

Identidad de la rana austral chilena *Eupsophus coppingeri* (Amphibia, Anura, Neobatrachia): evidencias morfológicas, cromosómicas y moleculares

Identity of the austral Chilean frog *Eupsophus coppingeri* (Amphibia, Anura, Neobatrachia): morphological, chromosomal and molecular evidences

J. RAMÓN FORMAS*, JOSÉ NÚÑEZ & CÉSAR CUEVAS

Instituto de Zoología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile;
*e-mail para correspondencia: rformas@uach.cl

RESUMEN

Análisis comparativos que incluyen: morfología externa de adultos y larvas, osteología, cromosomas y secuencias del gen mitocondrial citocromo *b* muestran que la rana austral chilena *Eupsophus coppingeri* (Günther 1881) es una especie del género *Alsodes* que debe nominarse *Alsodes coppingeri* (Günther 1881) nueva combinación. Basados en el holotipo y nuevos especímenes recolectados en la localidad típica, el taxón es redescrito y comparado con otros taxa congénéricos. Se discute la sinonimia entre *Alsodes monticola* y *A. coppingeri*.

Palabras clave: *Alsodes coppingeri*, citocromo *b*, cromosomas, *Eupsophus coppingeri*, morfología, osteología, rana austral chilena.

ABSTRACT

Comparative analyses that include: external morphology of adults and larvae, osteology, chromosomes and sequences of the mitochondrial gen cytochrome *b* show that the austral Chilean frog *Eupsophus coppingeri* (Günther 1881) is a species of the genus *Alsodes* that should be named *Alsodes coppingeri* (Günther 1881). Based on the holotype and new specimens collected in the type locality the taxon is redescribed and compared with its congeners. The synonymy between *Alsodes monticola* and *A. coppingeri* is discussed.

Key words: *Alsodes coppingeri*, chromosomes, cytochrome *b*, *Eupsophus coppingeri*, morphology, austral Chilean frog.

INTRODUCCIÓN

La comprensión de los procesos evolutivos se fundamenta en la correcta identificación de las especies debido a que rutinariamente se las emplea como unidades que posibilitan los análisis filogenéticos, sistemáticos, biogeográficos y ecológicos (Sites & Marshall 2003, Balakrishnan 2005). Entre los anfibios de Chile aún subsisten ejemplos de identidades específicas no resueltas, destacando las especies descritas por Philippi (1902) y otras recolectadas en los archipiélagos del sur de Chile por expediciones inglesas de fines del siglo XIX. Esta última situación está bien representada por *Cacotus coppingeri* (Günther

1881) especie descrita sobre un espécimen hembra, BM 80.7.28.14 (1947.2.1997), colectada inicialmente en la localidad de Puerto Río Frío (49°12' S, 74°24' W) 7 km al sur de Puerto Edén, Isla Wellington, Provincia de Ultima Esperanza, XII Región Chile, durante la expedición del H.M.S. Alert. Capurro (1958) transfirió la especie de Günther al género *Eupsophus* debido a que *Eupsophus* (Fitzinger 1843) antecede a *Cacotus* (Günther 1868). Grandison (1961) y Cei (1960, 1962a, 1962b) redescubrieron la especie; sin embargo, la heterogénea procedencia del material examinado, sugiere que en las descripciones se incluyeron distintos taxa. Lynch (1968) comparó los holotipos de *Eupsophus*

coppingeri y *Alsodes monticola* concluyendo que la primera especie es sinónima de la segunda; sin embargo Veloso et al. (1981) no comparten esa opinión.

Con el propósito de establecer la identidad de *Eupsophus coppingeri* se comparó su holotipo con el material empleado en las redescripciones de Grandison (1961) y Cei (1960, 1962a, 1962b) y especímenes adicionales recolectados en la localidad típica. Las conclusiones obtenidas de los estudios morfológicos y cromosómicos se contrastaron con un análisis filogenético basado en secuencias del gen mitocondrial citocromo *b*. Basados en la elucidación de la identidad de *Eupsophus coppingeri* se reanaliza la hipótesis de sinonimia propuesta por Lynch (1968) para *Alsodes monticola* y *Eupsophus coppingeri*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los especímenes analizados en este estudio están depositados en las siguientes instituciones: Instituto de Zoología, Universidad Austral de Chile (IZUA); British Museum (Natural History), London (BM); Chicago Natural History Museum (CNHM); Zoologisches Museum, Berlin (ZMB); Naturhistorisches Museum, Wien (NMW) y American Museum Natural History (AMNH) (ver Anexo 1). El holotipo y los ejemplares recolectados en la localidad típica se midieron con un pie de metro de 0,1 mm de precisión considerando las siguientes variables morfométricas: (1) distancia hocico cloaca (desde el extremo del hocico hasta la cloaca), (2) largo de la cabeza (desde el borde posterior de la mandíbula hasta el extremo del hocico), (3) ancho de la cabeza (distancia máxima entre los bordes posteriores de la mandíbula), (4) distancia interocular (mínima distancia entre los bordes internos de los ojos), (5) distancia nariz-ojo (desde el borde posterior de la nariz hasta el borde anterior del ojo), (6) distancia internarinal (mínima distancia entre los bordes internos de las narinas), (7) diámetro del ojo (distancia entre el borde anterior y posterior del ojo), (8) largo de la pierna (desde la articulación femora-tibial hasta la articulación tibio-metatarsal), y (9) largo del pie (desde el extremo proximal del tubérculo metatarsal externo hasta el extremo distal del ortejo más largo).

Los estados de desarrollo larvario se determinaron según de Gosner (1960). Para los renacuajos y de acuerdo a Altig & McDiarmid (1999) se tomaron las siguientes variables morfométricas: (1) largo total (distancia entre el extremo del hocico y extremo de la cola), (2) largo del cuerpo (desde el extremo del hocico hasta el nacimiento del miembro posterior), (3) altura máxima de la cola (distancia máxima entre los bordes dorsales y ventrales de la aleta), (4) altura de la musculatura caudal (desde el nacimiento del miembro posterior hasta el borde dorsal de la musculatura caudal), (5) ancho de la musculatura caudal (medida a la altura del nacimiento de los miembros posteriores), (6) distancia interorbital (distancia máxima medida entre los centros de las pupilas), y (7) distancia internarinal (distancia máxima medida desde los centros de las narinas).

El estudio osteológico incluyó dos especímenes machos (IZUA 3298, 3300) diafanizados y teñidos según Song & Parenti (1995). Para el análisis de cromosómico se estudió un individuo macho (IZUA 3298) y las placas en c-metafase se obtuvieron según la metodología usada por Formas (1991). Los patrones de bandas C y Ag-NORs se revelaron con las técnicas de Sumner (1972) y Rufas et al. (1982), respectivamente. Las posiciones centroméricas fueron determinadas de acuerdo a Levan et al. (1964) y la longitud relativa según Bogart (1970).

El ADN genómico se obtuvo de 100 mg de tejido muscular (tanto de adultos como de larvas; ver Anexo 1) preservado en etanol (95 %) de las siguientes especies: *Alsodes australis*, *A. kaweshkari*, *A. verrucosus*, *A. barrioi*, *Eupsophus coppingeri*, *E. calcaratus*, *E. emiliopugini*, *Batrachyla taeniata*, *Hylorina sylvatica* e *Insuetophrynus acarpicus*. El tejido se maceró e incubó en tampón STE (NaCl 20 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,5; EDTA 0,1 mM) con SDS al 1 % y proteinasa K (100 µg mL⁻¹). El ADN se purificó mediante dos extracciones sucesivas con fenol-cloroformo (Sambrook et al. 1989), se precipitó con dos volúmenes de etanol (95 %) frío y se resuspendió en 200 µL de agua desionizada estéril. Se midió su concentración e integridad mediante espectrofotometría y geles de agarosa y luego las muestras se guardaron a -20 °C. Los partidores utilizados para la amplificación y secuenciación de un segmento del gen

mitocondrial citocromo *b* fueron CB1-5 (5'-TCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') y CB2-3 (5'-CCCTCAAAAGATAT TTGTCCTCA-3') (Palumbi 1996). La reacción de amplificación constó de 20 a 50 ng de DNA genómico, 0,4 mM de cada partidor, 0,1 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 5,0 µL de tampón de reacción 10X, 0,2 U de *Taq* Polimerasa (Invitrogen) y agua desionizada hasta completar 50 µL. Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial a 94°C por cinco minutos seguido de 35 ciclos de amplificación enzimática, constando cada ciclo de 45 seg de denaturación a 92 °C, y 60 segundos de reasociación a 50 °C y 45 seg de extensión a 72 °C. Los productos amplificados se purificaron directamente desde el gel mediante minicolumnas Qiagen. La secuenciación directa se llevó a cabo sobre las dos hebras del DNA utilizando un secuenciador automático (ABI PRISM; Amplitaq DNA Polimerasa). Los códigos de acceso GenBank de las secuencias generadas en este estudio son EU022573-EU022581. Cada secuencia fue examinada de acuerdo a su código genético de codificación aminoacídica para verificar que las secuencias fueran válidas. Este análisis se realizó con el programa McClade 4.03 (Maddison & Maddison 2000). El alineamiento de las secuencias se hizo con el programa CLUSTAL X (Thompson et al. 1997).

