

NUEVOS REGISTROS GEOGRÁFICOS DE LA RANA DE PECHO ESPINOSO DE CORDILLERA PELADA, *ALSODES VALDIVIENSIS* FORMAS, CUEVAS & BRIEVA, 2002 (AMPHIBIA: ALSODIDAE) Y EVALUACIÓN DE SU ESTADO DE CONSERVACIÓN

Ángel P. Olivares^{1,2}, Nicolás I. González¹, Soledad Puente-Torres¹, Camilo Contreras-Carrillo^{1,2} & José J. Nuñez^{1,*}

¹Escuela de Ingeniería en Conservación de Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Universidad Austral de Chile.

²Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Campus Isla Teja, Zip Code 5090000, Valdivia, Chile.

* Autor de correspondencia. Email: jjnunezn@gmail.com

Resumen

En este trabajo se reportan dos nuevas localidades para la rana de pecho espinoso de Cordillera Pelada, *Alsodes valdiviensis*, descubiertas durante prospecciones de anfibios y reptiles en la Región de Los Ríos. Los especímenes fueron determinados morfológica y molecularmente. Para ello se tomaron medidas morfométricas de los especímenes y fueron comparadas con aquellas de la literatura. Para los análisis moleculares se amplificó un fragmento de citocromo b mitocondrial y se comparó filogenéticamente con aquellas secuencias disponibles en Genbank. Tanto la determinación morfológica como molecular coincidió con *A. valdiviensis*. Estos nuevos registros de la rana de pecho espinoso de Cordillera Pelada representan una ampliación importante de la distribución geográfica de esta especie, conocida hasta ahora solo de su localidad tipo. Se sugiere, sobre la base de la información geográfica y del estado y riesgos de su hábitat, que esta especie sea considerada en categoría de conservación de En Peligro.

Palabras clave: *Alsodes valdiviensis*, rana de pecho espinoso de Cordillera Pelada, nuevos registros, conservación, Chile.

New geographic records of the Cordillera Pelada spinny chest frog, *Alsodes valdiviensis* Formas, Cuevas & Brieva, 2002 (Amphibia: Alsodidae), and evaluation of its conservation status

Abstract

In this work we report two new localities for the spinny chest frog, *Alsodes valdiviensis* discovered during a survey of amphibians and reptiles in Los Ríos region. Specimens were determined morphologically and molecularly. For this, morphometric measurements of the specimens were taken and compared with those of literature. For molecular analysis, a fragment of mitochondrial cytochrome b was amplified and compared phylogenetically to those sequences available in Genbank. Both morphological and molecular determination coincided with *A. valdiviensis*. These new records represent a significant expansion of the geographical distribution of this species, only known from its type locality so far. Based on geographic

information and state and risks of its habitat, we propose this species to be considered with a conservation status of Endangered.

Key words: *Alsodes valdiviensis*, Cordillera Pelada spinny chest frog, new records, conservation, Chile.

Introducción

Las ranas del género *Alsodes* Bell, 1843 (Alsodidae) se distribuyen en el centro-sur de Chile y a lo largo de la vertiente oriental de los Andes en Argentina (Formas *et al.*, 2002). Este género consta de 15 especies en Chile (Frost, 2014), siendo el taxón de ranas más diverso de este país. Existen evidencias morfológicas, cariológicas y genéticas que sustentan la monofilia del género *Alsodes* (Barrio, 1970; Lynch, 1978; Formas & Vera, 1983; Cuevas, 2008). Por su parte, un análisis molecular que incluyó 13 especies de *Alsodes* (Blotto *et al.*, 2013) también sustentan la monofilia de este género de ranas.

