajo troncos podridos entre los meses de junio y agosto y también en pequeños arroyos de montaña (200 - 450 mm de profundidad, 1.000 - 2.500 mm ancho, 12-15 °C) entre los meses de septiembre y comienzos de octubre. Las larvas se han capturado a lo largo de todo el año exclusivamente en arroyos de montaña. Los siguientes anfibios han sido recolectados en el área de distribución de *T. australis*: *Eupsophus emiliopugini* Formas, 1989, *E. vertebralis* (Grandison, 1962), *E. roseus* (Duméril & Bibron, 1841), *E. migueli* Formas, 1978, *Batrachyla leptopus* Bell, 1843, *B. taeniata* (Girard, 1854), *Pleurodema thaul* (Lesson, 1826), *Alsodes* sp. Bell, 1843, *Rhinoderma darwini* Duméril & Bibron, 1841, *Insuetophrynus acarpicus* Barrio, 1970 y *Bufo variegatus* (Günther, 1870).

Reproducción y desarrollo

Las características reproductivas de *T. australis* y su distribución a través del año se indican en la Tabla 2. La espinulación nupcial ha sido descrita

TABLA 1

Medidas (mm) de machos y hembras adultos de las especies de *Telmatobufo*. Media, desviación típica y rangos (paréntesis)

Measurements (mm) of adult males and females of *Telmatobufo*. Means, standard deviation, and ranges (parenthesis)

Carácter	<i>T. australis</i>		<i>T. bullocki</i>		<i>T. venustus</i>	
	6 machos	4 hembras	11 machos	1 hembra	4 machos	1 hembra
Distancia hocico-cloaca	63,4 ± 3,5 (60,4-70,4)	71,9 ± 4,4 (67,4 -77,2)	71,6 ± 8,1 (61,8-83,0)	70,1	62,8 ± 2,2 (60,4-65,1)	69,2
Largo cabeza	21,7 ± 1,1 (20,2-23,4)	23,5 ± 1,3 (22,1-24,7)	24,9 ± 2,8 (22,7-28,0)	26,5	19,5 ± 1,5 (17,5-21,0)	21,6
Ancho cabeza	24,4 ± 2,8 (20,6-28,1)	26,5 ± 1,6 (24,7-27,9)	28,3 ± 2,2 (23,5-30,0)	29,1	23,3 ± 0,9 (22,0-24,1)	25,0
Largo tibia	31,2 ± 1,5 (29,4-33,5)	30,7 ± 3,6 (28,5-36,1)	30,0 ± 3,2 (27,0-38,0)	36,6	25,9 ± 0,9 (24,7-26,8)	32,2
Largo parótida	9,6 ± 1,2 (8,4-11,8)	9,9 ± 1,0 (8,6-11,2)	9,7 ± 1,7 (8,2-12,4)	8,5	6,3 ± 0,9 (5,4-7,2)	6,3

por Formas & Pugin (1979). Sonidos de alta frecuencia, y emitidos desde el borde de un arroyo (localidad típica, Chiverías), han sido interpretados como canto de advertencia (octubre). Al final de la metamorfosis (estado 40) los individuos alcanzan un tamaño de 35,6 mm (distancia hoco-cloaca).

El espermatozoide fue descrito por Pugin & Garrido (1981) y tiene una cabeza cilíndrica de 120 μm de longitud, con ondulaciones longitudinales. La cola está compuesta de dos flagelos cortos de 115 μm de largo.

Cromosomas

Telmatobufo australis tiene un cariotipo constituido por 26 cromosomas y su número fundamental es 52 (Formas & Pugin 1979).

Telmatobufo bullocki Schmidt

1952 *Telmatobufo bullocki* Schmidt, Fieldiana Zoology, 34: 11-15. CNHM 23842, Cerros de Nahuelbuta, Provincia de Malleco, Chile.

1972 *Aruncus venustus* Donoso-Barros, Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción 44: 109.

1978 *Telmatobufo venustus* Lynch, Occasional Papers Museum of Natural History The University of Kansas 72: 1.

1982 *Telmatobufo bullocki* Formas & Veloso, Proceedings of the Biological Society of Washington 95: 688.

Diagnosis: (1) En las hembras la máxima distancia hoco-cloaca alcanza 70,1 mm; en los machos 83,0 mm (Tabla 1), (2) longitud de la glándula parotoidea 1,3 veces el diámetro antero-posterior del ojo, (3)

reborde cutáneo postfemoral desarrollado, (4) pliegue tarsal grueso, (5) piel dorsal adherida al cuerpo, (6) banda interocular amarilla, (7) dorso y extremidades café con filigranas amarillas entre los gránulos dorsales, (8) vientre café amarillento con manchas irregulares oscuras.

Observaciones ecológicas y distribución

La distribución geográfica de *T. bullocki* se indica en la Fig. 4. Esta especie está restringida a la cordillera de Nahuelbuta (cordillera de la Costa, 37°05' - 38° S). Altitudinalmente se ubica entre los 10 m (Elicura, Lago Lanalhue, Provincia de Arauco) y los 800 m (Los Lleulles, Provincia de Malleco; Ruca-Pehuén, Provincia de Arauco). El restringido rango distribucional de esta especie se ubica en la Región Mediterránea Húmeda (di Castri 1968). Machos adultos fueron capturados bajo troncos caídos [*Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch (Araucariaceae)] y también en arroyos (agosto) (Péfaur 1971). Nosotros hemos recolectado un juvenil (IZUA 1563) bajo un tronco podrido (Ramadillas, Provincia de Arauco) durante el mes de noviembre, un macho adulto (IZUA 3157) en un arroyo de montaña (Rucapehuén, Provincia de Arauco) y dos adultos (IZUA 1820, 1821) a orillas del río Caramavida (Provincia de Arauco) durante el mes de noviembre. Duellman (comunicación personal) colectó dos especímenes (serie de campo KU 45300 - 45301) bajo las piedras de un riachuelo (Arroyo Los Lleulles, Provincia de Malleco). Schmidt (1952) reportó en el estómago del paratipo (CNHM 31618) la presencia de una larva de coleóptero, fragmentos de grillos, arácnidos y una considerable masa de material vegetal. Renacuajos han sido capturados en un arroyo de montaña (Rucapehuén, Provincia de Arauco) en los meses de noviembre y enero (Formas 1988). Los siguientes anfibios se han recolectado en el área de

TABLA 2

Características reproductivas de las especies de *Telmatobufo*

Reproductive characteristics of *Telmatobufo* species

	Espinulación sexual	Canto	Oocitos			Presencia larvas		Autor (es)
			Color	Diámetro (mm)	Nº	Presencia		
<i>T. australis</i>	M, A, O	O	Amarillo pálido	8,4 ± 0,43	99,3 ± 6,5	O	E-D	Formas & Pugin (1979), este trabajo
<i>T. bullocki</i>	E, F, A	----	Amarillo pálido	2,4	112	E	D-E	Formas (1988), Péfaur (1971), este trabajo
<i>T. venustus</i>	E	----	Amarillo pálido	4,7 ± 0,24	111	E	E	Díaz et al. (1983), este trabajo

E (enero), F (febrero), M (marzo), A (agosto), O (octubre), D (diciembre)



Fig. 5: Lámina original de Philippi mostrando una vista dorsal y ventral de *Telmatobufo venustus* (= *Bufo venustus*) y otras especies de *Bufo* (X 0.62) (B). Macho adulto de *T. venustus* (X 1.23) (A).