El análisis filogenético de las secuencias de citocromo *b* se hizo mediante los criterios de parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) implementados en PAUP* 4.0b10 (Swofford 2001). Previo a los análisis, se realizó un test de saturación de los cambios nucleotídicos en la primera segunda y tercera posición del codon para detectar las regiones saturadas con cambios y excluirlas del análisis filogenético. El análisis de MP se hizo a través de búsqueda heurística (1.000 réplicas con adición de taxa al azar y permutación por ramas por TBR) con igual peso para posiciones dentro de un codon (parsimonia de Fitch, Fitch 1971). Los sitios no informativos (invariantes y autoapomórficos) no fueron considerados en los análisis. De manera alternativa comparamos los árboles de menor longitud usando el método de parsimonia "ratchet" (Nixon 1999), implementado en el programa PAUPRat (Sikes & Lewis 2001), con 1.000 réplicas. El soporte de cada nodo se midió a través de "bootstrap"

(Felsenstein 1985) con búsqueda heurística y 1.000 pseudorréplicas con cinco adiciones al azar por pseudorréplica. Los valores ≥ 70 % se consideraron como buen soporte de los nodos (Hillis & Bull 1993).

Previo al análisis de máxima verosimilitud se evaluó el modelo de evolución molecular a utilizar en la reconstrucción filogenética, considerando las probabilidades de 56 modelos de evolución. Este análisis se realizó con el programa MODELTEST versión 3.07 (Posada & Crandall 1998) asociado a PAUP* 4.0b10, eligiendo el criterio de información Akaike (AIC; Huelsenbeck & Crandall 1997, Alfaro & Huelsenbeck 2006). Con el modelo de evolución más apropiado se obtuvo el mejor árbol por búsqueda heurística, adición de taxa al azar y permutación de ramas de TBR. La robustez de cada clado se evaluó por bootstrap (búsqueda heurística y 200 pseudorréplicas). Los análisis filogenéticos también se llevaron a cabo usando inferencia bayesiana (Huelsenbeck et al. 2001, Holder & Lewis 2003). Esta aproximación evalúa la probabilidad a posteriori de un árbol dada la matriz de caracteres, utilizando métodos como MCMC (Markov chain Monte Carlo) para la búsqueda de los árboles. Estos análisis se realizaron con el programa MRBAYES 3.0 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), usando el mismo modelo de evolución obtenido con Modeltest. Las cadenas de Markov se corrieron por cinco millones de generaciones y muestreando los árboles cada 100 generaciones. La fase estacionaria fue determinada de forma visual y posteriormente se descartó el "burn-in" (primeras 50.000 generaciones); los árboles restantes fueron utilizados para calcular las probabilidades a posteriori. Los cladogramas fueron considerados con soporte significativo si ellos estuvieron presentes en ≥ 95 % de los árboles muestreados (Ronquist 2004, Huelsenbeck & Ronquist 2005).

RESULTADOS

Análisis de los especímenes usados por Grandison (1961) y Cei (1960, 1962a, 1962b) en las redescpciones de Eupsophus coppingeri

La redescpción de *Eupsophus coppingeri* hecha por Grandison (1961) se basa en una hembra adulta (CNHM 44219) proveniente de

Cabrería, cordillera de Nahuelbuta (800 m), provincia de Arauco. El análisis de su morfología externa y la comparación con la descripción dada por Veloso et al. (1981) nos indica que este espécimen pertenece a *Alsodes barrioi* (Veloso et al. 1981). La redescritión de Grandison (1961) es acompañada de tres figuras (Fig. 1, 2 y 5) que muestran detalles morfológicos de la pata derecha del espécimen CNHM 48548 (cordillera de Pemehue, provincia de Biobío), el esternón del ejemplar BM 1958 I.3.97-98 (Bariloche, provincia de

Río Negro, Argentina) y callosidades nupciales del espécimen ZMB 29470, también de Bariloche. Después de analizar estos ejemplares observamos que la primera figura corresponde a un espécimen no identificado del género *Alsodes* y las dos siguientes a *Alsodes australis* (Formas et al. 1997). Este análisis muestra que Grandison (1961) redescubrió *Eupsophus coppingeri* basándose en ejemplares de tres taxa diferentes (*Alsodes* sp., *A. barrioi* y *A. australis*), ninguno de los cuales pertenece al taxón descrito por Günther (1881).

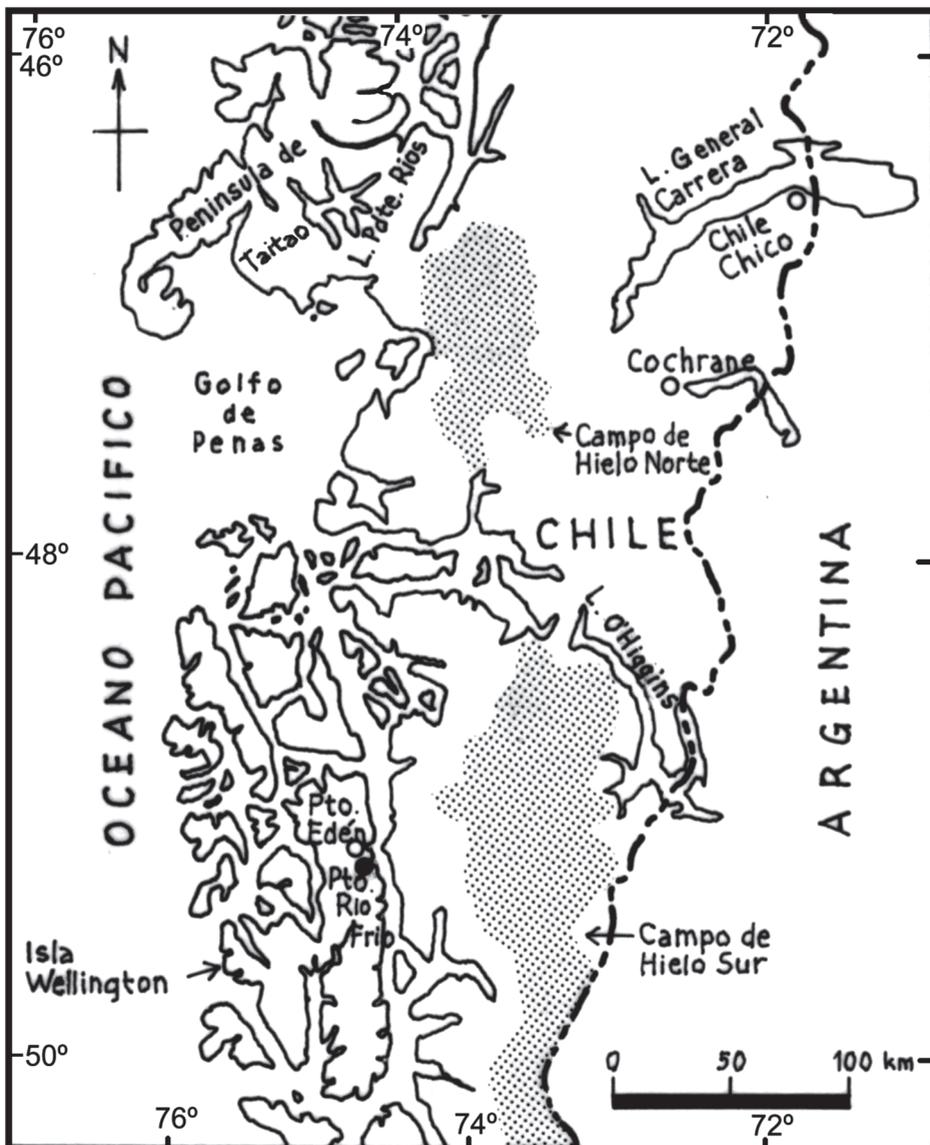


Fig. 1: Localidad típica de *Alsodes coppingeri*.

Type locality of *Alsodes coppingeri*.

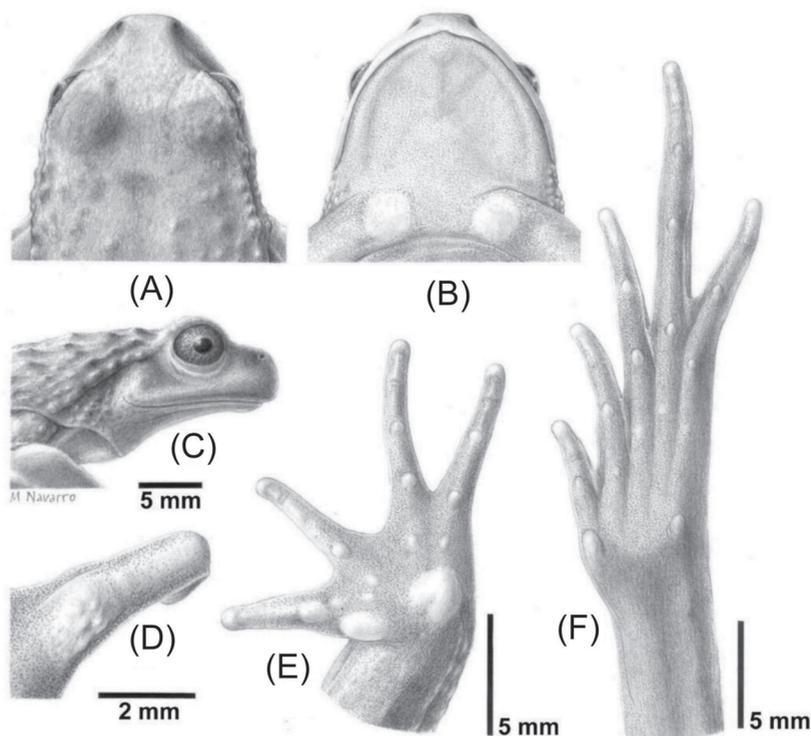


Fig. 2: Detalles morfológicos del espécimen IZUA-3299 de *Alsodes coppingeri*. Vistas dorsal (A), ventral (B) y lateral (C) de la cabeza, asperezas nupciales (D), superficie palmar (E) y superficie plantar (F).

Morphological details of the specimen IZUA-3299 of *Alsodes coppingeri*. Dorsal (A), ventral (B) and lateral (C) views of the head, nuptial asperities (D), palmar surface (E) and plantar surface (F).