Desde el punto de vista geográfico, aunque no sustentados filogenéticamente, es posible reconocer dos grupos de *Alsodes*. Uno de ellos es de distribución exclusiva en la Cordillera de los Andes (11 especies). El otro grupo (cuatro especies, Tabla 1) es de distribución exclusiva en la Cordillera de la Costa. En las especies de la Cordillera de la Costa es notoria la falta de información sobre distribución geográfica y ecología, siendo la mayoría de éstas conocidas sólo de sus localidades tipo. Por otra parte, varias especies son morfológicamente muy similares, por lo que la determinación específica se hace problemática y propensa a errores (Cuevas, 2013).

Un ejemplo de lo anterior es *Alsodes valdiviensis*. Esta especie fue descrita por Formas *et al.* (2002) y es conocida hasta ahora sólo de la localidad tipo Cerro Mirador (39°57'21,00"S; 72°53'55,29" W; 1.100 msnm) a 60 km W de La Unión (por carretera) en la Cordillera Pelada, provincia de Valdivia, Chile. Según la IUCN (2012), esta especie está considerada en la categoría de Datos Insuficientes (DD), ya que hay escasa información sobre su distribución, biología y requerimientos ecológicos.

En este trabajo se reportan dos nuevas localidades para *A. valdiviensis*, una de éstas al límite Oriental de la Cordillera de la Costa con la Depresión Intermedia. Adicionalmente se hace una proposición sobre el estado de conservación de esta especie a través de las categorías y criterios de la lista roja de la UICN versión 3.1 (2001, 2003) y la metodología estandarizada para anfibios y reptiles de Giraud *et al.* (2012).

Materiales y Métodos

Las prospecciones se hicieron 1) durante prospecciones de anfibios y reptiles requerido por el Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (SEIA) en el sector de Reumén (39°57'21,00"S; 72°53'55,29" W) y 2) un relevamiento de anfibios en la localidad de Raulintal (40°11'38,85"S; 73°26'5,50" W), Región de Los Ríos (Fig. 1). El método de prospección fue el de relevamiento por encuentros visuales (REV, Crump & Scott, 1994), realizando búsquedas de manera azarosa en lugares posibles donde se puedan encontrar los animales. Los muestreos fueron realizados en cada localidad por dos personas, durante cuatro horas a partir de las 09:00 AM.

Tabla 1. Especies de *Alsodes* que habitan en la Cordillera de la Costa. NT: Casi amenazada, CR: Peligro Crítico, VU: Vulnerable, DD: Datos Insuficientes. Estados de Conservación según IUCN (2012).

Table 1. *Alsodes* species that inhabit at the Coastal Range of Chile. NT: Near Threatened, CR: Critically Endangered VU: Vulnerable, DD: Data Deficient. Status Conservation according to the IUCN red list (2012).

Especie	Nombre común	Distribución	Estado de Conservación
<i>A. vanzolinii</i>	Rana de pecho espinoso de Vanzolini	Ramadillas, Chauras de Laraquete y Cuyinco Alto, Región del BíoBío	CR
<i>A. barrioi</i>	Rana de pecho espinoso de Barrio	Estero Cabrería, Parque Nacional Nahuelbuta y Rucapehuén, Región del BíoBío	VU
<i>A. norae</i>	Rana de pecho espinoso de Nora	Cerro Oncol, Cordillera de la Costa de Valdivia, Región de los Ríos	DD
<i>A. valdiviensis</i>	Rana de pecho espinoso de Valdivia	Cerro Mirador, Cordillera Pelada, Región de Los Ríos	DD

Los especímenes de la localidad de Raulintal fueron fotografiados y luego liberados. Los especímenes de la localidad de Reumén fueron medidos con un calibrador vernier (0,01 mm precisión). Utilizando guantes desechables se tomaron muestras de hisopado bucal para análisis genéticos. Para esto, se utilizaron hisopos (14,5 cm de largo) con tórula de algodón (longitud de 13,5 mm y ancho de 3 mm) de acuerdo a Pidancier *et al.* (2003).

