

UCH-FC
MAG-EBE
C824
C-1

**RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS LEPTODACTÍLIDOS CHILENOS
(AMPHIBIA, ANURA): UNA APROXIMACIÓN MOLECULAR BASADA EN
LOS GENES MITOCONDRIALES 12S Y 16S**



Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias
por

Claudio Luis Correa Quezada

Enero, 2006

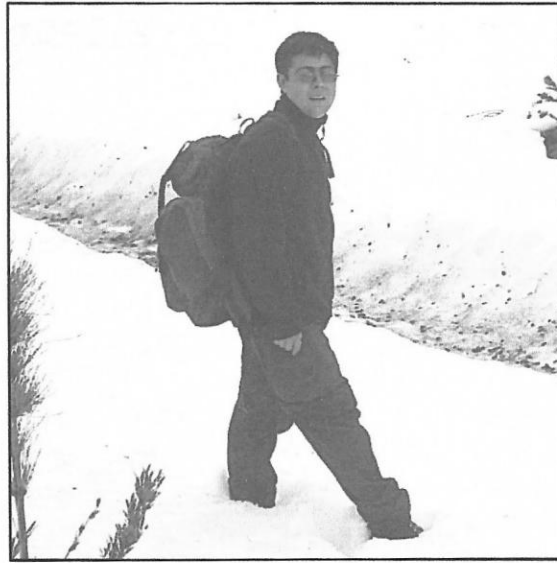


Director de Tesis: Dr. Marco Méndez T.

Codirector: Prof. Alberto Veloso M.

Dedicado a mi familia, mi polola, mis amigos, mis maestros y compañeros.





Este es un relato de cómo llegué a ser estudiante del Programa de Doctorado en Ecología y Biología Evolutiva.

Nací el 6 de agosto de 1972 en Santiago, donde he vivido toda mi vida. Mi infancia fue relativamente tranquila por lo que tengo pocos recuerdos de esa época. A temprana edad mi padre me enseñó a leer y a escribir, lo que me permitió adquirir pronto un hábito de lectura que mantengo desde ese tiempo. Un acontecimiento importante de este periodo fue la separación de mis padres, lo que determinó que en los años siguientes me cambiara muchas veces de casa y de colegio. Durante este tiempo desarrollé un interés por los animales. No era un interés afectivo, sino que me llamaba la atención por qué existían tantas especies. Mi fascinación por esta diversidad creció cuando mi madre me compró los primeros libros de animales, los cuales aún conservo (debo haber tenido como diez años).

Mi adolescencia fue más ajetreada, aunque nunca dejé de leer novelas y hojear mis enciclopedias. Disfruté de mucha libertad, que en ciertos momentos se transformó en libertinaje. De este periodo tengo intensos recuerdos, de cosas buenas y malas. Salí del colegio en 1989 sin una idea clara de qué es lo que quería hacer de mi vida. Los años siguientes fueron los más inciertos, desordenados y oscuros de mi vida. Por eso estudié Química y Farmacia y luego Pedagogía en Biología, pero no terminé ninguna de las dos carreras. Lo único positivo de este periodo fue conocer a mi actual pareja, Beatriz Vanin, en 1994.

Al año siguiente me enteré de que había una carrera nueva en la Universidad de Chile: Biotecnología. Me pareció una posibilidad interesante, dado mi interés en el área biológica. Mis padres me apoyaron nuevamente en mis estudios, pero al poco tiempo me di cuenta que no era lo que realmente quería. Sin embargo, dada mi edad y que no había hecho nada concreto en mi vida, decidí terminar esta carrera. Antes de terminar los cursos se me ocurrió tomar el curso electivo de Evolución y eso fue lo que cambió el rumbo de mi vida. Comprendí que esta teoría explicaba cómo podía producirse toda la diversidad que me había impresionado desde mi niñez. Sólo faltaba un eslabón, lo cual también sucedió por casualidad. Conocí a alguien que trabajaba en sistemática de especies chilenas de *Bufo*, Marco Méndez, y le pregunté si podía hacer mi tesis de Pregrado con él. Él aceptó y desde ese tiempo hemos trabajado juntos.