Cei (1960, 1962a, 1962b) redescubrió a *Eupsophus coppingeri* empleando tres especímenes: el primero corresponde al holotipo, el segundo a una hembra colectada en Puerto Edén (AMNH 52884) y el tercero, sin catalogar, pero bien representado en la lámina a color N° XXX (1,2) de Cei (1962b). Al analizar el segundo espécimen concluimos que debe ser asignado a *Alsodes verrucosus* y el tercero a un macho adulto de *Eupsophus emiliopugini*. Del examen se concluye que la redescubrición de Cei (1960, 1962a, 1962b) incluye solamente un espécimen perteneciente a *Eupsophus coppingeri* (el holotipo), los otros dos taxa se ubican en géneros distintos: *Alsodes* (*A. verrucosus*) y *Eupsophus* (*E. emiliopugini*).

Análisis de los especímenes recolectados en la localidad típica

El estudio comparativo de los especímenes (IZUA 3123, 3298, 3299 y 3300) recolectados

en Puerto Río Frío (localidad típica) mostró que entre el holotipo y esta nueva serie de especímenes hay un alto grado de similitud y por lo tanto los identificamos como *Eupsophus coppingeri*. Los esbozos de placas córneas en el pecho y pulgares de los especímenes IZUA 3298 y 3299 (caracteres definitorios de *Alsodes*; Gallardo 1970), más evidencias aportadas por los análisis osteológicos, cromosómicos y moleculares (ver más adelante), permitió concluir que *Eupsophus coppingeri* (Günther 1881) es un miembro del género *Alsodes* y por lo tanto debe designarse como *Alsodes coppingeri* (Günther 1881) nueva combinación.

Redescubrición de Alsodes coppingeri (Günther 1881) nueva combinación

Diagnosis: *Alsodes coppingeri* puede ser diferenciado del resto de sus congéneres por la siguiente combinación de caracteres: tamaño

pequeño (43,2-44,0 mm); membrana entre los ortijos y borde cutáneo reducido; hocico truncado en vista lateral; cariotipo con 26 cromosomas (8 pares metacéntricos, 2 pares submetacéntricos y 3 pares subtlocéntricos; constricción secundaria en el brazo corto del par 4); miembros posteriores de coloración uniforme y carentes de barras.

Redescripción de Alsodes coppingeri basada en el holotipo [B.M. 80.728 14(1947.2.1997)] y dos especímenes adultos (IZUA 3298, 3299) provenientes de la localidad típica (Fig. 1)

Distancia hocico-cloaca 43,2-44,0 mm. Cabeza más ancha (15,1-18,4 mm) que larga (15,4-16,6 mm). El promedio del largo de la cabeza corresponde al 32,4 % de la distancia hocico-cloaca. Ancho máximo del cuerpo (medida en su región media) 1,1 vez al ancho de la cabeza. Hocico truncado en vista dorsal y lateral (Fig. 2A y 2C). Labio superior con escotadura media (Fig. 2B). *Canthus rostralis* indistinto, región loreal cóncava en corte transversal. Ojos dirigidos anterolateralmente (5-6 mm de diámetro). La distancia interorbitaria (medida en la región media de los ojos) alcanza en promedio el 30,2 % del ancho de la cabeza. Narinas ovoideas poco prominentes (Fig. 2A), levemente más cerca del borde anterior de ojo que del extremo del hocico. Tímpano y anillo timpánico ausentes. Pliegue postocular delgado, se extiende desde el borde posterior del ojo hasta el nacimiento del brazo (Fig. 2C). Área granular comprendida entre la articulación mandibular y el nacimiento del brazo (disecada en el holotipo). Superficie de la cabeza lisa; sobre los ojos pequeños gránulos. Dientes vomerianos (5-8) entre las coanas redondeadas y de posición oblicua. Lengua circular, gruesa y con un leve escote posterior no apreciable en el holotipo. Dedos delgados con extremos redondeados. Fórmula digital III, IV, I = II. Tubérculos subarticulares en todos los dedos con fórmula es I (1), II (1), III (2), IV (2). Tubérculos metacarpales externos redondeados, internos ovalados. Tubérculos palmares (4-5) menores que los subarticulares (Fig. 2 E). Espinas nupciales (6-7) agrupadas en una placa ubicada en la superficie dorso-posterior del primer dedo (Fig. 2D). Extremidades posteriores delgadas que alcanzan 20,0 a 25,9 mm de longitud. Articulación tibio-metatarsal

extendida anteriormente alcanza el borde posterior del ojo. Largo del pie (27,5-35,7 mm) representa en promedio el 69,4 % de la longitud hocico-cloaca. Largo de la tibia (17,5-21,6 mm) corresponde en promedio al 48,6 % de la distancia hocico-cloaca. Ortejos delgados, redondeados en sus extremos, ordenados en longitud decreciente IV-V, III, II, I. Todos los dedos tienen bordes cutáneos externos e internos. Tubérculo metatarsal externo pequeño y ovalado; el interno dos veces más grande que el externo. Membranas entre los ortijos reducidas. Tubérculos subarticulares en todos los ortijos, fórmula: I (1), II (1), III (2), IV (3), V (2) (Fig. 2F). El holotipo presenta la falange distal del tercer ortijo derecho bífida y el cuarto ortijo izquierdo engrosado y carente de su falange distal. Pliegue tarsal presente, poco desarrollado, alcanza la mitad del tarso; en el holotipo casi imperceptible. Borde posterior de los muslos con gránulos; muy notorios en el holotipo. Superficie dorsal y lateral del cuerpo con gránulos pequeños; superficie dorsal de las piernas con gránulos diminutos. Vientre y garganta lisa; pecho con esbozos de placas córneas redondeadas (Fig. 2B). El color de los especímenes fijados en alcohol (70 %) es uniformemente café grisáceo y sobre los ojos y dorso se aprecian manchas oscuras; el vientre es blanquecino amarillento. En los animales vivos, la cabeza, dorso, brazos y piernas son café claro con tonos dorados. Desde la cabeza, a la altura de los ojos, y hasta la parte media del dorso se extiende una zona triangular negra convergente posteriormente. Garganta y vientre blanquecinos. En la superficie dorsal de los muslos hay diminutas manchas negras. Iris negro con reticulaciones doradas. Las medidas del holotipo y de los especímenes colectados en la localidad típica se indican en la Tabla 1.

Notas sobre el holotipo: presenta las dos articulaciones mandibulares rotas y ambas regiones óticas disecadas; está abierto ventralmente, desde la unión de ambas ramas mandibulares hasta la región inguinal, pudiéndose apreciar claramente el omosternum, y el xiphisternum roto.

Osteología: el estudio de los huesos está basado en dos ejemplares adultos (IZUA 3298, 3300). Cráneo levemente más ancho que largo (1: 1,2), redondeado en vista de dorsal; ampliamente curvado en la región premaxilar (Fig. 3A). Osificación endoncondral limitada a

los exoccipitales y proóticos. Exoccipitales separados dorsomedial y ventrolateralmente; cóndilos carentes de tallo. Osificación de los proóticos limitada a la región anteromedial de la cápsula ótica; proóticos no contactan a los exoccipitales. Frontoparientales bien desarrollados y no se tocan medialmente, constituyen el techo de la caja craneana; delgados en su mitad anterior y ampliamente separados; posteriormente más anchos dejando entre ellos una estrecha separación. Posteriormente no alcanzan los exoccipitales; posterolateralmente se superponen dorsalmente a los proóticos. Dorso de la caja craneana con una fontanela ancha en la mitad anterior, más estrecha posteriormente; representa 0,57 veces la longitud total del cráneo. Nasaes con bordes internos y posteriores rectos; el borde anterior decrece oblicuamente hasta tocar distalmente el borde posterior. Ambos nasaes separados y no contactan ningún otro hueso. Paraesfenoides con alas medianas formando un ángulo recto con el proceso cultriforme; anteriormente asociados con el proótico; proceso posteromedial ancho que se introduce entre los exoccipitales (Fig. 3B). Extremo anterior del proceso cultriforme aserrado, sobrepasando levemente el nivel de los neopalatinos. Neopalatinos delgados, suavemente curvados anteriormente, medialmente contactan al esfenotmoides, lateralmente tocan las maxilas.

Prevómeres de tamaño mediano y forma irregular, separados medialmente y de posición oblicua; poseen seis dientes agudos de tamaño mediano. Arcada maxilar compuesta de premaxilas medianamente desarrolladas con procesos alares dirigidos dorsalmente y levemente orientados posteriormente. Maxila delgada y baja, su *pars facialis* no se extiende más allá de su contacto con los neopalatinos; 33-34 dientes maxilares (Fig. 3C). Cuadradoyugal corto y delgado que no contacta la maxila. Pterigoides desarrollados y con bordes afilados, la rama anterior contacta en la parte media de la órbita y con el borde lateral de la maxila; rama posterior en contacto con el cartílago palatocadrado; rama ventral toca al proótico. En vista lateral el escamoso tiene forma de T; ramas zigomática y ótica delgadas, la primera 1,8 veces más larga que la segunda; la rama ótica ensanchada posteriormente. Rama ventral recta, de dirección oblicua dorsoventral cefalocaudal. Articulación de la mandíbula al mismo nivel que la *fenestra ovalis*. Columela y anillo timpánico ausente.

Cuerpo del hyoides relativamente estrecho, en la línea medio cerca del 67 % más ancho que largo, seno hipoglosal ancho y profundo. Procesos anterolaterales de la placa hyoidea delgados, dirigidos anteriormente en un ángulo de aproximadamente 45°, extremo distal sin expansiones.