El ADN total se extrajo desde los hisopos utilizando el método fenol/proteínasa K (Sambrook *et al.*, 1989). Se amplificó un fragmento de citocromo b (cyt b) para todas las muestras a través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) con los partidores MVZ15-L (Moritz *et al.*, 1992) y CytbAR-H (Goebel *et al.*, 1999). Se siguieron los protocolos de PCR de acuerdo a Blotto *et al.*, (2013) y las secuencias obtenidas se depositaron en GenBank. A continuación, se realizó un análisis filogenético utilizando MrBayes ver. 3,2 (Ronquist *et al.*, 2012) y el modelo de sustitución general tiempo reversible (GTR) con la tasa de heterogeneidad gamma entre sitios (gamma = 0,1800). Para efectos comparativos, se usaron secuencias de *A. valdiviensis*, *Alsodes verrucosus*, *Alsodes coppingeri*, *Alsodes hugoi*, *Alsodes tumultuosus*, *Alsodes pehuenche*, *Alsodes barrioi*, *Alsodes igneus*, *Alsodes gargola*, *Alsodes norae*, *Alsodes vanzolinii* y *Alsodes nodosus* disponibles en GenBank. Cada cadena de Markov se inició a partir de un árbol al azar y las corridas fueron hechas por $1,0 \times 10^7$ generaciones muestreando cada 1.000 generaciones. Todos los puntos muestreados antes de alcanzar la fase estacionaria fueron descartados como "burn-in", y los árboles restantes fueron combinados para encontrar la probabilidad *a posteriori* de la filogenia. Los análisis se repitieron tres veces para confirmar que todos ellos convergieran en el mismo resultado. *Eupsophus calcaratus* fue usado para enraizar los árboles.

El proceso de categorización se hizo de acuerdo a las Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN, versión 3.1 (UICN 2001) y las directrices para emplear los criterios de la Lista Roja de la UICN a nivel nacional y regional, versión 3.0. (UICN 2003). Para ello se analizaron los parámetros para las categorías de En Peligro Crítico, En Peligro y Vulnerable. Además se categorizó a la especie según los criterios indicados por Giraudo *et al.* (2012) con el fin de comparar el resultado de ambas metodologías.