Philippi's original plate showing a dorsal and ventral view of *Telmatobufo venustus* (= *Bufo venustus*) and other *Bufo* species (X 0.62) (B). Adult male of *T. venustus* (X 1.23) (A).

distribución de *T. bullocki*: *Rhinoderma darwini*, *R. rufum* (Philippi, 1902), *Alsodes barrioi* Veloso, Díaz, Iturra & Penna, 1981, *A. vanzolinii* (Donoso-Barros, 1974), *Eupsophus roseus*, *E. contulmoensis* Ortiz, Ibarra-Vidal & Formas, 1989, *Batrachyla taeniata*, *B. leptopus*, *Hylorina sylvatica* Bell, 1843, *Pleurodema thaul* y *Bufo rubropunctatus* Guichenot, 1843.

Reproducción y desarrollo

Las características reproductivas y su distribución a lo largo del año se indican en la Tabla 2. La espinulación nupcial fue reportada por Péfaur (1971).

Cromosomas

Telmatobufo bullocki tiene un cariotipo constituido por 26 cromosomas y su número fundamental es 52 (Venegas 1975).

Telmatobufo venustus (Philippi) (Fig. 5A)

1899 *Bufo venustus* Philippi, Anales de la Universidad de Chile 104: 723. Holotipo MZUC 205051. Cordillera de Chillán, Provincia de Ñuble, Chile.

1982 *Telmatobufo venustus* Formas & Veloso, Proceedings of the Biological Society of Washington 95: 688.

Diagnosis. (1) En las hembras la máxima distancia hocico-cloaca alcanza 69,2 mm; en los machos 65,1 mm (Tabla 1), (2) longitud de la glándula parotoidea 0,8 veces el diámetro anteroposterior del ojo, (3) reborde cutáneo

postfemoral ausente, (4) pliegue tarsal reducido, (5) piel dorsal adherida al cuerpo, (6) manchas supraoculares amarillo-anaranjado, (7) dorso negro con manchas irregulares amarillas, rojas y anaranjadas, (8) vientre negro con dos manchas axilares amarillentas, (9) alelo c GOT-1 fijo en homocigosis.

Observaciones ecológicas y distribución

La distribución geográfica de *T. venustus* se indica en la Fig. 4. Esta especie se ha encontrado solamente en los faldeos occidentales de la Cordillera de los Andes (entre 600 m y 1.280 m) y longitudinalmente es la que tiene el rango distribucional más amplio (35° 28' - 38,5° S). Este se ubica en la región Mediterránea Perhúmeda (8,5 °C, humedad relativa 75 %, pluviosidad 2.000 mm, di Castri 1968). En los lugares donde se han colectado especímenes de *T. venustus* se han observado árboles de los géneros *Nothofagus* (Fagaceae), *Drimys* (Winteraceae), *Aextoxicon* (Aextoxicaceae) y *Laurelia* (Monimiaceae). Las larvas se han colectado en arroyos de montaña. El ejemplar descrito por Formas & Veloso (1982) fue capturado bajo un tronco de *Nothofagus* en el mes de septiembre. Adultos y larvas fueron recolectados entre piedras, a la orilla del río Lircay (Altos de Vilches), durante el mes de enero. Díaz et al. (1983) describieron la presencia de larvas en la localidad de Ralco (Provincia de Bío-Bío) durante el mes de mayo.

Reproducción y desarrollo

Las características reproductivas y su distribución a través del año se indican en la Tabla 2. La

TABLA 3

Medidas (mm) de las larvas de *Telmatobufo venustus*. Promedio y desviación típica

Measurements (mm) of the tadpoles of *Telmatobufo venustus*. Means and standard deviation

	Estado 27 n = 1	Estado 28 n = 1	Estado 32 n = 2	Estado 35 n = 2	Estado 36 n = 5	Estado 37 n = 7	Estado 39 n = 1
Longitud total	45,0	51,0	70,0-72,0	73,0-86,0	76,8±3,49	85,0±2,94	93,0
Largo del cuerpo	21,0	23,0	31,0-32,0	33,0-38,0	35,2±1,30	38,6±1,39	43,0
Alto del cuerpo	7,7	8,2	12,7-13,6	12,0-15,6	14,4±1,33	15,3±1,05	17,8
Alto de la aleta	9,0	10,5	13,0-15,5	13,5-15,3	14,8±1,07	16,2±1,38	19,5
Distancia hocico - ojo	6,7	9,0	11,7-13,3	12,8-13,3	13,7±0,89	14,3±0,77	15,8
Distancia hocico - narina	3,8	5,0	6,7-8,2	7,8-8,0	8,2±0,97	8,6±0,68	9,5
Diámetro del ojo	1,7	2,0	2,5-3,0	2,3-2,6	2,6±0,16	2,8±0,06	3,0
Ancho del disco oral	11,8	13,8	17,8-18,3	19,1-20,6	20,7±0,59	21,8±0,68	23,0

espinulación sexual de *T. venustus* consiste en un grupo de espinas córneas negras ubicadas en el dorso del pulgar, y dos series de espinas más pequeñas localizadas en el margen inferior de la mandíbula. Los machos con espinas nupciales se recolectaron en el agua en el mes de enero. Larvas en diferentes estados de desarrollo (Tabla 3) fueron capturadas en enero.

Cromosomas

Telmatobufo venustus posee un cariotipo de 26 cromosomas y su número fundamental es 52 (Cuevas¹).

Confirmación de la identidad taxonómica de T. venustus

Uno de los problemas taxonómicos más complejos de la herpetología chilena es la identificación de las formas descritas por Philippi (1902) en el "Suplemento a los Batraquios Chilenos descritos en la Historia Física i Política de Chile de don Claudio Gay". La probable pérdida del material tipológico, la muy breve e imprecisa descripción de los taxa y las inéditas láminas que debían acompañar al libro, son las principales causas que hacen difícil el reconocimiento de las innumerables formas de Philippi y la confirmación de su validez taxonómica. Cei (1958) encuentra y comenta diez de las probables catorce láminas originales de Philippi; sin embargo, algunas de ellas están aún extraviadas. Casi un siglo después de la publicación del "Suplemento" se ha encontrado en el Archivo Philippi del Museo Histórico y Antropológico "Mauricio Van de Maele", de la Universidad Austral de Chile una de las láminas extraviadas (Fig. 5B) que está catalogada con el número de inventario 3526-25; los dibujos muestran una vista dorsal (1) y una ventral (2) de *Telmatobufo venustus* (= *Bufo venustus*). Las imágenes están impresas en papel satinado de pulpa mecánica y está hecha en colores amarillo, rojo y negro. El volumen de las figuras está intensificado con tinta negra soluble al agua. El tamaño de la lámina es 274 x 217 mm. y su estado de conservación es excelente, siendo los colores naturales y vivaces. Para el propósito de este trabajo se analizarán sólo los animales rotulados como *Bufo venustus*; las otras especies se comentarán en un

trabajo posterior. *Bufo venustus* fue descrito por Philippi en 1899 y redescrito por el mismo autor en 1902. Formas & Veloso (1982) al analizar el descolorido holotipo de *Bufo venustus* y compararlo con un ejemplar (DBG 0784) proveniente de Altos de Vilches (Provincia de Talca, 1.280 m), concluyeron que este último podía ser adscrito a la especie de Philippi, pero debería transferirse al género *Telmatobufo* con el nombre de *Telmatobufo venustus* (Philippi 1899). La falta de coloración del holotipo, debido probablemente a su permanencia en alcohol por cerca de cien años, dejó siempre la duda si el material que dibujó y describió Philippi tenía correspondencia con el material colectado en Altos de Vilches, y con el que se hizo la redesccripción de la especie (Formas & Veloso 1982). La recuperación de la lámina de Philippi, que se publica aquí por primera vez (Fig. 5B), y su comparación con material coincidente en coloración y morfología al colectado nuevamente en Altos de Vilches (Fig. 5A) no dejan ninguna duda acerca de la real identidad de *Telmatobufo venustus* (= *Bufo venustus*). El hallazgo de la lámina y su comparación con especímenes vivos permite aclarar definitivamente