Como se puede apreciar, esta tesis es el resultado de algunos sucesos fortuitos, pero también es el producto de un gran esfuerzo, así como un reflejo de mi madurez y del interés que siempre he tenido en la biodiversidad.

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 SISTEMÁTICA DE LOS ANUROS.....	2
1.2 LOS LEPTODACTÍLIDOS.....	3
1.3 TAXONOMÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ANFIBIOS CHILENOS.....	9
1.4 SISTEMÁTICA DE LOS TELMATOBINOS.....	12
1.5 UNA APROXIMACIÓN MOLECULAR A LA SISTEMÁTICA DE LOS TELMATOBINOS.....	15
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	18
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 MATERIAL DE ESTUDIO.....	19
3.1.1 Especies de anfibios chilenos.....	19
3.1.2 Otras especies de leptodactílidos.....	19
3.1.3 Especies del grupo externo.....	20
3.2 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS.....	23
3.2.1 Extracción de DNA.....	23
3.2.2 Elección de los genes.....	23
3.2.3 Condiciones de PCR.....	24
3.2.4 Purificación y secuenciación.....	24
3.2.5 Edición y comparación de las secuencias.....	25
3.3 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.....	25
3.3.1 Alineamientos.....	25
3.3.2 Prueba ILD o de homogeneidad de particiones.....	28
3.4 RECONSTRUCCIONES FILOGENÉTICAS.....	28
3.4.1 Elección de métodos.....	28
3.4.2 Soporte estadístico.....	29
3.4.3 Análisis por máxima parsimonia (MP).....	30
3.4.4 Máxima verosimilitud (MV).....	32
3.4.5 Inferencia bayesiana (IB).....	33



4. RESULTADOS.....	35
4.1 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS.....	35
4.1.1 Amplificación por PCR.....	35
4.1.2 Secuenciación y edición.....	35
4.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	35
4.2.1 Alineamientos.....	35
4.2.2 Prueba de homogeneidad de particiones.....	36
4.3 RECONSTRUCCIONES FILOGENÉTICAS.....	37
4.3.1 Máxima parsimonia (MP).....	37
4.3.2 Máxima verosimilitud (MV).....	38
4.3.3 Inferencia bayesiana (IB).....	38
4.3.4 Topologías de MP, MV e IB.....	38
5. DISCUSIÓN.....	43
5.1 UTILIDAD DE LOS GENES 12S Y 16S.....	43
5.2 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS TELMATOBINOS.....	45
5.3 CONSIDERACIONES BIOGEOGRÁFICAS.....	50
5.4 UNA NUEVA PERSPECTIVA PARA LA SISTEMÁTICA DE LOS LEPTODACTÍLIDOS CHILENOS.....	54
6. CONCLUSIONES.....	56
7. BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXO 1.....	64



LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Especies de leptodactílidos chilenos incluidos en este estudio.....	21
Tabla 2: Especies de leptodactílidos y de otras familias de los cuales se obtuvieron secuencias publicadas de los genes 12S y 16S.....	22
Tabla 3: Parámetros descriptivos de los análisis de MP de los tres alineamientos de los genes 12S y 16S combinados.....	37



LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Hipótesis filogenéticas propuestas para Leptodactylidae y Telmatobiinae por diversos autores.....	6
Figura 2: Distribución de la subfamilia Telmatobiinae y el género leptodactilino <i>Pleurodema</i>	11
Figura 3: Uno de los 18 cladogramas obtenidos por parsimonia utilizando 837 sitios nucleotídicos de los genes 12S y 16S de 46 <i>taxa</i>	40
Figura 4: Árbol de máxima verosimilitud construido con 837 sitios nucleotídicos de los genes 12S y 16S de 46 <i>taxa</i>	41
Figura 5: Árbol consenso de inferencia bayesiana construido con 837 sitios nucleotídicos de los genes 12S y 16S de 46 <i>taxa</i>	42