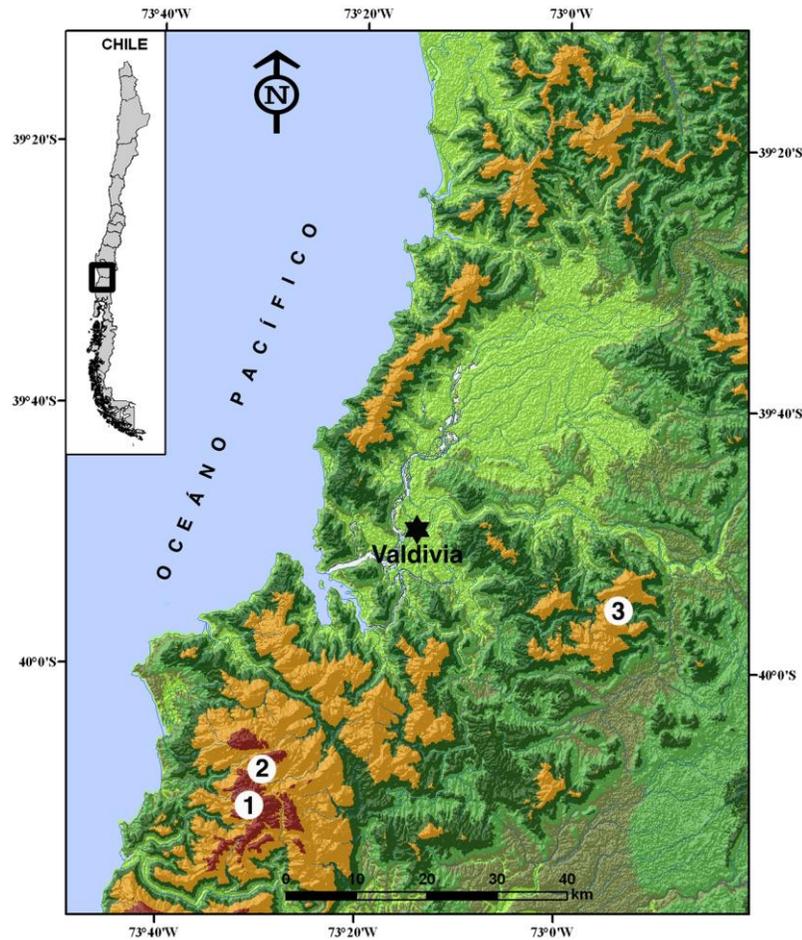


Figura 1. Distribución geográfica actualmente conocida de *Alsodes valdiviensis*. 1: Cerro Mirador (Localidad Tipo), 2: Raulintal, 3. Reumén.

Figure 1. Geographical distribution currently known of *Alsodes valdiviensis*. 1: Cerro Mirador (Type Locality), 2: Raulintal, 3. Reumén.

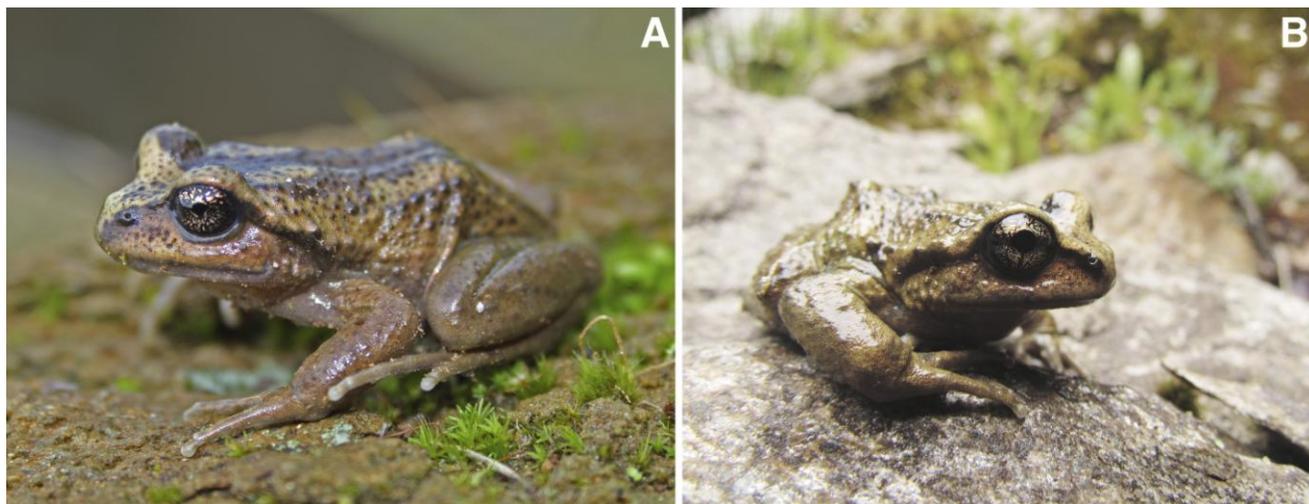


Figura 2. A, Macho de *Alsodes valdiviensis* de Reumén. B, Macho de *Alsodes valdiviensis* de Raulintal, Región de Los Ríos, Chile, Junio 2013.

Figure 2. A, Male of *Alsodes valdiviensis* from Reumen. B, Male of *Alsodes valdiviensis* from Raulintal, Los Ríos Region, Chile, June 2013.