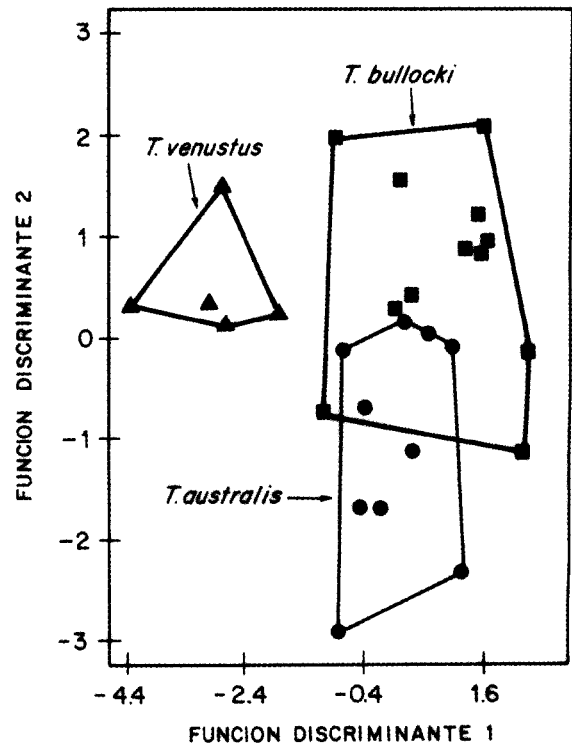


Fig. 6: Análisis discriminante de los caracteres morfométricos de las especies de *Telmatobufo*. Discriminant analysis of the morphometric characters of the *Telmatobufo* species.

¹ CUEVAS CC (1999) Comparación cromosómica en los anuros del género *Telmatobufo*. Resúmenes XLII Reunión Sociedad de Biología de Chile, noviembre 1999, Pucón, Chile: 185.

al menos una de las problemáticas formas del naturalista alemán.

CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECÍMENES ADULTOS DE LAS ESPECIES *TELMATOBUFO*

1. Parótida mayor que el diámetro anteroposterior del ojo 2
Parótida menor que el diámetro anteroposterior del ojo *T. venustus*
2. Pliegue tarsal ancho y aplanado; dos franjas paravertebrales café amarillentas
..... *T. australis*
Pliegue tarsal grueso y angosto; franja interocular amarilla *T. bullocki*

MORFOMETRÍA

Los resultados de los análisis univariados de los caracteres morfométricos de los adultos de las tres especies de *Telmatobufo* se muestran en la Tabla 1. El análisis discriminante (el que incluyó conjuntamente individuos de ambos sexos por existir pocas hembras disponibles) muestra la distinción de *T. venustus* en relación con *T. australis* y *T. bullocki* (Fig. 6). El programa usado genera una matriz de clasificación que entrega el número de asignaciones "correctas" e "incorrectas" de los individuos a su propia especie. La matriz de clasificación asignó correctamente los cinco especímenes de *T. venustus* a la especie correcta; en el caso de *T. australis* el 70 % de los especímenes examinados (10) fue clasificado correctamente y en *T. bullocki* 83 % (12 animales examinados). Los resultados de los análisis univariados de larvas de las tres especies de

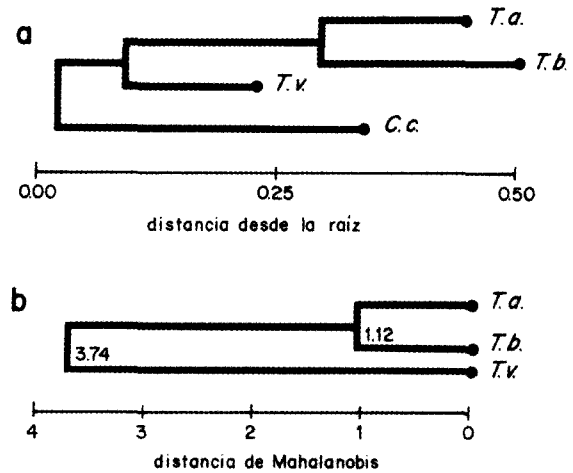


Fig. 7: Fenogramas que representan la similitud genética (a) y la similitud morfométrica (b) entre las especies de *Telmatobufo*. *T. a.* (*Telmatobufo australis*), *T. b.* (*T. bullocki*), *T. v.* (*T. venustus*) y *C. c.* (*Caudiverbera caudiverbera*).

Phenograms representing the genetic similarity (a) and the morphometric similarity (b) among the *Telmatobufo* species. *T. a.* (*Telmatobufo australis*), *T. b.* (*T. bullocki*), *T. v.* (*T. venustus*) and *C. c.* (*Caudiverbera caudiverbera*).

Telmatobufo, en diferentes estados de desarrollo se muestran en las Tablas 3 y 4.

ANÁLISIS DE SIMILITUDES

Similitud morfométrica

A partir del análisis discriminante se obtuvieron distancias de Mahalanobis y con ellas se constru-

TABLA 4

Medidas (mm) de las larvas de *Telmatobufo australis* y *T. bullocki*. Media y desviación típica

Measurements (mm) of the tadpoles of *Telmatobufo australis* and *T. bullocki*. Means and standard deviation

	<i>Telmatobufo australis</i>					<i>T. bullocki</i>		
	Estado 29 n=1	Estado 31 n=3	Estado 32 n=1	Estado 34 n=3	Estado 35 n=1	Estado 37 n=4	Estado 41 n=1	Estado 26 n=3
Longitud total	38,0	53,0 ± 1,52	56,0	51,0 ± 2,64	59,0	73,3 ± 4,99	72,0	35,3 ± 2,08
Largo del cuerpo	16,0	24,3 ± 1,52	25,0	21,3 ± 1,52	26,0	33,5 ± 3,10	32,0	15,5 ± 0,86
Alto del cuerpo	7,0	9,8 ± 0,15	8,3	7,7 ± 0,36	9,2	13,1 ± 1,73	12,0	5,7 ± 0,25
Alto de la aleta	6,7	9,9 ± 0,40	9,0	9,8 ± 1,55	9,3	13,9 ± 4,17	12,2	7,8 ± 0,05
Distancia hocico-ojo	5,5	7,4 ± 0,20	8,3	7,5 ± 0,56	7,3	10,4 ± 1,69	11,2	4,7 ± 0,15
Distancia hocico-narina	3,0	4,2 ± 0,25	4,3	4,0 ± 0,92	4,2	5,8 ± 0,78	6,7	2,8 ± 0,05
Diámetro del ojo	1,4	1,8 ± 0,10	1,8	1,9 ± 0,11	2,0	2,7 ± 0,14	2,5	1,3 ± 0,00
Ancho del disco oral	8,8	11,9 ± 0,20	11,6	10,4 ± 0,75	12,5	15,9 ± 2,71	15,7	7,1 ± 0,36

yó una matriz de distancias morfométricas que permitió generar un fenograma (Fig. 7b) por el método de pares de grupos no ponderados (UPGMA). El resultado muestra que *T. australis* y *T. bullocki* son morfométricamente más similares entre sí, mientras que *T. venustus* aparece como un grupo separado.