TABLA 1

Medidas (mm) del holotipo (hembra) [B.M. 80.728.14.(1947.2.1997)], machos adultos (IZUA 3298, 3299) y juveniles (IZUA 3114, 3115, 3122, 3124) de *Alsodes coppingeri*.
Media, desviación típica y rangos (paréntesis)

Measurements (mm) of the holotype (female) [B.M. 80.728.14.(1947.2.1997)], adult males (IZUA 3298, 3299) and juveniles (IZUA 3114, 3115, 3122, 3124) of *Alsodes coppingeri*. Means, standard deviation and ranges (parenthesis)

Caracteres	Holotipo	Machos (2)	Juveniles (4)
Distancia hocico-cloaca	43,7	42,0 - 44,0	27,9 ± 5,2
Largo cabeza	16,5	15,4 - 16,6	10,9 ± 2,2
Ancho cabeza	18,4	15,1 - 17,5	10,1 ± 2,4
Distancia interocular	7,4	4,5 - 5,8	3,5 ± 0,6
Distancia nariz-ojo	3,5	3,3 - 3,8	2,6 ± 0,3
Distancia internarial	5,2	4,3 - 4,8	3,3 ± 0,7
Diámetro del ojo	6,0	5,0 - 5,1	3,5 ± 0,5
Largo pierna	20,9	17,5 - 21,6	12,9 ± 2,5
Largo pie	29,0	27,5 - 35,7	21,9 ± 3,5

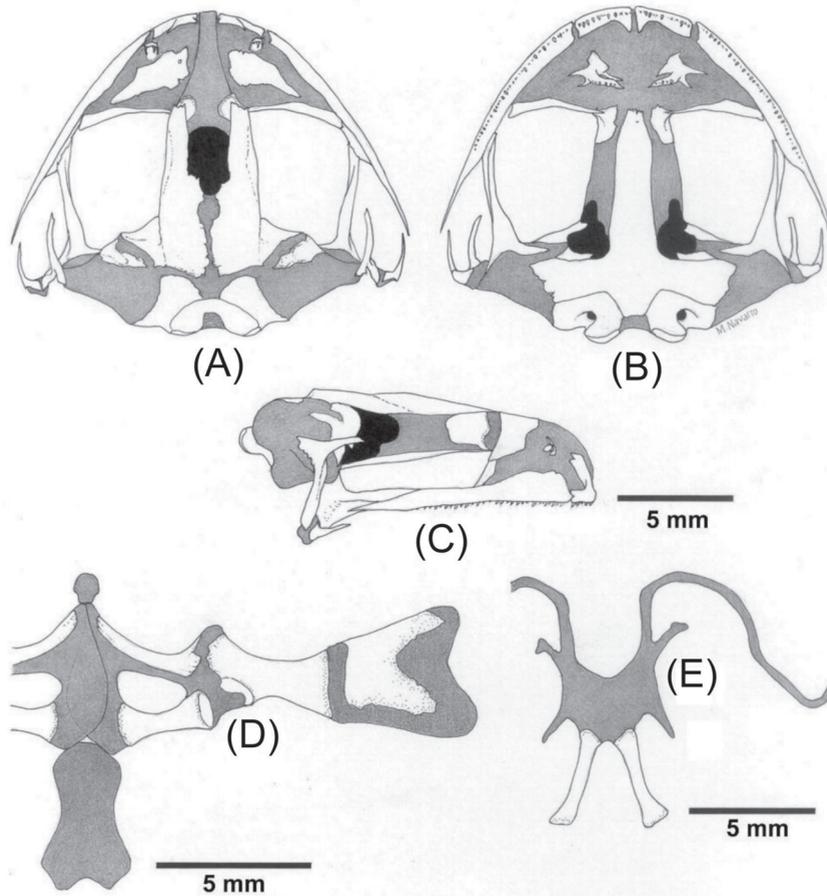


Fig. 3: Vistas dorsal (A), ventral (B) y lateral (C) del cráneo del espécimen IZUA-3300 de *Alsodes coppingeri*. Cintura pectoral (D), hoides (E).

Dorsal (A), ventral (B) and lateral (C) views of the skull of the specimen IZUA-3300 of *Alsodes coppingeri*. Pectoral girdle (D), hyoid (E).

Hyoides simple con procesos posterolaterales cortos y dirigidos posterolateralmente. Procesos posteromediales osificados, ampliamente separado anteriormente, terminan en un cartílago posterior (Fig. 3E).

Cintura pectoral arcífera, delicada. Clavículas delgadas y curvas; sus bordes posteriores se continúan con el cartílago procoracoides recto. Coracoides corto y recto, con extremos glenoideo y esternal ensanchados (Fig. 3D). Ventana pectoral ovoidea, más ancha que larga, el borde anterior levemente cóncavo y el posterior casi recto; margen anterior y medial cartilaginoso, el posterior está formado por el borde anterior del coracoides. Cartílagos epicoracoides cartilagosos y bien desarrollados; anteriormente separan ambas clavículas. Omosternum cartilaginoso, corto,

sin extremo distal espatulado, expandido en el holotipo. *Sternum* con mesoosternum ancho y xiphisternum ensanchado con su borde distal hendido. Escápula corta y ancha, tan larga como la clavícula; *pars glenoidea* y *pars acromialis* expandidas, el extremo proximal de la *pars acromialis* cartilaginoso. Supraescápula expandida, ancha; cuerpo, márgenes anteriores y posteriores osificados; bordes posteriores y laterales cartilagosos.

Columna vertebral compuesta de ocho vértebras presacrales procélicas no imbricadas; atlas y axis fusionados (IZUA 3300) (Fig. 4A y 4B), observándose una leve fisura dorsal entre ambas vértebras; en el espécimen IZUA 3298 estas vértebras están separadas. Vértebras cortas y anchas, el largo de los cuerpos es aproximadamente igual a su ancho. Presacral I

(atlas) con cóndilos cervicales levemente separados; espinas neurales bajas, longitudes de los procesos transversos y sacros: II = sacro < I = III = IV < V = VI = VII; extremos distales de los procesos transversos delgados, excepto el II que muestra un leve ensanchamiento aplanado; el I levemente orientado anteriormente, el II y III orientados posteriormente, el IV y V perpendiculares al cuerpo vertebral y el VI y VII dirigidos anteriormente. Diapófisis sacrales levemente espatuladas, no dilatadas y dirigidas posteriormente. El sacro se articula bicondilarmente con el urostilo; este es delgado y tiene una cresta dorsal delgada que disminuye en el tercio posterior. Longitud de la cintura pélvica igual al sacro y las vértebras presacrales. Mango ilíaco con una cresta dorsal baja y afilada, prominencia dorsal baja. Perfil

interilial en forma de U; su ancho en la base es aproximadamente tres cuartos la distancia entre los extremos de los iliones. La parte posterior del ílion forma el margen anterior del acetábulo redondeado; el preacetábulo forma un ángulo levemente superior a 90° con el mango del ílion; isquion sin cresta dorsal prominente y pubis totalmente cartilaginosa (Fig. 4E).

Húmero más largo y robusto que la radio-ulna, crestas humerales bien desarrolladas. Fórmula de las falanges de las manos 2-2-3-3; falanges terminales aguzadas. Elementos carpianos cartilagosos (Fig. 4D). Tibio-fíbula levemente más larga que el fémur. Tibia y fíbula fusionadas a lo largo de toda su longitud. Fórmula de las falanges de los ortijos: 2-2-3-4-3; falanges terminales redondeados. Elementos tarsales cartilagosos (Fig. 4C).

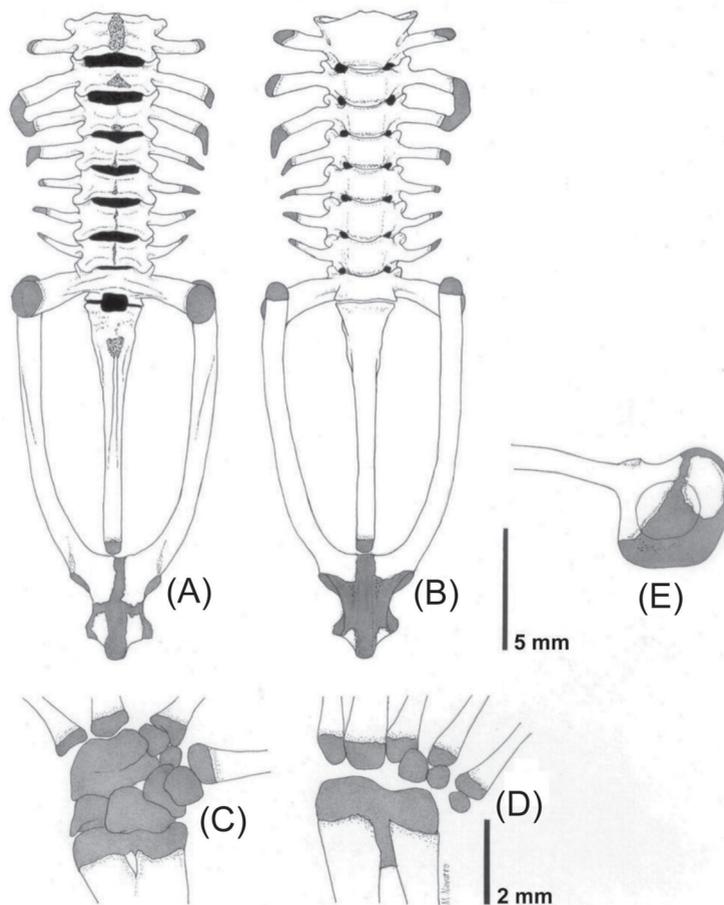


Fig. 4: Vistas dorsal (A) y ventral (B) de la columna vertebral del espécimen IZUA-3300 de *Alsodes coppingeri*. Carpo (C), tarso (D) y vista lateral del acetábulo (E).

Dorsal (A) and ventral (B) views of the vertebral column of the specimen IZUA-3300 of *Alsodes coppingeri*. Carpus (C), tarsus (D) and lateral view of the acetabulum (E).