Resultados

Los atributos presentados por los ejemplares encontrados tanto en Reumén (Figura 2A) como en Raulintal (Figura 2B) coincidieron con el patrón morfológico y de coloración de *A. valdiviensis* dados por Formas *et al.* (2002). No obstante, la variabilidad de patrones presentados por los especímenes de Reumén no permitió una clara diferenciación con respecto a *A. verrucosus* o *A. coppingeri*, dada la similitud morfológica entre tales especies. Las tres secuencias de citocromo *b* obtenidas de estos especímenes fueron 97,7% similares entre ellas. Con respecto al árbol resultante del análisis filogenético (Figura 3), las secuencias se anidaron dentro de un clado bien soportado que incluyó a las demás secuencias de *A. valdiviensis* topotípicos disponibles en GenBank. De lo anterior es posible concluir que los especímenes de *Alsodes* de Reumén corresponden a *A. valdiviensis* Formas, Cuevas & Brieva, 2002. Las medidas morfométricas se muestran en la Tabla 2 y también coinciden con el patrón morfométrico dado por Formas *et al.* (2002). Otras especies de anfibios encontradas en el sector de Reumén fueron *Batrachyla leptopus* y *E. calcaratus*. En el sector de Raulintal se encontró además *Rhinoderma darwinii*, *Eupsophus emiliopugini* y *E. calcaratus*.

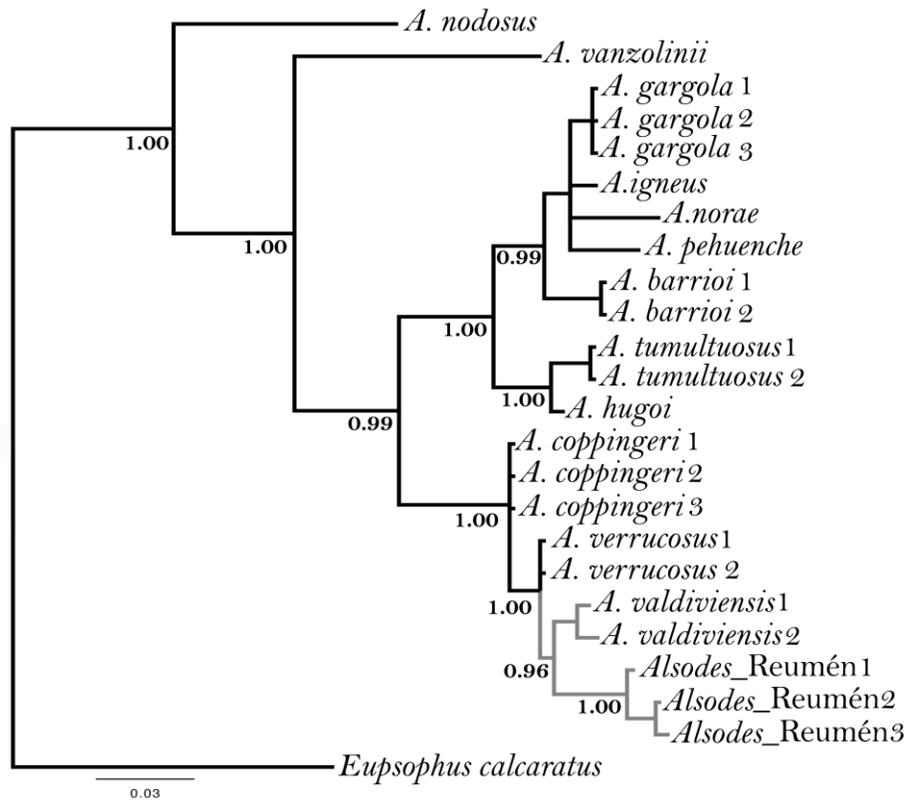


Figura 3. Árbol filogenético Bayesiano inferido a partir de secuencias de especies de *Alsodes* disponibles en GenBank y de los especímenes de Reumén (en gris). Los números en los nodos representan las probabilidades *a posteriori* de cada clado.

Figure 3. Bayesian phylogenetic tree inferred from sequences of *Alsodes* species available in GenBank, and specimens of Reumén (gray). The numbers at the nodes represent posterior probabilities of each clade.