Similitud genética

En *T. australis*, *T. bullocki*, *T. venustus* y *C. caudiverbera* (especie comparativa usada para construir el árbol de Wagner) se examinaron 10 alozimas que codificaron para 13 loci presuntos. Las frecuencias alélicas para 12 loci variables,

TABLA 5

Frecuencias alélicas, polimorfismo (%), heterocigosidad (observada y esperada) y promedio de alelos por locus de doce loci variables de *Telmatobufo australis* (1), *T. bullocki* (2), *T. venustus* (3) y *C. caudiverbera* (4)

Allele frequencies, polymorphism (%), heterozygosity (observed and expected), and mean alleles per locus at twelve variable loci of *Telmatobufo australis* (1), *T. bullocki* (2), *T. venustus* (3) and *C. caudiverbera* (4)

Locus	Alelo	Especie			
		1	2	3	4
MDH-1	a	0,182	0,000	1,000	1,000
	b	0,818	1,000	0,000	0,000
MDH-2	a	0,000	0,000	1,000	1,000
	b	1,000	1,000	0,000	0,000
ICD	a	1,000	0,643	0,000	0,000
	b	0,000	0,000	1,000	1,000
	c	0,000	0,357	0,000	0,000
GPD-1	a	0,273	0,000	0,000	0,000
	b	0,727	1,000	1,000	1,000
GPD-2	a	0,000	1,000	0,000	1,000
	b	0,091	0,000	1,000	0,000
	c	0,909	0,000	0,000	0,000
XDH	a	0,000	0,000	0,000	1,000
	b	1,000	1,000	1,000	0,000
SOD	a	1,000	1,000	1,000	0,000
	b	0,000	0,000	0,000	1,000
SOR-2	a	0,000	1,000	0,000	1,000
	b	0,091	0,000	0,000	0,000
	c	0,909	0,000	1,000	0,000
GPI	a	0,000	0,000	0,000	1,000
	b	0,091	1,000	0,000	0,000
	c	0,864	0,000	1,000	0,000
	d	0,045	0,000	0,000	0,000
PGM	a	0,278	0,000	0,000	0,000
	b	0,722	0,000	0,067	0,000
	c	0,000	1,000	0,900	0,000
	d	0,000	0,000	0,033	1,000
GOT-1	a	0,000	0,000	0,000	1,000
	b	1,000	1,000	0,000	0,000
	c	0,000	0,000	1,000	0,000
ES-1	a	1,000	1,000	0,967	1,000
	b	0,000	0,000	0,033	0,000
Polimorfismo (%)		46,2	7,7	7,7	0,0
Heterocigosidad observada		0,078	0,000	0,021	0,000
Heterocigosidad esperada		0,135	0,037	0,020	0,000
Promedio de alelos por locus		1,5	1,1	1,2	1,0

El locus GOT-2 está fijo para el mismo alelo en todas las especies

TABLA 6

Matriz de identidad genética de Nei (1972) (sobre la diagonal) y distancia genética de Rogers (1972) (bajo la diagonal) de *Telmatobufo australis* (1), *T. bullocki* (2), *T. venustus* (3) y *Caudiverbera caudiverbera* (4)

Matrix of genetic identity (Nei 1972) (above the diagonal) and genetic distance (Rogers 1972) (below the diagonal) for *Telmatobufo australis* (1), *T. bullocki* (2), *T. venustus* (3) and *Caudiverbera caudiverbera* (4)

Especie	1	2	3	4
<i>Telmatobufo australis</i>	———	0,695	0,565	0,240
<i>Telmatobufo bullocki</i>	0,347	———	0,464	0,392
<i>Telmatobufo venustus</i>	0,466	0,538	———	0,466
<i>Caudiverbera caudiverbera</i>	0,757	0,606	0,536	———

<i>Telmatobufo australis</i>	GCTAGTCGTA	A--ACCCTTT	AACTACCCAC	ACAACCGCCN	GGGAA-CTAC	AAGCCCAAGC	60
<i>Telmatobufo bullocki</i>	---	---T---	TA.....AA.....	
<i>Telmatobufo venustus</i>	C.....	---T---	TA.....A	
<i>Telmatobius dankoi</i>	TT-AGT.AC	GC-G.A.GAC	.C..TGAA..	CA..AGTT.T	A...G-T.T.	T..AGA.GCT	
<i>Caudiverbera caudiverbera</i>	.CA.T..A..	GTT..A..C.	.GT.T.TT-	TTT..T..TA	AATCCG.CTT	CT.A.T.G.T	
<i>Telmatobufo australis</i>	TTTAAACC-C	AAAGGACTTG	ACGG-TGCCC	CAACCCACCT	AGAGGAGCCT	GTCCTTTAAT	120
<i>Telmatobufo bullocki</i>-	
<i>Telmatobufo venustus</i>-	
<i>Telmatobius dankoi</i>	...GT.AGG.	.T...G...	...TCT...	..TT.TTAT.A.T..	
<i>Caudiverbera caudiverbera</i>	..C.T.AA--	-T..TCT..C	GT.--TTAC	T.TATT.AAA	..T.T...CC	A..TC..CC	
<i>Telmatobufo australis</i>	CGATGATCCA	CGTTAAACCT	CACCACTTCT	GGCCCATCCG	CCTGTATACC	TCCGTCGTCA	180
<i>Telmatobufo bullocki</i>T....G..A.....	
<i>Telmatobufo venustus</i>A.....G..	
<i>Telmatobius dankoi</i>	...ANC..C	C...T.NT..	...T..T..	A.T.T...T.	
<i>Caudiverbera caudiverbera</i>	ATT.C..TTC	TC..GCGT..	TGA.CT.A..	TGTTTGCTG.	.GC.C..TA.	A.T.A.T.A.	
<i>Telmatobufo australis</i>	GCTTACC GCG	TGAGCGA--T	TTAGTGAGCC	C-AATGCCCA	AACCCGCCAA	CACGTCAGGT	240
<i>Telmatobufo bullocki</i>--C..	T.....T.	
<i>Telmatobufo venustus</i>A---T.....T.	..NNNN..	
<i>Telmatobius dankoi</i>T..A.ATC	T.....G..	
<i>Caudiverbera caudiverbera</i>	..A...G.T.A	C...GT.A-G	C.GAC..CGG	A-GG.ATA..	GGCT.ATAG.	CTAAAA.T.G	
<i>Telmatobufo australis</i>	CAAGGTGCAG	CAAATGAAGT	GGGAAGTG-A	TGGGCTACAT	TTTCTATTAT	AGAATATACG	300
<i>Telmatobufo bullocki</i>A	
<i>Telmatobufo venustus</i>	.G.....A.NN.G..	..NNN.G..	
<i>Telmatobius dankoi</i>G..A.	...TGA.C.T.TCA..A	...TA.CT..	
<i>Caudiverbera caudiverbera</i>	TG...TA.A	.GGGG.TTA.	C..TTA.AG.	CA....C.TC	.AGGGGA..	G.GG.ACC.T	
<i>Telmatobufo australis</i>	AAAGACA AAC	-ATGAAACTT	TGT-CGGAAG	GTGGATTAG	AAAT		344
<i>Telmatobufo bullocki</i>	.G.....T-A.G.TAG.		
<i>Telmatobufo venustus</i>	.NG...GGGT	-N.....	N..C...NG.	TG.....	..G.		
<i>Telmatobius dankoi</i>	..T...TTTT	T...G.C.	A..CAGA..CC..		
<i>Caudiverbera caudiverbera</i>	C...T.CTTT	GT.T..G...	..CCGTAGTT	..C...CG.	..GG.		