Descripción del renacuajo: se basa en once especímenes [IZUA 3256 (siete en estadio 25, tres en estadio 26 y uno en estadio 35)] recolectados en la localidad típica. Las medidas de los renacuajos se muestran en la Tabla 2. Cuerpo ovoideo en vista lateral y rectangular en vista dorsal (Fig. 5A y 5B). Extremo del hocico suavemente redondeado en vista lateral. Narinas ovaladas; apertura anterolateral con un delgado reborde cutáneo. Narinas levemente más cercanas al borde anterior del ojo que al extremo del hocico. Pupilas circulares y situadas dorsalmente. Disco oral levemente emarginado (Fig. 5C), de posición ventral; ancho máximo 146 % la distancia interocular; marginalmente festoneado y con las papilas distribuidas en una fila simple. Papilas ventrales dos veces más largas que las laterales. Una fila de papilas mentales intramarginales; submarginales en el labio anterior (4-5) e inferior (2-3). Cubiertas córneas de la mandíbula serradas; la mandíbula superior está extendida posterolateralmente sobrepasando la mandíbula inferior. Fórmula de los dientes labiales es 2 (2)/3 (1). El valor del balance es -1 (Altig & Johnston 1989). Espiráculo ubicado hacia la izquierda y su longitud corresponde aproximadamente el 40 % de la distancia interocular; se ubica en la región media del cuerpo y se dirige ventrodorsalmente en un ángulo de 45°; el diámetro de su apertura es redondeado y similar al del ojo. Extremo distal del espiráculo sobresaliente y no se adhiere a la pared lateral del cuerpo. Tubo cloacal ancho, corresponde al 80 % la distancia interocular (Fig. 5D), cubre el nacimiento de la aleta ventral y se abre hacia la derecha;

ventralmente el labio dorsal no cubre el labio ventral. Longitud de la aleta corresponde al 58 % del largo total, el eje de la cola es recto. La aleta dorsal comienza a la altura del nacimiento de los miembros posteriores y no sobrepasa la altura del cuerpo. El extremo de la cola es redondeado.

En especímenes fijados en formalina (10 %) la aleta dorsal presenta melanóforos en sus dos tercios anteriores. Aleta ventral translúcida con escasos melanóforos irregularmente distribuidos. Musculatura de la cola café oscuro con melanóforos densamente distribuidos en la mitad anterior, posteriormente disminuyen en densidad. Superficies dorsales y ventrales del cuerpo café, superficie ventral opaca y los órganos internos son visibles. Pupilas con iris negro; cubierta córnea de la mandíbula café oscura y disco oral transparente. En especímenes vivos el cuerpo es café oscuro.

Ecología y distribución: *Alsodes coppingeri* se conoce solamente en la localidad típica (Puerto Río Frío), ubicada en la región Océánica Temperada Fría (di Castri 1968). Puerto Edén (isla Wellington), 7 km al norte de Puerto Río Frío, tiene una temperatura promedio anual de 7,2 °C (5,4-10,1) y el promedio anual de la humedad relativa y las precipitaciones fue de 84 % y 2,243 mm, respectivamente (Hajek & di Castri 1975). El área circundante a Puerto Río Frío corresponde a una tundra rodeada de montañas (750-1000 m) en las que se determinaron plantas en cojín de los géneros *Donatia*, *Azorella* y *Astelia* y juncos de las familias Cyperaceae y Juncaceae. En la ceja boscosa circundante se determinaron los siguientes árboles: *Nothofagus*

TABLA 2

Medidas (mm) de los renacuajos de *Alsodes coppingeri*. Media y desviación típicaMeasurements (mm) of the tadpoles of *Alsodes coppingeri*. Means and standard deviation

Caracteres	Estado		
	25	26	35
n	7	3	1
Largo total	35,0 ± 1,6	38,9 ± 3,4	63,8
Largo del cuerpo	13,5 ± 0,6	15,4 ± 1,4	28,3
Alto máximo de la cola	6,8 ± 0,4	7,6 ± 0,7	11,8
Alto musculatura caudal	3,0 ± 0,2	3,3 ± 0,2	6,2
Ancho musculatura caudal	2,8 ± 0,4	2,9 ± 0,4	5,2
Distancia interorbital	3,4 ± 0,2	3,7 ± 0,3	6,3
Distancia internarial	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,3	5,5

betuloides, *N. antarctica*, *Embothrium coccineum*, y *Drymis winteri* y coníferas de los géneros *Pilgerodendron*, *Astrocedrus* y *Podocarpus*. En Puerto Edén colectamos los siguientes anuros: *Batrachyla antartandica*, *Bufo variegatus*, *Alsodes kaweshkari* y *Eupsophus calcaratus*; Lynch (1975) también cita la presencia de *Atelognathus grandisonae* y Díaz & Núñez (1988) la de *Alsodes verrucosus*. No se observaron reptiles. Los ejemplares de *Alsodes coppingeri* se encontraron bajo troncos dentro del bosque y las larvas se capturaron con red de mano en el fondo de un arroyo correntoso (10,5 °C; 12 marzo de 2000). Machos con esbozos de espinas nupciales también fueron colectados en el mes de marzo.

Cromosomas: el examen de 12 placas en c-metafase obtenidas de un macho (IZUA 3298) mostró el número diploide $2n=26$. Todos los cromosomas tienen dos brazos y el número fundamental (NF) es 52. Los pares 1, 2, 5, 7, y 10-13 son metacéntricos; pares 3, 4 y 6 son subteloicéntricos y pares 8-9 son submetacéntricos (Fig. 6A). El par 4 (st) tiene una constricción secundaria en el brazo corto. Los pares 1-4 son grandes (> 100 unidades), pares 5 y 6 intermedios (entre 80 y 100 unidades) y los pares 7-13 pequeños (< 80 unidades). Un resumen de las longitudes relativas, las razones entre los brazos y tipos de cromosomas se muestran en la Tabla 3.

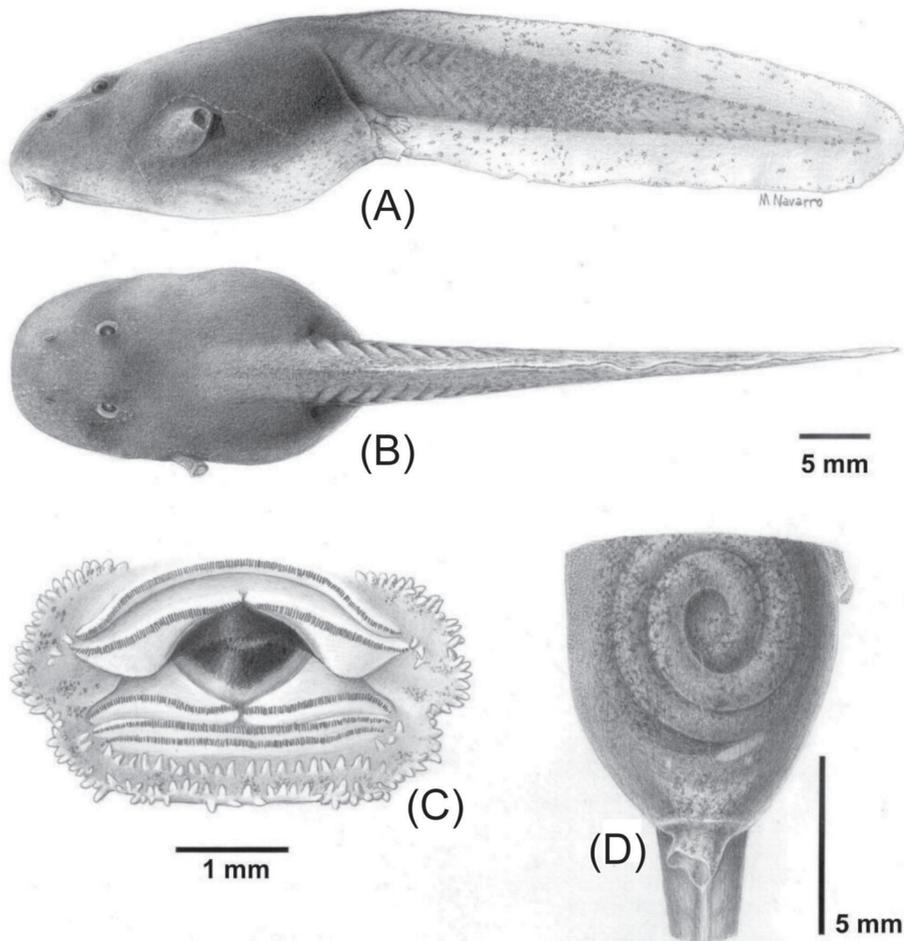


Fig. 5: Vistas lateral (A) y dorsal (B) de la larva (estadio 35; IZUA-3256) de *Alsodes coppingeri*. Disco oral (C), abertura cloacal (D).

Lateral (A) and dorsal (B) views of the tadpole (stage 35; IZUA-3256) of *Alsodes coppingeri*. Oral disc (C), cloacal aperture (D).