La clasificación del estado de conservación de *A. valdiviensis* resultó en igual categoría tanto con los criterios de UICN (2001), como con aquellos señalados por Giraudo *et al.* (2012). Para los criterios de UICN (2001) consideramos a la especie distribuida en un área de extensión de aproximadamente 1.660 km². Según los criterios de UICN (2001), la especie presenta las siguientes características: rango geográfico estimado en menos de 5.000 km² (B1), con localidades severamente fragmentadas (a) y no más de cinco localidades conocidas con alto riesgo de pérdida de extensión y calidad de hábitat (biii). Según esta metodología, la especie cumple con los criterios B1ab(iii), correspondiendo a la categoría de En Peligro. Del mismo modo, con el método propuesto por Giraudo *et al.* (2012) la ponderación de las variables (Tabla 3) resultó en 21, lo que clasifica a la especie en la categoría de En Peligro.

Discusión

El conocimiento de la riqueza de especies de anfibios en la Región de Los Ríos proviene de trabajos realizados por Formas (1995), Mendez *et al.* (2005), Cuevas (2008) y Díaz-Páez *et al.* (2008). Recientemente, estudios sobre diversidad de anfibios de esta región han sido publicados por Nuñez *et al.* (2012) y Rabanal & Nuñez (2012), que han permitido incrementar el número de especies conocidas para la región. De hecho, hasta la fecha se ha registrado un total de 19 especies de anfibios, 15 de las cuales habitan en la Cordillera de la Costa y cinco de éstas son endémicas de esta cordillera: *A. norae*, *A. valdiviensis*, *Eupsophus altor*, *Eupsophus migueli* e *Insuetophrynus acarpicus*.

Tabla 2. Medidas (mm) de los tres especímenes de *Alsodes valdiviensis* muestreados en Reumén, región de los Ríos, Chile.

Table 2. Measurements (mm) of the three specimens of *Alsodes valdiviensis* sampled in Reumén, los Ríos region, Chile.

Carácter	1	2	3
Distancia hocico-cloaca	32,02	31,87	42,07
Largo de la cabeza	12,34	11,83	16,37
Ancho de la cabeza	12,81	12,46	15,84
Distancia interocular	5,38	6,00	6,96
Distancia narina-ojo	2,28	2,54	3,42
Distancia internarial	2,46	2,96	3,34
Diámetro horizontal del ojo	3,82	4,51	4,77
Largo de la pierna	14,92	14,68	19,23
Largo del pie	21,47	23,46	31,12

En el contexto de la distribución de anfibios en la región, el presente estudio entrega dos nuevos registros geográficos para *A. valdiviensis*, uno de ellos al límite de la Cordillera de la Costa con la Depresión Intermedia, extendiendo su actual rango de distribución aproximadamente 60 km (en línea recta) hacia el noreste de su localidad tipo (Fig. 1). Los individuos ubicados en Reumén parecen corresponder geográficamente al límite oriental de distribución de esta especie, ya que el hábitat de *A. valdiviensis* corresponde a arroyos de montaña en bosques húmedos de *Nothofagus* sobre los 280 msnm (Formas *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 2005), ambientes ausentes en las zonas más orientales a Reumén. Los especímenes fueron encontrados bajo troncos en un área ecotonal entre cultivos de *Pinnus radiata*, *Eucaliptus globulus* y remanentes de bosque de *Nothofagus*, aproximadamente a 150 m de un estero de caudal moderado. El análisis filogenético (Fig. 3) mostró que los especímenes de Reumén se anidan dentro del clado de *A. valdiviensis*, siendo este clado parafilético respecto a *A. verrucosus* y a *A. coppingeri*, lo que indica que estas especies son muy similares genéticamente, tal como lo señalado por Blotto *et al.* (2013).

Los hallazgos aquí reportados, en especial el de Reumén proveen de información adicional acerca del hábitat y ecosistemas donde ocurre *A. valdiviensis*, sugiriendo la potencial presencia de esta especie en otras localidades de la Región de Los Ríos. De hecho, considerando que probablemente los registros de Méndez *et al.* (2005) para *Alsodes monticola* tales como Namul Malal (40°25'S; 73°30' W) y Catrihuala (40°48'S; 73°37'W) corresponden a *A. valdiviensis*, en tal caso la distribución de esta especie sería la segunda más amplia de las especies de *Alsodes*, después de *A. nodosus*. No obstante, la inclusión de estas poblaciones no altera la categorización de En Peligro de esta especie.