Fig. 8: Alineamiento de secuencias para el segmento de 344 pares de bases (pb) del ADN 12S mitocondrial de *Telmatobufo australis*, *T. bullocki*, *T. venustus*, *Telmatobius dankoi* y *Caudiverbera caudiverbera*. Los nucleótidos idénticos se indican con un punto (*), las inserciones/delecciones con un guión (-) y los sitios no resueltos con N. El segmento corresponde a la secuencia definida entre los 2510 y 2900 pb para *Xenopus laevis* (Roe et al. 1985).

Sequence alignment for the segment of 344 bp of 12S mtDNA of *Telmatobufo australis*, *T. bullocki*, *T. venustus*, *Telmatobius dankoi* and *Caudiverbera caudiverbera*. A period denotes nucleotide identity (*), insertions/deletions are indicated by a hyphen (-), and the unsolved sites with N. This segment corresponds to the mitochondrial sequence defined by bases 2510 and 2900 in *Xenopus laevis* (Roe et al. 1985).

TABLA 7

Caracteres isoenzimáticos usados en el análisis cladístico de las especies de *Telmatobufo*

Isoenzymatic characters used in the cladistic analysis of *Telmatobufo* species

Carácter	Especie			
	<i>C. caudiverbera</i>	<i>T. australis</i>	<i>T. bullocki</i>	<i>T. venustus</i>
1	0	1	1	0
2	0	1	1	0
3	0	1	1	0
4	0	1	0	0
5	0	2	0	1
6	0	1	1	1
7	0	1	1	1
8	0	1	0	1
9	0	1	2	1
10	0	2	1	1
11	0	2	2	1
12	0	0	0	0

1. MDH-1	5. GPD-2	9. GPI
2. MDH-2	6. XDH	10. PGM
3. ICD	7. SOD	11. GOT-1
4. GPD-1	8. SOR-2	12. ES-1

TABLA 8

Caracteres morfológicos usados en el análisis cladístico de las especies de *Telmatobufo*

Morphological characters used in the cladistic analysis of *Telmatobufo* species

Carácter	Estado del carácter		
	0	1	2
1. Tímpano	Presente	Ausente	---
2. Atlas y axis	No fusionados	Fusionados	---
3. Glándula humeral	Ausente	Presente	---
4. Diapófisis sacral	Más larga que ancha	Más ancha que larga	---
5. Ventosa oral larvaria	Ausente	Presente	---
6. Pigmentación huevos	Negros	Blanco-amarillentos	---
7. Tubo anal larvario	En forma de tubo	Aplanado	---
8. Extensión pliegue tarsal	Alcanza sólo la mitad del tarso	Alcanza la articulación tibio-tarsal	---
9. Glándula parotoídea	Ausente	Menor ó igual al diámetro antero-posterior del ojo	Mayor que el diámetro antero-posterior del ojo
10. Pliegue postfemoral	Ausente	Desarrollo mediano	Bien desarrollado
11. Extensión de la membrana en el borde externo del IV orjejo	La escotadura alcanza hasta la mitad del II metatarsiano	La escotadura alcanza hasta la articulación entre el II metatarsiano y la I falange	La escotadura alcanza la mitad de la I falange
12. Verrugas en los flancos	Ausentes	Presentes	---
13. Extensión de la articulación tibio-tarsal	No alcanza el ano	Alcanza o sobrepasa el ano	---
14. Adhesión de la piel	Adherida al dorso	No adherida al dorso	---

polimorfismo, número promedio de alelos por locus y heterocigosidad promedio (conteo directo) se muestran en la Tabla 5. El número promedio de alelos por locus fluctuó entre 1

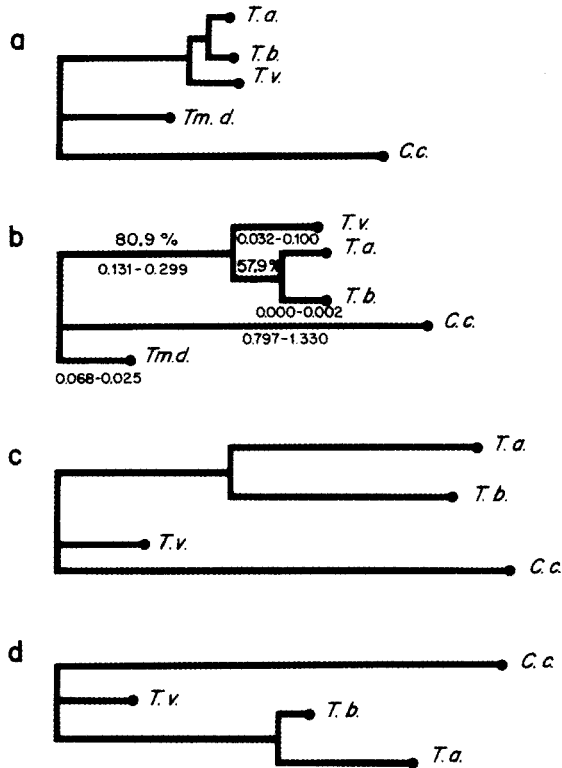


Fig. 9: Cladogramas que representan las relaciones filogenéticas entre las especies de *Telmatobufo*. (a) Arbol más parsimonioso obtenido a partir del análisis de las secuencias del ADN 12S mitocondrial. (b) Arbol de máxima probabilidad obtenido a partir del análisis de las secuencias del ADN 12S mitocondrial; los valores sobre las ramas señalan el porcentaje de "bootstrap" y bajo ellas sus límites de confianza. (c) Arbol de máxima parsimonia basado en caracteres isoenzimáticos. (d) Arbol de máxima parsimonia basado en caracteres morfológicos. *T. a.* (*Telmatobufo australis*), *T. b.* (*T. bullocki*), *T. v.* (*T. venustus*), *C. c.* (*Caudiverbera caudiverbera*), y *Tm. d.* (*Telmatobius dankoi*).

Cladograms representing the phylogenetic relationships among the *Telmatobufo* species. (a) Most parsimonious tree made with the sequences of mitochondrial 12S DNA. (b) Best maximum likelihood tree made with the sequences of mitochondrial 12S DNA; the "bootstrap" values are above the branches and below them their confidence limits. (c) Most parsimonious tree made with isoenzymatic characters. (d) Most parsimonious tree made with morphological characters. *T. a.* (*Telmatobufo australis*), *T. b.* (*T. bullocki*), *T. v.* (*T. venustus*), *C. c.* (*Caudiverbera caudiverbera*) and *Tm. d.* (*Telmatobius dankoi*).

(*Caudiverbera caudiverbera*) y 1,5 (*T. australis*). *Caudiverbera caudiverbera* no mostró ningún loci polimórfico; *T. australis* exhibió el mayor polimorfismo (46,2%). Los valores de heterocigosidad fluctuaron entre 0 (*Caudiverbera caudiverbera*) y 0,078 (*T. australis*). El locus GPI mostró el mayor número de alelos (tres) en *T. australis*. *Caudiverbera caudiverbera* exhibió todos sus alelos fijos en homocigosidad. Cada una de las especies tiene los siguientes alelos específicos: *T. australis* (a GPD-1, b SOR-2, a PGM), *T. bullocki* (c ICD), *T. venustus* (c GOT-1, b ES-1) y *C. caudiverbera* (a XDH, b SOD, a GPI, a GOT-1). El locus ES-1 es compartido en homocigosidad por las cuatro especies consideradas y por lo tanto tiene valor diagnóstico a escala tribal. Los alelos b XDH y a SOD (fijos en homocigosidad) diferencian a *Telmatobufo* de *Caudiverbera*.