RESUMEN

La mayoría de los anfibios chilenos pertenece a la subfamilia Telmatobiinae (Anura, Leptodactylidae), la cual está constituida por 12 géneros que se distribuyen principalmente en el suroeste de Sudamérica y la cordillera de los Andes. Estudios sistemáticos de los leptodactílidos, basados principalmente en caracteres morfológicos, ubican a Telmatobiinae en una posición basal en la filogenia de la familia. Por otra parte, los estudios filogenéticos de los telmatobinos concuerdan al reconocer a esta subfamilia como un grupo natural (monofilético), pero difieren en las relaciones inferidas entre los géneros que la componen. Además, algunos de estos estudios sugieren relaciones de algunos telmatobinos con especies de otras subfamilias de leptodactílidos, entre los cuales se incluye el género leptodactilino *Pleurodema* que también se encuentra en Chile. Sin embargo, estos últimos antecedentes no fueron considerados en estudios sistemáticos posteriores de los telmatobinos, debido a que en la mayoría se incluyeron sólo *taxa* de esta subfamilia.

En este trabajo se estudiaron las relaciones filogenéticas de los leptodactílidos chilenos utilizando secuencias de DNA de los genes ribosomales mitocondriales 12S y 16S, para establecer la posición de estas especies con respecto a las otras subfamilias de la familia. Se incluyeron 22 especies chilenas de nueve de los diez géneros de telmatobinos representados en Chile (*Alsodes*, *Atelognathus*, *Batrachyla*, *Caudiverbera*, *Eupsophus*, *Hylorina*, *Insuetophrynus*, *Telmatobufo* y *Telmatobius*) y dos especies del género *Pleurodema*. Se incluyeron además 17 especies de las otras cuatro subfamilias reconocidas al interior de Leptodactylidae y tres especies adicionales del género *Telmatobius* de otros países de Sudamérica. Las

reconstrucciones filogenéticas se realizaron utilizando los métodos de máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana.

Todos los análisis mostraron una topología similar para los nodos basales y terminales indicando que Telmatobiinae no conforma un grupo monofilético ni ocupa la posición basal en la filogenia de la familia. La señal contenida en ambos genes permitió distinguir eventos de divergencia tempranos en la diversificación de la familia, así como eventos más recientes a nivel intragenérico. Los datos moleculares respaldan algunas agrupaciones basadas en otro tipo de evidencia (*Caudiverbera-Telmatobufo*, *Alsodes-Eupsophus* y *Batrachyla-Hylorina*) y plantean nuevas hipótesis de relaciones para algunos géneros de telmatobinos: la agrupación de *Atelognathus* con *Batrachyla* e *Hylorina*, la posición aislada de *Insuetophrynus* y la relación de *Telmatobius* con especies de otras subfamilias. También muestran la divergencia de los géneros *Caudiverbera* y *Telmatobufo*, los cuales constituirían el linaje más basal en la filogenia de la familia.

Las relaciones filogenéticas observadas en este estudio plantean una historia compleja para el origen y diversificación de los leptodactílidos chilenos y sugieren la necesidad de una revisión de la sistemática de la familia incorporando información molecular.

SUMMARY

Most Chilean amphibians belong to the subfamily Telmatobiinae (Anura, Leptodactylidae), which includes 12 genera that distribute mainly in southeast of South America and the Andes Mountains. Systematic studies of leptodactylids, based mostly on morphological characters, place the Telmatobiinae on a basal position in the phylogeny of the family. On the other hand, the phylogenetic studies of telmatobiines are in agreement in that they recognize this subfamily as a natural (monophyletic) group, but they differ in the inferred phylogenetic relationships among the genera that constitute it. Furthermore, some of these studies suggest relationships of certain telmatobiines with species of other leptodactylid subfamilies, including the leptodactylid subfamily *Pleurodema* which is also present in Chile. However, these latter antecedents were not considered in posterior phylogenetic studies of telmatobiines, because most of them included only taxa of this subfamily.