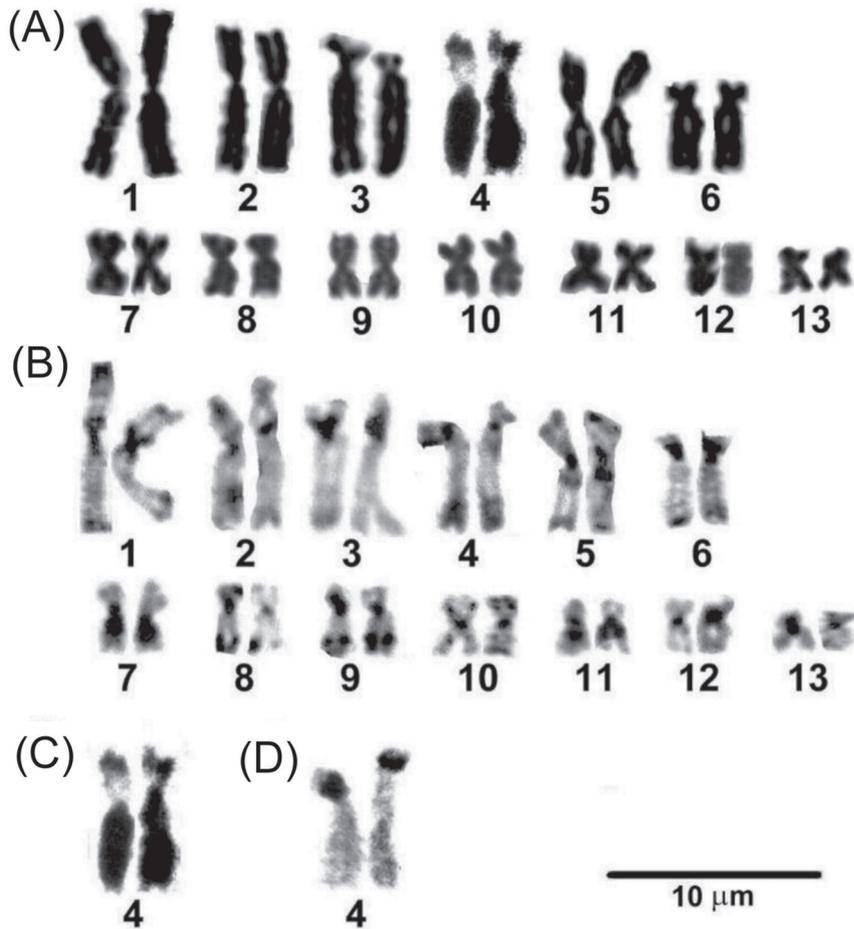


Fig. 6: Cromosomas de *Alsodes coppingeri* (IZUA-3298). Cariotipo (A), patrón de bandeo C (B), constricción secundaria (C) y Ag-NOR (D).

Chromosomes of *Alsodes coppingeri* (IZUA-3298). Karyotype (A), C-banded karyotype (B), secondary constriction (C) and Ag-NOR (D).

El análisis de ocho placas mostró heterocromatina constitutiva (bandas C) en la región centromérica y pericentromérica de todos los pares cromosómicos, especialmente en pares 1, 3, 5, 6, 7 y 11. Una notoria banda intersticial, casi de posición telomérica, se observó en el brazo largo del par 9 (Fig. 6B). Bandas teloméricas se observaron especialmente en los brazos largos de los pares 1, 3, 4 - 6 y 8, siendo aquella presente en el par 4 notablemente mas grande. El análisis de dos placas mostró que la región NOR se ubica en el brazo corto del par 4 (Fig. 6C).

Análisis filogenético de secuencias de citocromo b

Los resultados en la topología del cladograma mostraron concordancia con los tres criterios utilizados (Máxima Probabilidad, Máxima

Verosimilitud y Análisis Bayesiano; Fig. 7). Con los caracteres considerados como no ordenados y 1.000 réplicas de adición al azar mediante búsqueda heurística, el análisis de parsimonia dio como resultado un solo cladograma de 256 pasos (Índice de Consistencia = 0,75; Índice de Retención = 0,70). De los 304 sitios alineados, 162 fueron constantes y 107 filogenéticamente informativos. En cuanto al análisis de Máxima Verosimilitud, el modelo de evolución seleccionado con la opción AIC en Modeltest 3.07, fue GTR+I (Pinvar = 0,4640). La mayoría de los clados obtenidos poseen valores de bootstrap y probabilidades a posteriori relativamente altas (Fig. 7). Este cladograma muestra que *A. coppingeri* conforma con *A. australis*, especie geográficamente muy cercana, un clado con elevado soporte.

TABLA 3

Longitud relativa (media y desviación típica), razón entre los brazos (r) y tipos cromosómicos de *Alsodes coppingeri*

Relative length (mean and standard deviation) arm ratio (r), and chromosome types of *Alsodes coppingeri*

Par	Longitud relativa ^(a)	r ^(b)	Tipo ^(c)
1	139,80 ± 0,75	1,43 ± 0,16	m
2	124,60 ± 1,06	1,61 ± 0,26	m
3	112,10 ± 0,80	5,13 ± 0,08	st
4*	104,40 ± 0,59	4,74 ± 1,48	st
5	94,20 ± 0,54	1,32 ± 2,00	m
6	83,00 ± 1,18	4,03 ± 1,39	st
7	58,60 ± 0,23	1,56 ± 0,29	m
8	55,96 ± 0,23	1,78 ± 0,29	sm
9	53,20 ± 0,26	1,93 ± 0,28	sm
10	49,30 ± 0,20	1,49 ± 0,15	m
11	48,80 ± 0,40	1,54 ± 0,16	m
12	41,90 ± 0,13	1,63 ± 0,32	m
13	35,00 ± 0,68	1,56 ± 0,25	m

(a) Calculada de acuerdo a Bogart (1970); (b) razón del brazo corto dividido en el brazo largo según Levan et al. (1964); (c) tipos cromosómicos (m = metacéntrico, sm = submetacéntrico, st = subtelocéntrico). *Par con constricción secundaria
 (a) Calculated according to Bogart (1970). (b) ratio of short arm divided into the long arm according to Levan et al. (1964);
 (c) chromosomic types (m = metacentric, sm = submetacentric, st = subtelocentric). *Pair with secondary constriction

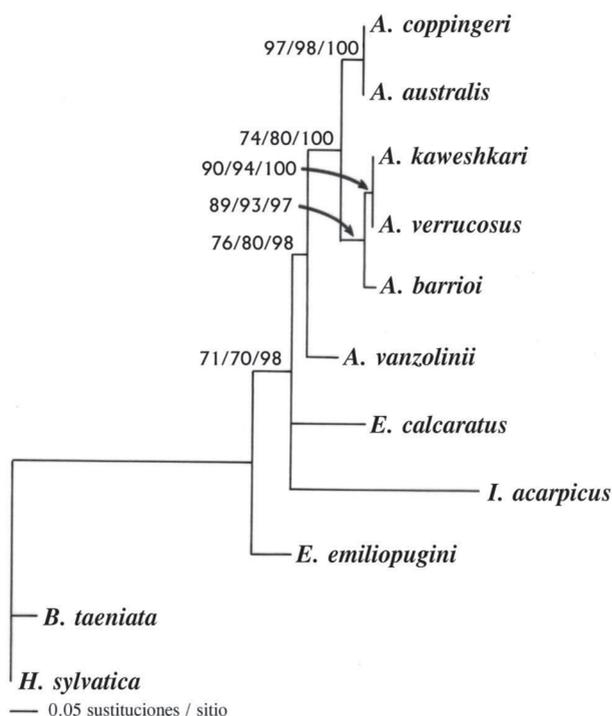


Fig. 7: Arbol de máxima verosimilitud obtenido del análisis de secuencias del citocromo *b* y que muestra las relaciones entre *Alsodes coppingeri* y algunas especies congénicas. Los números sobre cada rama indican el porcentaje de bootstrap obtenido por máxima parsimonia, máxima verosimilitud y la probabilidad a posteriori del análisis bayesiano.

Maximum likelihood tree based on sequence analysis of cytochrome *b*, depicting relationships among *Alsodes coppingeri* and other congeneric species. Numbers above the branches are maximum parsimony, maximum likelihood supports and Bayesian posterior probabilities.

DISCUSIÓN

Identidad genérica de *Alsodes coppingeri*: En opinión de Gallardo (1970) la presencia en machos reproductivamente activos, con espinulación dactilar (dedos I y II) y placas córneas pectorales, cintura pectoral arcífera con xiphisternum distalmente hendido, tímpano invisible y marcado desarrollo de las crestas humerales, son caracteres relevantes que permiten definir al género *Alsodes*. También, *Insuetophrynus acarpicus* presenta caracteres sexuales secundarios similares a las presentes en las especies de *Alsodes*, pero ambos géneros se pueden diferenciar claramente ya que las especies de *Alsodes* poseen un esternón arcífero, mientras que en *Insuetophrynus acarpicus* es finisternio secundario (Barrio 1970). Las especies de *Eupsophus* y *Alsodes* se distinguen entre sí por la forma y distribución de los caracteres sexuales secundarios; en las especies de *Eupsophus* estos tienen forma de almohadilla con espinas diminutas presentes en el dorso del pulgar. El desarrollo de las crestas humerales en los machos de *Alsodes coppingeri* (*cristae medialis*, *lateralis*, y *ventralis*) es un carácter característico del género; en *Insuetophrynus acarpicus* la *crista ventralis* es de tamaño normal y las *cristae lateralis* y *medialis* son insignificantes; en las especies de *Eupsophus* estas crestas están ausentes. En el cráneo de *Insuetophrynus acarpicus* el hueso cuadradoyugal está ausente, pero se presenta en *A. coppingeri* y otras especies congénéricas.

El renacuajo de *Alsodes coppingeri* pertenece al tipo generalizado (Orton 1953) que contrasta con las larvas cavícolas y endotróficas descritas para *Eupsophus roseus* (Formas & Pugín 1978), *E. calcaratus* (Formas 1989a), *E. vertebralis* (Formas 1992) y *E. emiliopugini* (Formas 1989b).

La información cromosómica es un argumento adicional que distingue a *Alsodes coppingeri* de las especies de *Eupsophus*; en estas últimas sus números cromosómicos fluctúan entre $2n = 28$ y $2n = 30$; mientras que en *Alsodes coppingeri* es $2n = 26$, fórmula también presente en otras especies del género (Cuevas & Formas 2005).