En la Tabla 6 se muestran las identidades (Nei 1972) y distancias genéticas (Rogers 1972). *Telmatobufo australis* y *T. bullocki* son los taxa genéticamente más similares (distancia de Nei = 0,695) y los más diferentes *T. venustus* y *T. bullocki* (distancia de Nei = 0,464). *Caudiverbera caudiverbera* difirió sustancialmente en promedio de las especies de *Telmatobufo* (promedio Distancia de Nei = 0,366). El árbol de Wagner (Fig. 7a) construido sobre la distancia genética de Rogers (1972) muestra que existe mayor similitud genética entre *T. australis* y *T. bullocki*; y *T. venustus* aparece como un grupo separado.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La alineación de las secuencias de la región amplificada del ADN 12S mitocondrial de las tres especies de *Telmatobufo*, *C. caudiverbera* y *Telmatobius dankoi* (grupos externos) se muestran en la Fig. 8. En cada uno de estos taxa se secuenciaron 380 nucleótidos, pero sólo 350 se alinearon con confianza y 189 (54 %) mostraron variabilidad. Entre las especies de *Telmatobufo* predominan las transiciones sobre las transversiones (53 sobre 25) obteniéndose una tasa de sustitución de 1,83. *C. caudiverbera* respecto a *Telmatobufo* presenta una tasa de sustitución de 0,87 (80 transiciones y 97 transversiones). La composición nucleotídica de los cinco taxa analizados fue la siguiente: A (27 %), T (26 %), C (25 %) y G (22 %).

El estudio filogenético de las secuencias nucleotídicas, usando el principio de la máxima parsimonia y excluyendo los caracteres no informativos, generó un árbol parsimonioso de 279 pasos (Fig 9a). Las características del árbol son los siguientes: índice de consistencia 0,971, índi-

TABLA 9

Matriz de datos de 14 caracteres morfológicos para las especies de *Telmatobufo* y *Caudiverbera caudiverbera*. Los estados de caracteres se designan como 0, 1, y 2

Data matrix of 14 morphological characters to *Telmatobufo* species and *Caudiverbera caudiverbera*. Characters states are designed as 0, 1, and 2

Carácter	Especie			
	<i>C. caudiverbera</i>	<i>T. australis</i>	<i>T. bullocki</i>	<i>T. venustus</i>
1	0	1	1	1
2	0	1	1	1
3	0	1	1	1
4	0	1	1	1
5	0	1	1	1
6	0	1	1	1
7	0	1	1	1
8	0	1	1	0
9	0	2	2	1
10	0	2	1	0
11	0	2	2	1
12	0	1	1	0
13	0	1	1	0
14	0	1	0	0≠

ce de homoplasía 0,028, índice de retención 0,800 y “rescaled consistency index” 0,771.

El estudio filogenético de las mismas secuencias nucleotídicas arriba analizadas, pero usando el principio de la máxima probabilidad, generó un árbol que tiene una probabilidad máxima de ln = 1222,815. Todas sus ramas muestran longitudes significativamente diferentes de cero (P < 0,01), las internas son sustentadas por valores de “bootstrap” que fluctúan entre el 58 y 80 %. La topología del árbol se señala en la Figura 9b.

El árbol filogenético (Fig. 9c) basado en 13 loci isoenzimáticos consta de 17 pasos (se excluyeron los alelos monomórficos compartidos); en la Tabla 7 se indican los caracteres isoenzimáticos utilizados y su polarización. Las características del árbol más parsimonioso son los siguientes: índice de consistencia 0,882, índice de homoplasía 0,117, índice de retención 0,600 y “rescaled consistency index” 0,771.

El análisis filogenético de máxima parsimonia de los caracteres morfológicos, y cuya polarización y estados de carácter se muestra en las Tablas 8 y 9, generó un árbol (Fig. 9d) topológicamente similar a los anteriormente descritos. Su longitud es de 17 pasos y sus índices son los siguientes: consistencia 1, homoplasía 0, retención 1 y “rescaled consistency index” 1.

DISCUSIÓN

Lynch (1978) agrupó a *Telmatobufo* y *Caudiverbera* en la tribu Calyptrocephalellini y

definió al taxón basándose en caracteres morfológicos externos, huesos, huevos y larvas. La información genética aquí obtenida mostró que las tres especies de *Telmatobufo* y *C. caudiverbera* comparten el alelo a del locus ES-1 y por lo tanto agregamos este nuevo carácter a la definición tribal.

El análisis de los caracteres osteológicos aportó suficiente información que justifica la adscripción genérica de *T. australis* y *T. venustus*. Ambas comparten un patrón osteológico similar (Fig. 1, 2, y 3) al que presenta la especie genotípica (*T. bullocki*) y por lo tanto dan consistencia a la definición de *Telmatobufo*. Entre los caracteres osteológicos compartidos por las tres especies destacan los siguientes: fusión del atlas y el axis, ausencia de columela, fusión (*T. australis*, *T. bullocki*) o tendencia a la fusión (*T. venustus*) de los frontoparietales y diapófisis sacrales ensanchadas. El análisis de las frecuencias alélicas mostró que las tres especies comparten dos alelos fijos en homocigosis (a SOD y b XDH); y por lo tanto estos caracteres complementan la definición de *Telmatobufo* basada exclusivamente en caracteres esqueléticos (Lynch 1971). Los nuevos caracteres osteológicos y genéticos aquí reportados complementan la definición genérica y al mismo tiempo validan la proposición que definía a *Telmatobufo* exclusivamente en base a caracteres larvarios (Formas 1988, Lavilla 1988).

Los caracteres morfológicos externos, osteológicos, larvarios, isoenzimáticos y morfométricos proporcionan nuevas evidencias que ayudan a la mejor definición y diagnosis de las especies de

Telmatobufo. Es así como desde el punto de vista de la morfología externa, *T. venustus* se diferencia claramente de sus congéneres por su coloración y patrones de dibujo (dorso y vientre negro con manchas amarillas, rojas y naranjas), glándulas parotoideas pequeñas (menores que el diámetro del ojo) y ausencia de pliegues postfemorales y tarsales. *T. bullocki* y *T. australis* se diferencian entre sí por la cinta amarilla interocular (*T. bullocki*) y el amplio desarrollo del pliegue tarsal, pliegue postfemoral y bandas paravertebrales amarillo-verdosas (*T. australis*).

La morfología externa de las larvas no muestra caracteres cualitativamente relevantes que permitan diferenciar las especies y por lo tanto fue imposible construir una clave de identificación específica para los renacuajos. La adscripción específica de las larvas se ha basado en los siguientes criterios: (1) metamorfosis en el laboratorio (*T. australis*, Formas 1972), (2) presencia en los renacuajos de algún carácter presente en los adultos (*T. venustus*, Díaz et al. 1983) y (3) recolecta de renacuajos en el mismo lugar donde se han capturado adultos (*T. bullocki*, Formas 1988).