In the present work the phylogenetic relationships of the Chilean leptodactylids were studied using DNA sequences of mitochondrial ribosomal genes 12S and 16S, to establish the position of these species relative to the other subfamilies. Twenty-two species from nine out of the ten telmatobiine genera present in Chile (*Alsodes*, *Atelognathus*, *Batrachyla*, *Caudiverbera*, *Eupsophus*, *Hylorina*, *Insuetophrynus*, *Telmatobufo* y *Telmatobius*) and two species of *Pleurodema* were included. Also, seventeen species of the other four subfamilies recognized for the Leptodactylidae and three additional species of *Telmatobius* from other South American countries were included. The phylogenetic reconstructions were performed applying the methods of maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference.

All the analyses showed a similar topology for the basal and terminal nodes indicating that the Telmatobiinae does neither form a monophyletic group nor occupy the basal position in the family phylogeny. The signal contained in both genes allowed distinguishing early divergence events of diversification in the family, as well as more recent events at generic level. The molecular data reinforce some groupings based on different types of evidence (*Caudiverbera-Telmatobufo*, *Alsodes-Eupsophus* y *Batrachyla-Hylorina*) and raise new hypotheses of relationships for some telmatobiine genera: the grouping of *Atelognathus* with *Batrachyla* and *Hylorina*, the isolated position of *Insuetophrynus* and the relationship of *Telmatobius* with species of the other subfamilies. Furthermore, the data show the divergence of *Caudiverbera* and *Telmatobufo*, which would constitute the more basal lineage of the family.

The phylogenetic relationships obtained in this study imply that the origin and diversification of the Chilean leptodactylids has a complex history and suggest the need for a revision of the systematics of the family incorporating molecular information.

1. INTRODUCCIÓN

Los profundos cambios geológicos y climáticos, unidos a la extraordinaria extensión latitudinal de nuestro territorio, han tenido un enorme impacto en la distribución y en la diversidad de su flora y fauna. Un grupo que ilustra esta compleja historia lo constituyen los anfibios chilenos (Cei, 1962), los cuales pertenecen a un reducido número de familias del orden Anura. Aunque poco numerosos en comparación a regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica, ocupan una amplia variedad de ambientes principalmente en los bosques templados australes, la región mediterránea del centro de Chile y la vertiente pacífica de los Andes (Formas, 1995). Más de las tres cuartas partes pertenece a la subfamilia Telmatobiinae (familia Leptodactylidae), un grupo cuyo origen y diversificación están íntimamente ligados a la historia de los bosques templados que actualmente cubren el extremo suroeste de Sudamérica (Formas, 1979). Se considera que las especies de esta subfamilia ocupan una posición basal dentro de la familia (Lynch, 1971; Heyer, 1975), la cual, a su vez, es una de las familias más antiguas del grupo de anuros neotropicales conocido como Hyloidea (= Bufonoidea) (Lynch, 1973). La posición basal de Leptodactylidae dentro de Hyloidea implica que estas especies constituirían linajes relacionados con aquellos que dieron origen a otras familias de anuros de Sudamérica (Lynch, 1973; Savage, 1973; Duellman y Trueb, 1986). Si a esto añadimos el alto nivel de endemismo descrito entre los anfibios chilenos (Formas, 1995), se comprende la importancia de reconstruir la historia filogenética de estas especies.

En las secciones siguientes se resume el estado actual de la taxonomía y sistemática de los leptodactílidos chilenos en el contexto de la posición sistemática aceptada tradicionalmente dentro de la familia. Esta revisión, sin pretender ser

exhaustiva, tiene como objetivo señalar las áreas que han suscitado mayor discusión y aquellas que merecen una mayor atención.