El análisis de las secuencias del citocromo *b* muestra que *Alsodes coppingeri* comparte el mismo clado con las otras especies de *Alsodes* analizadas (*A. australis*, *A. barrioi*, *A.*

vanzolinii, *A. verrucosus* y *A. kaweshkari*) diferenciándose claramente de *Eupsophus calcaratus*, *E. emiliopugini* e *Insuetophrynus acarpicus*, las que se ubican en clados diferentes.

Los antecedentes morfológicos de adultos y larvas, cromosómicos y moleculares permiten concluir que el holotipo de *Cacotus coppingeri* Günther 1881 (= *Eupsophus coppingeri*) y los especímenes colectados en la localidad típica (Puerto Río Frío) de esta especie (asignados al comienzo de esta comunicación como una especie del género *Alsodes*), confirman su identidad como un miembro de este género.

Distinción específica de Alsodes coppingeri

Esta especie se diferencia de otras congénéricas por su tamaño reducido (distancia hociclo-cloaca 42,2-44,0 mm; Tabla 3) y carpo no osificado. Este carácter, también ha sido reportado en *Insuetophrynus acarpicus* y algunas especies de *Telmatobius* (Formas et al. 2005). Si aceptamos las proposiciones sistemáticas de Frost et al. (2006) que incluyen a *Insuetophrynus*, *Telmatobius* y *Alsodes* en subfamilias distintas (Ceratophryinae, Telmatobiinae y Cycloramphinae, respectivamente), la ausencia de osificación carpal se propone como un carácter homoplásico para estas especies.

Alsodes coppingeri posee un número diploide y Número Fundamental ($2n = 26$; NF 52) distinto del que poseen otras dos especies con las que previamente había sido confundida: *Alsodes barrioi* ($2n = 34$; NF 52) (Veloso et al. 1981) y *Eupsophus emiliopugini* ($2n = 28$; NF 56) (Formas 1991). Por otro lado comparte el mismo número diploide y Número Fundamental ($2n = 26$; NF 52) con *Alsodes australis*, *A. verrucosus* e *Insuetophrynus acarpicus*. Sin embargo, a pesar de la aparente similitud cariológica las cuatro especies se diferencian en la fórmula cromosómica (número de cromosomas metacéntricos + submetacéntricos + subtelocéntricos) (Tabla 3). Si se considera el número de cromosomas de las especies del género *Alsodes* se pueden distinguir cuatro grupos diferentes: el primero, que incluye las especies que comparten un $2n = 26$ (*Alsodes australis*, *A. gargola*, *A. hugoi*, *A. kaweshkari*, *A. montanus*, *A. tumultuosus*, *A. pehuenche*, *A. vanzolinii*, *A. valdiviensis*, *A. verrucosus* y *A.*

igneus), el segundo con $2n = 22$ (*A. nodosus*), el tercero con $2n = 34$ (*Alsodes barrioi*) y el cuarto con $2n = 30$ (*A. aff. valdiviensis*) (Cuevas & Formas 2005). La presencia de 26 cromosomas en *Alsodes coppingeri* permite ubicar a esta especie en el primer grupo.

El análisis filogenético de las secuencias del citocromo *b* de las especies analizadas (*Alsodes vanzolinii*, *A. barrioi*, *A. verrucosus*, *A. kaweshkari*, *A. australis* y *A. coppingeri*) muestra que *Alsodes coppingeri* se diferencia claramente de casi todas ellas, excepto de *Alsodes australis*; sin embargo, ambas son claramente distintas en tamaño y conformación de su cariotipo. En *Alsodes coppingeri* la distancia hocico-cloaca fluctúa entre 42,0-44,0 mm mientras en *Alsodes australis* varía entre 52,2-56,8 mm (Formas et al. 1997). A pesar que ambas especies comparten el mismo número de cromosomas ($2n = 26$) y Número Fundamental (NF 52) se diferencian en la fórmula cromosómica; *Alsodes coppingeri* tiene ocho pares metacéntricos + dos submetacéntricos + tres subtelo-céntricos; sin embargo *Alsodes australis* posee en su cariotipo siete pares metacéntricos + tres submetacéntricos + tres subtelo-céntricos.

Sinonimia de Alsodes coppingeri

Lynch (1968) al hacer el análisis de los holotipos de *Alsodes monticola* Bell 1843 y *Alsodes coppingeri* (= *Eupsophus coppingeri*) concluyó que ambas especies eran sinónimas; y fundamentó su proposición en caracteres morfológicos (similitud entre ambos holotipos) y geográficos (inclusión de la localidad tipo de *Alsodes monticola* en el rango distribucional de *Eupsophus coppingeri*). Sin embargo, deja su propuesta pendiente hasta que no se colecten nuevos especímenes en las localidades típicas. Veloso et al. (1981) no aceptan la sinonimia propuesta por Lynch (1968), pero están de acuerdo en el modo como abordar el problema; obteniendo nuevos topotipos. La elucidación en este trabajo de la identidad de *Alsodes coppingeri* es un nuevo antecedente que permite reanalizar la sinonimia propuesta y poner a prueba las predicciones deducidas de la hipótesis de Lynch (1968). Si se asume concepto tipológico (esencialista) de especie, único posible de aplicar aquí, una simple comparación entre ambos holotipos bastaría

para aceptar o rechazar la hipótesis. En el caso de *Alsodes coppingeri* analizamos su holotipo y especímenes adicionales colectados en la localidad típica; pero en el caso de *Alsodes monticola* la situación es muy distinta, ya que como señala Lynch (1968): “The holotype was poorly preserved and completely decayed by 1882”. Con el propósito de confirmar el estado de conservación del holotipo consultamos al Dr. Barry Clark, curador de anfibios del Museo Británico, quien nos comunicó en enero de 1996 que: “The type of *Alsodes monticola* is here in the NHM collection (1947.2.19.92) but all is left of this specimen is an almost completely disarticulated skeleton”; situación que es reconfirmada en noviembre de 2000: “My description of the state of the holotype of *Alsodes monticola* was, anything, over-optimistic. It is completely disarticulated and appears to be incomplete”. Estos antecedentes permiten concluir que una comparación morfológica externa entre ambos holotipos es prácticamente imposible. Los fundamentos geográficos de la hipótesis de Lynch (1968) consideran la inclusión de la localidad típica de *Alsodes monticola* en el rango distribucional de *Alsodes coppingeri*; sin embargo, se basa en los patrones distribucionales proporcionados por Grandison (1961) y Cei (1960, 1962a, 1962b), que como ya vimos, se sustentan en antecedentes taxonómicos equivocados. La elucidación de la identidad de *Alsodes coppingeri* y su distribución restringida solo a su localidad típica, permiten señalar que ambos taxa no superponen sus rangos de distribución, ya que de acuerdo a Bell (1843) la localidad típica de *Alsodes monticola* es la isla Inchy, archipiélago de los Chonos, parte norte del Cabo de Tres Montes (aproximadamente 250 km al norte de Puerto Río Frío, localidad típica de *Alsodes coppingeri*). Se hicieron numerosos esfuerzos destinados a obtener especímenes de *Alsodes monticola* provenientes de su localidad típica, sin embargo, su exacta ubicación ha sido infructuosa en mapas recientes.

En resumen, el único material disponible para reanalizar la sinonimia entre *Alsodes monticola* y *Alsodes coppingeri* es la descripción dada por Bell (1843) para *Alsodes monticola* y la información entregada en este trabajo para *Alsodes coppingeri*. De la primera podemos rescatar dos caracteres (extensión de la membrana entre los ortojos y patrón de

coloración). De acuerdo a la descripción original y el estudio de Lynch (1968) la extensión de la membrana entre los ortijos llega hasta la unión de las falanges segunda y tercera (“toes webbed as far as the joint of the second and third phalanges”); en *Alsodes coppingeri* esta membrana tiene poca extensión y no sobrepasa el tercio proximal de la primera falange (Fig. 2F). Bell (1843) describe la coloración dorsal de *Alsodes monticola* de la siguiente manera: “On the centre of the back a strong tinge of grass green, shading on the sides into a yellowish brown; iris coppery”. En los especímenes de *Alsodes coppingeri* nunca observamos la coloración descrita por Bell (1843) para *Alsodes monticola*; excepto la coloración del iris; sin embargo, el color cobrizo de esta estructura es común a otras especies de *Alsodes*. Finalmente, y basados en el reanálisis de los antecedentes disponibles, concluimos que *Alsodes monticola* y *Alsodes coppingeri* son especies válidas y en ese sentido apoyamos la proposición de Veloso et al. (1981) de rechazar la hipótesis de sinonimia propuesta por Lynch (1968).

Alsodes coppingeri posee un reducido rango de distribución geográfica correspondiente solo a su localidad típica (Puerto Río Frío); por eso consideramos que la Isla Grande de Chiloé (Veloso & Navarro 1988) no debe considerarse como la tierra típica de esta especie. La presencia de tres especies de *Alsodes* (*Alsodes australis*, *A. kaweshkari* y *A. verrucosus*) en áreas muy cercanas a la localidad típica de *Alsodes coppingeri* sugiere la existencia de un centro de diferenciación específica en el límite distribucional austral del género *Alsodes*; esta particular situación contrasta con el extremo distribucional boreal (Chile Central) del género, en la que se ha reportado una sola especie (*Alsodes nodosus*, CeI 1962b).

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a los siguientes curadores que nos facilitaron valioso material bajo su custodia: Dr. Barry Clarke (British Museum, Londres), Dr. Charles Myers (American Museum of Natural History, New York), Dr. Franz Tiedemann (Naturhistorisches Museum, Viena), Dr. Harold K. Voris (Field Museum of Natural History, Chicago) y Dr.