Desde el punto de vista genético, y al comparar los alelos de diferentes loci se constata que *T. bullocki* se distingue de *T. venustus* porque la primera especie tiene fijos en homocigosis los siguientes alelos: b MDH-1, a GPD-2 y b locus GPI. *T. australis* y *T. venustus* se diferencian entre sí porque el alelo a del locus ICD está fijo en homocigosis en *T. australis*, mientras que el locus alterno (b), está fijo en *T. venustus*. A este nivel no existe una diferenciación neta entre *T. australis* y *T. bullocki*, en esta última especie el alelo a del locus GPD-2 está fijo en homocigosis; sin embargo, en *T. australis* el alelo c, aunque es exclusivo para esta especie alcanza la frecuencia de 0,909 (Tabla 5).

El análisis discriminante señaló que desde el punto de vista morfométrico *T. venustus* se separa netamente de *T. bullocki* y *T. australis* en la primera función discriminante; pero estas dos últimas especies no se diferencian entre sí (Fig. 6).

El fenograma construido por el método de UPGMA y basado en la matriz de distancias de Mahalanobis de caracteres morfométricos, muestra que *T. australis* y *T. bullocki* son especies que comparten la misma similitud morfométrica, mientras que *T. venustus* está separado de este par de especies (Fig. 7b). La misma situación se observa en el árbol de Wagner (Fig. 7a) construido sobre una matriz de distancias genéticas de Rogers (1972).

Los análisis fenéticos permiten reconocer dentro del género *Telmatobufo* dos agrupaciones taxonómicas informales: el grupo *australis* (*T. australis* y *T. bullocki*) y el grupo *venustus* (*T. venustus*).

El análisis filogenético basado en la secuenciación del ARN 12S mitocondrial, y aplicándose el principio de máxima probabilidad (Fig. 9b), muestra que la monofilia de *Telmatobufo* está sustentada por 80,9 % de "bootstrap" y el clado *T. australis* y *T. bullocki* por 57,9 %. Los índices obtenidos al analizar las mismas secuencias, pero aplicándoseles el principio de máxima parsimonia son congruentes con los resultados obtenidos con el criterio de máxima probabilidad (Fig. 9a). El clado *T. australis*-*T. bullocki* es complementariamente sustentado por los análisis de máxima parsimonia basado en caracteres enzimáticos y morfológicos (Fig. 9c, 9d).

A partir de los cladogramas basados en secuencias del ARN 12S mitocondrial se puede proponer una hipótesis narrativa acerca de la historia evolutiva de *Telmatobufo*. De ellos se desprende que en este género ocurrieron dos eventos cladogenéticos que generaron dos linajes bien definidos. En el primero, y de un ancestro común, se produjo una divergencia que generó a *T. venustus* y al ancestro de *T. australis* y *T. bullocki*; posteriormente, y a partir de este se produjo la divergencia que dio origen a *T. australis* y *T. bullocki*.

Para datar en forma aproximada estos eventos cladogenéticos, hemos considerado que la tasa de divergencia del ADN mitocondrial de los animales vertebrados ectotérmicos fluctúa entre 0,3 y 0,7 % por millón de años (Martin & Palumbi 1993). Si suponemos que la tasa de evolución del ADN mitocondrial de *Telmatobufo* es comparable con la de otros vertebrados ectotérmicos y tomando en cuenta que el porcentaje de divergencia del ARN 12S mitocondrial de *T. venustus* difiere en promedio con las otras especies en un 9,4 %, podemos estimar que la separación de este taxón sucedió hace 23,5 millones de años. En el caso de *T. australis* y *T. bullocki*, cuya divergencia en el ARN 12S mitocondrial es de 8,2 %, el evento cladogenético se dató en 20,5 millones de años. Los tiempos aquí estimados, y ajustados a una tasa de sustitución de nucleótidos de 0,4 % por millón de años, son muy parecidos a aquellos obtenidos con una técnica diferente (la microfijación de complemento, la que estima tasa de sustitución de amino ácidos por par de linajes en 1,7 unidades por millón de años). La metodología y aproximación arriba referida dató la separación de *T. australis* y *T. bullocki* en 20 millones

de años y la divergencia de *T. venustus* en 25 millones de años (Núñez & Formas 2000). Los antecedentes arriba citados sugieren que los eventos cladogenéticos ocurridos en *Telmatobufo* tienen una historia que se puede remontar hasta el Mioceno.

Los patrones de distribución, los cladogramas que hipotetizan relaciones filogenéticas y la datación de los procesos cladogenéticos proporcionan antecedentes que permiten esbozar un modo de especiación para *T. australis*, *T. bullocki* y *T. venustus*. El primer evento involucró la derivación de *T. venustus*, especie distribuida en los contrafuertes occidentales de la cordillera de los Andes. El grupo hermano de *T. venustus* (*T. australis* y *T. bullocki*) especió en *T. bullocki* (taxón endémico de la cordillera de Nahuelbuta, cordillera de la Costa) y *T. australis* (especie de más amplia distribución que las dos anteriores y distribuida en la cordillera de la Costa, valle central y contrafuertes occidentales andinos, Fig. 4). Los tiempos de divergencia de estos taxa, datados entre los 23,5 y los 20,5 millones de años atrás (Mioceno), indican que estamos frente a un viejo proceso de especiación que ocurrió en un lapso aproximado de tres millones de años. La escasa información paleogeográfica del Mioceno del sur de Chile dificulta la proposición de un escenario seguro donde ubicar estos eventos cladogenéticos; sin embargo la orogénesis andina y las ingresiones marinas del Mioceno (Brüggen 1950, Ruíz et al. 1965) pueden haber generado espacios geográficamente aislados que hayan promovido la especiación alopátrica de las tres especies de *Telmatobufo*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1970656. César Cuevas y J. Pablo Valladares nos ayudaron con eficiencia y entusiasmo en el trabajo de campo. Carlos Jara leyó críticamente el manuscrito y tradujo el resumen al inglés. Marcos Navarro confeccionó los dibujos osteológicos. Nuestra especial gratitud a la arqueóloga Leonor Adán, quién recuperó la lámina de Philippi, y a la conservadora Susana Muñoz quién la caracterizó (ambas del Museo Histórico y Antropológico Mauricio Van de Maele, Universidad Austral de Chile). Este trabajo está dedicado a la memoria del Prof. Dr. Hugo Campos Cereceda, infatigable promotor de la investigación científica en Ciencias Naturales en Chile.

LITERATURA CITADA

AYALA FJ, JR POWELL, ML TRACEY, CA MOURAO & S PÉREZ-SALAS (1972) Enzymatic variability in the *Drosophila willistoni* group. Genetic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* 70: 113-139.

BÁEZ AM & ZB GASPARINI (1979) The South American Herpetofauna: An evaluation of the fossil record. En: Duellman WE (ed) *The South American herpetofauna: its origin, evolution and dispersal*: 29-54. Monograph 7, Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence, Kansas.

BRÜGGEN J (1950) *Fundamentos de la Geología de Chile*. Instituto Geográfico Militar, Santiago, Chile. 153 pp.

CEI JM (1958) Las láminas originales del suplemento a los batraquios chilenos de Philippi: primera impresión y comentarios. *Investigaciones Zoológicas Chilenas (Chile)* 4: 265-288.

CEI JM (1962) *Batracios de Chile*. Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. cviii + 128 pp.

CEI JM (1980) *Amphibians of Argentina*. *Monitore zoologico italiano N.S. Monografía* 2. xii + 609 pp.

CRISCI JV & MF LÓPEZ (1983) *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, District of Columbia. vi + 132 pp.