Por otra parte, no cabe duda que la situación de *A. valdiviensis* puede verse agravada por otros factores tales como el efecto de taxones introducidos como el visón (*Neovison vison*), jabalí (*Sus scrofa scrofa*), que se ha demostrado se alimentan de anfibios (Skewes *et al.*, 2007) y patógenos tales como el quitridio (*Batrachochytrium dendrobatidis*) reportado en anfibios chilenos (Bourke *et al.*, 2011, Soto-Azat *et al.*, 2013) y recientemente a *Ranavirus* (Soto-Azat, comunicación personal). Estos antecedentes pueden ser considerados un argumento válido para la evaluación de la diversidad genética, identidad, historia natural, conectividad y resiliencia de esta especie en el contexto del impacto humano dado por la severa fragmentación y pérdida de sus hábitats originales por cambios de uso de suelo. Esto permitiría planificar acciones de conservación estratégicas para proteger esta especie y su hábitat tanto en áreas privadas protegidas, como en otras áreas no protegidas de la Región de Los Ríos.

Tabla 3. Valores resultantes para las variables indicadas en Giraudo *et al.* (2012). La suma de las valoraciones es 21.

Table 3. Resulting values for the variables listed by Giraudo *et al.* (2012). The sum of the rating is 21.

Variable	Abreviatura	Valor	Justificación
Distribución nacional y grado de endemismo	DINAC	4	Endemismos de un sector dentro de una ecorregión o subregión
Rareza Ecológica	RARECOL	4	Especialista en hábitat y sustrato, con tendencia a la especialización en alimentación
Efectos humanos	EFHU	5	Destrucción del hábitat, afectada por especies exóticas y disminución en áreas con modificaciones antropogénicas
Potencial reproductivo	POTRE	5	Especies con menos de 100 huevos
Tamaño	TAM	1	Especies entre 41–80 mm
Abundancia	ABUND	2	Escasa, pero registrada en la última década (si fue buscada adecuadamente)

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Paula Miranda y Aracely Soto por información respecto a los anfibios de Raulintal. Los hallazgos en Reumén fueron hechos en parte dentro del Estudio de Línea Base sector de trazado de Línea Ciruelos-Pichirropulli realizado por SGA Ltda. Las prospecciones se hicieron bajo el permiso SAG n. 683/2013. Los autores desean agradecer también los comentarios de los Dres. Boris Blotto y Claudio Soto-Azat por los valiosos comentarios a este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Barrio, A., 1970. *Insuetophrynus acarpicus*, un nuevo Leptodactilido firmisternio secundario (Amphibia, Anura). *Physis*, 30: 331–341.
- Blotto, B., J. J. Nuñez, N. Basso, C. Ubeda, W. Wheeler, J. Faivovich, 2013. Phylogenetic relationships of a Patagonian frog radiation, the *Alsodes* + *Eupsophus* clade (Anura: Alsodidae), with comments on the supposed parahyly of *Eupsophus*. *Cladistics*, 2013: 113–131.
- Bourke, J., T. Ohst, Y. Graser, W. Bohme & J. Plotner, 2011. New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Chilean frogs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95: 259–261.
- Crump, M. & N. Scott, 1994. Visual Encounter Surveys. pp 84–92. In: Heyer, W. and others (eds). *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Inst. Press, Washington.
- Cuevas, C. C., 2008. A new species of the genus *Alsodes* (Anura: Neobatrachia) from the *Nothofagus* forest, Coastal Range, Southern Chile, identified by its karyotype. *Zootaxa*, 1771: 43–53.
- Cuevas, C. C., 2013. Análisis taxonómico de *Alsodes nodosus* (Duméril & Bibron, 1841) (Amphibia: Neobatrachia): Antecedentes morfológicos y moleculares. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Valdivia- Chile. Pp. 141.
- Díaz-Páez H., J. Núñez, H. Núñez & J. C. Ortíz, 2008. Conservación de anfibios y reptiles. Pp. 233–267. En: Vidal MA & A Labra (eds), *Herpetología de Chile*. Science Verlag, Santiago, Chile.
- Formas, J. R., 1995. Anfibios. Pp. 314–325 en Simonetti, JA, MTK Arroyo, AE Spotorno & E Lozada (eds.) *Diversidad Biológica de Chile*. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Santiago. xii + 364 pp.
- Formas, J. R. & M. I. Vera, 1983. Karyological relationships among frogs of the genus *Alsodes*, with description of the karyotypes of *A. vanzolinii* and *A. verrucosus*. *Copeia*, 1983: 1104–1107.
- Formas, J. R., C. C. Cuevas, & L. M. Brieva, 2002. A new species of *Alsodes* (Anura: Leptodactylidae) from Cerro Mirador, Cordillera Pelada, southern Chile. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 115: 708–719.
- Formas, J. R., 2004. *Alsodes valdiviensis*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.iucnredlist.org. Downloaded on 6 may 2014.
- Frost, D. R., 2014. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (6 may 2014). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