Herman Núñez (Museo Nacional de Historia Natural, Santiago). Dos árbitros anónimos dieron útiles sugerencias al manuscrito. Nuestra especial gratitud al Dr. Barry Clarke (British Museum, Londres) por sus observaciones del holotipo de *Alsodes monticola*. Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONDECYT), proyecto N° 1000426 (J. Ramón Formas).

LITERATURA CITADA

- ALFARO ME & JP HUELSENBECK (2006) Comparative performance of Bayesian and AIC-based measures of phylogenetic model uncertainty. *Systematic Biology* 55: 89-96.
- ALTIG R & GF JOHNSTON (1989) Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphology, and habitats. *Herpetological Monographs* 3:81-109.
- ALTIG R & RW McDIARMID (1999) Body plan: development and morphology. En: McDiarmid RW & R ALTIG (eds) *Tadpoles: the Biology of anuran larvae*: 24-51. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- BALAKRISHNAN R (2005) Species concepts, species boundaries and species identification: a view from the tropics. *Systematic Biology* 54: 689-693.
- BARRIO A (1970) *Insuetophrynus acarpicus*, un nuevo leptodactílido finisternio sudamericano (Amphibia: Anura). *Physis* 30: 223-341.
- BELL TH (1843) Reptiles. En: Darwin C (ed) *The zoology of voyage of HMS Beagle, under the command of captain Fitzroy, R.N., during...1832-1836*: 1-51. Smith Elder Publishers, London, United Kingdom.
- BOGART JP (1970) Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. *Cytogenetics* 9: 369-383.
- CAPURRO LF (1958) Lista preliminar de los anfibios de Chile, y breves apuntes sobre su distribución y biología. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 4: 289-299.
- CEI JM (1960) A survey of the leptodactylid frogs genus *Eupsophus* in Chile. *Breviora* 118: 1-13.
- CEI JM (1962a) El género *Eupsophus* en Chile. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 7: 7-42.
- CEI JM (1962b) *Batrachios de Chile*. Editorial Universidad de Chile, Santiago, Chile. 128 pp.
- CUEVAS CC & JR FORMAS (2005) Novel diploid number and chromosomal formula in a South American frog of the genus *Alsodes* (Amphibia, Leptodactylidae). *Italian Journal of Zoology* 72: 87-91.
- DÍAZ NF & H NÚÑEZ (1988) Nuevo hallazgo de *Alsodes verrucosus* (Philippi, 1902) en Chile y descripción de su larva (Anura: Leptodactylidae). *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural (Chile)* 41: 87-94.
- DI CASTRI F (1968) *Esquisse, ecologique du Chili*. En: Deboutville C & E Rappaport (eds) *Biologie de l'Amérique australe: IV*, 7-52. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, Francia.
- FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

- FITCH WM (1971) Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- FORMAS JR (1989a) The tadpole of *Eupsophus calcaratus* in southern Chile. *Journal of Herpetology* 23: 195-197.
- FORMAS JR (1989b) A new species of *Eupsophus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from southern Chile. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 102: 568-576.
- FORMAS JR (1991) The karyotypes of the Chilean frogs *Eupsophus emiliopugini* and *E. vertebralis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 113: 890-899.
- FORMAS JR (1992) The tadpole of *Eupsophus vertebralis* (Anura: Leptodactylidae). *Herpetologica* 48: 115-119.
- FORMAS JR & E PUGIN (1978) Tadpoles of *Eupsophus roseus* and *Bufo variegatus* (Amphibia, Anura) in southern Chile. *Journal of Herpetology* 12: 243-246.
- FORMAS JR, JC ORTIZ & A VELOSO (2005) Sinopsis de los *Telmatobius* de Chile. En: Lavilla E & H De La Riva (eds) Estudios sobre la ranas andinas de los géneros *Telmatobius* y *Batrachophrynus* (Anura, Leptodactylidae): 103-114. Asociación Herpetológica Española, Monografías de Herpetología, Valencia, España.
- FORMAS JR, C UBEDA, CC CUEVAS & J NÚÑEZ (1997) *Alsodes australis*, a new species of leptodactylid frog from temperate *Nothofagus* forest of southern Chile and Argentina. *Studies of Neotropical Fauna and Environment* 32: 200-211.
- FROST DR, T GRANT, J FAIVOVICH, RH BAIN, A HASS, CFB HADDAD, R DE SA, A CHANNING, M WILKINSON, SC DONNELLAN, CHJ RAXWORTHY, J CHAMBELL, BL BLOTTO, P MOLER, RC DREWES, RA NUSSBAUM, JD LYNCH, DM GREEN & WC WHEELER (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297: 1-370.
- GALLARDO JM (1970) A propósito de los *Telmatobiinae* (Anura, Leptodactylidae) patagónicos. *Neotrópica*: 16: 73-85.
- GOSNER KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- GRANDISON AGC (1961) Chilean species of the genus *Eupsophus* (Anura, Leptodactylidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology* 9: 111-149.
- GÜNTHER A (1881) Reptiles and batrachians collected during the survey of H.M.S. Alert on the coast of Patagonia. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1-19.
- HAJEK ER & F DI CASTRI (1975) Bioclimatología de Chile. Dirección de Investigación, Vice-Rectoría Académica, Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 107 pp.
- HILLIS DM & JJ BULL (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 182-192.
- HOLDER M & PO LEWIS (2003) Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics* 4: 275-284.
- HUELSENBECK JP & KA CRANDALL (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 437-466.
- HUELSENBECK JP & F RONQUIST (2005) Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. En: Nielsen R (ed) *Statistical methods in molecular evolution*: 1-53, Springer-Verlag, New York, New York, USA.
- HUELSENBECK JP, F RONQUIST, R NIELSEN & JP BOLBACK (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolution biology. *Science* 294: 2310-2314.
- LEVAN A, K FREDGA & A SANBERG (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas* 52: 201-220.
- LYNCH JD (1968) The identity of the Chilean frog *Alsodes monticola* Bell, and the status of the genus *Alsodes* (Amphibia: Leptodactylidae). *Herpetologica* 24: 255-257.
- LYNCH JD (1975) A new Chilean frog of the extra-andean assemblage of *Telmatobius* (Amphibia: Leptodactylidae). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 74: 160-161.
- MADDISON DR & WP MADDISON (2000) *McClade 4.03*. Sunderland, Sinauer Associates, Massachusetts, USA.
- NIXON KC (1999) The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.
- ORTON GL (1953) The systematics of vertebrae larvae. *Systematic Zoology* 2: 63-75.
- PALUMBI SR (1996) Nucleic acids I: the polymerase chain reaction. En: Hillis DM, C. Moritz & BK Mable (eds) *Molecular systematics*: 205-246. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- PHILIPPI RA (1902) Suplemento de los batraquios chilenos descritos en la historia física y política de Chile de don Claudio Gay. Librería José Ivens, Santiago, Chile. 161 pp.
- POSADA D & KA CRANDALL (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- RONQUIST F (2004) Bayesian inference of character evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 475-481.
- RONQUIST F & JP HUELSENBECK (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- RUFAS JS, P ITURRA, W DE SOUZA & P SPONDA (1982) Simple silver staining procedures for the location of nucleolus and nucleolar organizer under light and electron microscopy. *Archivos de Biología* 93: 267-274.
- SAMBROOK J, EF FRITSH & T MANIATIS (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.
- SIKES DS & PO LEWIS (2001) PAUPRat: a tool to implement parsimony ratchet searches using PAUP*. University of Connecticut, Connecticut, USA.
- SITES JW & J MARSHALL (2003) Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 462-470.
- SONG J & LR PARENTI (1995) Clearing and staining whole fish specimens for simultaneous demonstration of bone, cartilage, and nerves. *Copeia* 1995: 114-118.
- SUMNER AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- SWOFFORD L (2001) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

THOMPSON JD, TJ GIBSON, F PLEWNIAK, F JEAUMUGIN & DG HIGGINS (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies formulating sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

VELOSO A & J NAVARRO (1988) Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de

Chile. *Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturale Torino (Italy)* 6: 481-539.

VELOSO A, N DÍAZ, P ITURRA & M PENNA (1981) Descripción de una nueva especie de telmatobino del género *Alsodes* (Amphibia, Leptodactylidae) de la cordillera de Nahuelbuta (Sur de Chile). *Medio Ambiente (Chile)* 5: 72-77.

ANEXO 1

Material examinado / Material examined

Alsodes coppingeri (= *Eupsophus coppingeri*): BM 80. 728.14.(1947.2.1997) (holotipo).

Alsodes coppingeri: IZUA 3265 (larvas); 3114, 3115, 3122 - 3124 (juveniles); 3298, 3300, 3230 (adultos); IZUA 3298 (tejido muscular adulto).

Alsodes barrioi (= *Eupsophus coppingeri*): CNHM 44219; IZUA 3317 (tejido muscular adulto).

Alsodes australis (= *Eupsophus coppingeri*): ZMB 29470, BM 1958 I.3.97-98, IZUA 3715 (tejido muscular adulto)

Alsodes sp (= *Eupsophus coppingeri*): CNHM 48548.

Alsodes verrucosus (= *Eupsophus coppingeri*): AMNH 52884; IZUA (sin número de catálogo) (musculatura caudal larva).

Alsodes kaweshkari: IZUA 1624 (tejido muscular adulto).

Alsodes vanzolinii: IZUA (sin número de catálogo) (musculatura caudal larva).

Eupsophus calcaratus: IZUA 3494 (tejido muscular adulto).

Eupsophus emiliopugini: IZUA 3474 (tejido muscular adulto).

Batrachyla taeniata: IZUA (sin número de catálogo) (musculatura caudal larva).

Hylorina sylvatica: IZUA (sin número de catálogo) (musculatura caudal larva).

Editor Asociado: Juan Carlos Torres-Mura

Recibido el 23 de abril de 2007; aceptado el 6 de agosto de 2007