1.1 SISTEMÁTICA DE LOS ANUROS

Los anuros constituyen el orden más numeroso de anfibios modernos (Clase Lissamphibia) con más de 33 familias y 4600 especies descritas (Glaw y Köhler, 1998; Frost, 2004). Morfológicamente este orden se caracteriza por una estructura corporal muy conservada y un alto grado de especialización (Duellman y Trueb, 1986). Las relaciones filogenéticas al interior de este orden han sido estudiadas con varios complejos de caracteres morfológicos (ver revisiones en Lynch, 1973; Duellman y Trueb, 1986; Ford y Cannatella, 1993). Aunque se han definido distintas agrupaciones suprafamiliares para este orden, en la mayoría de estos estudios se pueden reconocer dos grandes grupos de familias: Archaeobatrachia y Neobatrachia (Reig, 1958). Dentro de la agrupación Neobatrachia se pueden distinguir a su vez los grupos informales Hyloidea (= Bufonoidea) y Ranoidea. Las relaciones al interior de Neobatrachia, que es el grupo más numeroso de anuros, permanecen en gran medida sin resolver (Duellman y Trueb, 1986; Ford y Cannatella, 1993). Ford y Cannatella (1993) señalan dos debilidades de los estudios de macrosistemática de anuros basados en caracteres morfológicos: todas las familias han sido tratadas como monofiléticas y se han utilizado relativamente pocos caracteres. Recientemente, en un intento por superar estas limitaciones, Haas (2003) utilizó especies en vez de familias como unidades de estudio y un mayor número de caracteres que estudios previos (principalmente caracteres morfológicos larvarios). Los resultados de sus análisis respaldan agrupaciones anteriormente bien definidas, principalmente a nivel de familias, pero indican que las agrupaciones Archaeobatrachia e Hyloidea son parafiléticas.

Las relaciones filogenéticas entre las familias de anuros también han sido investigadas utilizando caracteres moleculares, particularmente con los genes ribosomales mitocondriales 12S y 16S. En general, los resultados de estos estudios concuerdan con aquellos basados en caracteres morfológicos, reconociendo los grupos de familias Archaeobatrachia y Neobatrachia (Hedges y Maxson, 1993; Hay et al., 1995; Feller y Hedges, 1998). Del mismo modo, los datos moleculares permiten reconocer dos grupos principales dentro de Neobatrachia: Ranoidea e Hyloidea (Ruvinsky y Maxson, 1996; Biju y Bossuyt, 2003; Darst y Cannatella, 2004). Las relaciones entre las familias de Hyloidea, que corresponde al grupo más numeroso de anuros, ha sido objeto de varios estudios con caracteres moleculares, pero sólo dos han incluido un número sustancial de *taxa*. Ruvinsky y Maxson (1996) examinaron las relaciones dentro de este grupo incluyendo más de una especie para algunas familias. Los datos utilizados en aquel estudio no permitieron establecer las relaciones entre la mayor parte de las familias y sugieren que dos de ellas, Leptodactylidae e Hylidae, son parafiléticas. En un estudio más reciente, Darst y Cannatella (2004) reexaminaron hipótesis de relaciones entre algunas familias al interior de Hyloidea. Aunque estos autores incluyen el mayor número de *taxa* y caracteres moleculares hasta la fecha, el soporte estadístico obtenido en las reconstrucciones filogenéticas fue bajo para la mayor parte de las agrupaciones familiares.