DÍAZ N, M SALLABERRY & H NÚÑEZ (1983) The tadpole of *Telmatobufo venustus* (Anura: Leptodactylidae) with a consideration of generic relationships. *Herpetologica* 39: 111-113.

DI CASTRI F (1968) *Esquisse écologique du Chili*. En: Deboutteville C & E Rapoport (eds) *Biologie de l'Amérique australe*: 7-52. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France.

DONOSO-BARROS R (1972) Contribución al conocimiento del género *Aruncus* Philippi. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción (Chile)* 44: 109-116.

DUELLMAN WE (1970) *The hylid frogs of the Middle America*. Monograph Museum of Natural History, The University of Kansas 1: 11-753.

DUELLMAN WE (1979) *The South American herpetofauna: a panoramic view*. En: Duellman WE (ed) *The South American herpetofauna: its origin, evolution and dispersal*: 1-28. Monograph 7, Museum of Natural History, The University of Kansas, Lawrence, Kansas.

FELSENSTEIN J (1995) *PHYLIP*. Phylogeny inference package, Version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Washington.

FORMAS JR (1972) A second species of Chilean frog genus *Telmatobufo* (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology* 6: 1-3.

FORMAS JR (1979) *La herpetofauna de los bosques templados de Sudamérica*. En: Duellman WE (ed) *The South American herpetofauna: its origin, evolution and dispersal*: 314-369. Monograph 7, Museum of Natural History The University of Kansas, Lawrence, Kansas.

FORMAS JR (1988) *The tadpole of Telmatobufo bullocki* (Anura: Leptodactylidae). *Herpetologica* 44: 458-460.

- FORMAS JR (1992) The tadpole of *Eupsophus vertebralis* (Anura, Leptodactylidae). *Herpetologica* 48: 115-119.
- FORMAS JR (1995) Anfibios. En: Simonetti JA, MTK Arroyo, AE Spotorno & E Lozada (eds) *Diversidad biológica de Chile*: 314-325. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Santiago, Chile.
- FORMAS JR & E PUGIN (1979) New observations of *Telmatobufo australis* (Anura, Leptodactylidae) in southern Chile. *Journal of Herpetology* 13: 359-361.
- FORMAS JR & A VELOSO (1982) Taxonomy of *Bufo venustus* Philippi 1899 (Anura, Leptodactylidae) from central Chile. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 95: 688-693.
- FORMAS JR, I NORTHLAND, J CAPETILLO, JJ NÚÑEZ, CC CUEVAS & LM BRIEVA (1999) *Telmatobius dankoi*, una nueva especie de rana acuática del norte de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 72: 427-445.
- FROST DR (1985) *Amphibian species of the world. A taxonomic and geographic reference*. Allen Press, Inc. and the Association of Systematics Collections, Lawrence, Kansas. v + 732 pp.
- GALLARDO JM (1962) Los géneros *Telmatobius* y *Batrachophrynus* (Amphibia; Leptodactylidae) en la Argentina. *Neotropica* 8: 45-48.
- GALLARDO JM (1965) A propósito de los Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Papéis Avulsos* 17: 77-87.
- GASPARINI ZB & AM BÁEZ (1975) Aportes al conocimiento de la herpetofauna terciaria de la Argentina. *Actas del Primer Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía (Argentina)* 2: 377-415.
- GOSNER K (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- HARRIS H & DA HOPKINSON (1976) *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland, Amsterdam, The Netherlands. 283 pp.
- HEYER WR (1975) A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. *Smithsonian Contributions to Zoology* 199: 1-55.
- HOLLISTER G (1934) Clearing and dyeing fish for bone study. *Zoologica* 12: 89-101.
- KUMAR S, K TAMURA & M NEI (1993) MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University Park, Pennsylvania.
- LAVILLA EO (1988) Lower Telmatobiinae (Anura: Leptodactylidae): generic diagnoses based on larval characters. *Occasional Papers of the Museum of Natural History, The University of Kansas* 124: 1-19.
- LYNCH JD (1971) Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. *University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publication* 53: 1-238.
- LYNCH JD (1978) A re-assessment of the Telmatobiinae leptodactylid frogs of Patagonia. *Occasional Papers of the Museum of Natural History, The University of Kansas* 72: 1-57.
- MANIATIS TE, EF FRITCH & J SAMBROOK (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor. 410 pp.
- MARTIN AP & SR PALUMBI (1993) Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 4087-4091.
- NEI M (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- NÚÑEZ JJ & JR FORMAS (2000) Evolutionary history of the Chilean frog genus *Telmatobufo* (Leptodactylidae): an immunological approach. *Amphibia-Reptilia* 21: 351-356.
- ORTON G (1953) The systematics of the vertebrate larvae. *Systematic Zoology* 2: 63-75.
- PALUMBI SR (1996) Nucleic acids II: the polimerase chain reaction. En: Hillis DM, C Moritz & BK Mable (eds) *Molecular systematics*: 205-246. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- PEFAUR J (1971) Nota sobre *Telmatobufo bullocki* Schmidt (Anura, Leptodactylidae). *Boletín del Museo Nacional Historia Natural Chile* 32: 215-225.
- PHILIPPI RA (1899) Descripciones breves de dos nuevas especies de sapos (*Bufo*). *Anales de la Universidad de Chile* 104: 723-725.
- PHILIPPI RA (1902) Suplemento a los Batraquios chilenos descritos en la Historia Física i Política de Chile de Don Claudio Gay. *Librería Ivens, Santiago, Chile*. xi + 161 pp.
- PUGIN E & O GARRIDO (1981) Morfología espermática en algunas especies de anuros pertenecientes al bosque temperado del sur de Chile. *Ultraestructura comparada. Medio Ambiente (Chile)* 5: 45-57.
- ROE BA, DP MA, RK WILSON & JF WONG (1985) The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *Journal of Biological Chemistry* 260: 9759-9774.
- ROGERS JS (1972) Measures of genetic similarity and genetic distance. *University of Texas Publication* 7213: 145-153.
- RUIZ C, J CORVALÁN & L AGUIRRE (1965) Geología. En: *Corporación de Fomento de la Producción (ed) Geografía económica de Chile*: 35-97. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- SAIKI RK, DH GELFAND, S STOFFEL, S SHARF, R HIGUCHI, GT HORN, KB MULLIS & HA ERLICH (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SANGER F, S NICKLEN & A COULSON (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 5463-5467.
- SCHAEFFER B (1949) Anurans from the Early Tertiary of Patagonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 93: 47-68.
- SCHMIDT KP (1952) A new leptodactylid frog from Chile. *Fieldiana Zoology* 34: 11-15.
- SELANDER RK, MH SMITH, SY YANG, WE JOHNSON & JB GENTRY (1971) Biochemical polymorphism and systematics of *Peromyscus*. I. Variation in the old field mouse *Peromyscus polionotus*. *University of Texas Publications* 7103: 49-90.
- SWOFFORD DL (1998) PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Others Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 128 pp.

- SWOFFORD DL & RB SELANDER (1989) BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois. 43 pp.
- THOMPSON JD, DG HIGGINS & TJ GIBSON (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- VELOSO A & J NAVARRO (1988) Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. *Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino (Italia)* 6: 481-539.
- VENEGAS W (1975) Los cromosomas de *Aruncus venustus* (Philippi 1899) (= *Telmatobufo bullocki* Schmidt 1952) (Amphibia, Anura). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción (Chile)* 49: 71-77.

Editor Asociado: J.C. Torres-Mura

Recibido el 2 de marzo de 2000; aceptado el 21 de agosto de 2000