- Giraudó, A. R., M. Duré, E. Schaefer, J. N. Lescano, E. Etchepare, M. S. Akmentis, S. N. Natale, V. Arzamendia, G. Bellini, R. Ghirardi & M. Bonino, 2012. Revisión de la metodología utilizada para categorizar especies amenazadas de la herpetofauna Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 26(1): 117–130.
- Goebel A. M., J. M. Donnelly & M. E. Atz, 1999. PCR primers and amplification methods of 12S ribosomal DNA, control region, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11: 163–199.
- IUCN, 2012. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org.
- Lynch, J. D., 1978. A re-assessment of the telmatobiine leptodactylid frogs of Patagonia. *Occasional Papers of the Museum of Natural History, The University of Kansas*, 72: 1–57.
- Méndez, M., E. Soto, F. Torres-Perez & A. Veloso, 2005. Anfibios y Reptiles de los Bosques de la Cordillera de la Costa (X Región, Chile) 441–449p. En: Smith C, Armesto J, & C. Valdovinos (eds). *Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Moritz, C., C. J. Schneider & D. B. Wake, 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatinae schscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, 41: 273–291.
- Núñez, J. J., F. Rabanal & R. Formas, 2012. Description of a new species of *Eupsophus* (Amphibia: Neobatrachia) from the Valdivian Coastal range, Southern Chile: an integrative taxonomic approach. *Zootaxa*, 3305: 53–68.
- Pidancier, N., C. Miquel & C. Miaud, 2003. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetological Journal*, 13: 175–178.
- Rabanal, F. E. & J. J. Nuñez, 2009. *Anfibios de los Bosques Templados de Chile*. Valdivia, Universidad Austral de Chile. 206 p.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard & J. P. Huelsenbeck, 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61: 539–542.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Skewes, O., R. Rodríguez & F. Jaksic, 2007. Ecología trófica del jabalí europeo (*Sus scrofa*) silvestre en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 80: 295–307.
- Soto-Azat, C., A. Valenzuela-Sanchez, B. Collen, J. M. Rowcliffe, A. Veloso & A. Cunningham, 2013. The Population Decline and Extinction of Darwin's Frogs. *PLoS ONE*, 8: e66957. doi:10.1371/journal.pone.0066957.
- IUCN, 2001. Categorización y criterios de la lista roja de la UICN: Versión 3.1. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Suiza y Cambridge.
- IUCN, 2003. Directrices para emplear los criterios de la Lista Roja de la UICN a nivel nacional y regional: Versión 3.0. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Suiza y Cambridge.