1.2 LOS LEPTODACTÍLIDOS

La familia Leptodactylidae es la más numerosa del orden Anura con más de 1000 especies descritas (Frost, 2004). El extenso rango de distribución y la variedad de hábitats que ocupan podrían explicar el alto grado de variación morfológica observado entre sus especies (Lynch, 1971). Con respecto a la sistemática de los leptodactílicos,

las revisiones más extensas y recientes corresponden a los trabajos de Lynch (1971) y Heyer (1975). Lynch (1971) revisó la historia de la sistemática de la familia y redefinió su contenido reduciéndolo a 57 géneros actuales. Sin embargo, en esta definición incluye varios grupos actualmente considerados como familias distintas (Frost, 2004): Heleophryinae de Sudáfrica y Limnodynastidae y Myobatrachidae de Australia y Papua Nueva Guinea. En base a 51 caracteres, en su mayoría morfológicos, definió siete subfamilias, dos de ellas divididas a su vez en un total de siete tribus: Ceratophryinae, Cyclorantinae (dividida en las tribus Cycloranini y Limnodynastini), Elosiinae, Heleophryinae, Leptodactylinae, Myobatrachinae y Telmatobiinae (tribus Alsodini, Eleutherodactylini, Grypiscini, Odontophrynini y Telmatobiini). Lynch (1971) estableció las relaciones filogenéticas entre estas agrupaciones considerando la información del conjunto de los caracteres estudiados, pero sin ajustarse a una metodología cladística. Entre sus conclusiones señala que Cyclorantinae, Heleophryinae y Myobatrachinae son grupos derivados independientemente de Megophryinae (familia Pelobatidae) y que los linajes neotropicales tienen un ancestro común relacionado con el mismo stock que dio origen a Cyclorantinae (Figura 1A). Dentro de los grupos sudamericanos, la subfamilia Ceratophryinae ocupa la posición más basal seguida de las tribus Telmatobiini y Odontophrynini. Cabe destacar que, dentro de este esquema, Alsodini estaría más relacionada con la subfamilia Leptodactylinae.

El objetivo de Heyer (1975) fue extender los datos presentados por Lynch (1971) y utilizar una metodología explícita (un análisis cladístico) para investigar las relaciones filogenéticas al interior de la familia. Los análisis de Heyer (1975) se basaron en 37 caracteres morfológicos de 36 géneros, restringiendo la composición de la familia sólo a los linajes americanos, lo cual concuerda con la definición actual de la

familia (Duellman y Trueb, 1986; Laurent, 1986; Frost, 2004). Las conclusiones de Heyer (1975) no son claras al proponer una subdivisión natural: "La información combinada sobre las relaciones indica claramente cinco agrupaciones mayores dentro de la familia. Yo pienso que las agrupaciones permanecerán intactas a medida que más información sea disponible, pero que las relaciones dentro y entre agrupaciones estarán sujetas a cambio con la adición de más información" (op. cit., página 34). La proposición del origen de los cinco grupos reconocidos por este autor se muestra en la Figura 1B. Este esquema plantea que Telmatobines y Ceratophryines se originaron en el Cretáceo Medio, seguidos por Leptodactylines y, finalmente, a fines del Cretáceo, por un grupo que dio origen a Eleutherodactylines y Grypiscines. Implícito en esta proposición de relaciones, que incorpora los antecedentes biogeográficos, es un origen único para las cinco agrupaciones de Leptodactylidae.

La composición de las subfamilias y agrupaciones definidas por Lynch (1971) y Heyer (1975) ha sido objeto de varios cambios. Duellman y Trueb (1986) agrupan 51 géneros en cuatro subfamilias, las que equivalen básicamente a las subfamilias neotropicales definidas por Lynch (1971). Ceratophryinae es un grupo morfológicamente diferenciado que es considerado por algunos autores como una familia diferente (por ejemplo Cei, 1980). Frost (2004) incluye dentro de Ceratophryinae a Odontophrynini (siguiendo el esquema propuesto por Laurent, 1986), un grupo morfológicamente similar que fue considerado por Lynch (1971) como intermedio entre Ceratophryinae y Telmatobiinae. Elosiinae (= Hylodinae de Duellman y Trueb, 1986) es un grupo morfológicamente homogéneo que comprende tres géneros del sureste de Brasil. Los géneros de Grypiscini de Lynch (1971) fueron incluidos por Laurent (1986) en Hylodinae ampliando así la composición de esta última subfamilia (la cual corresponde a Cycloramphinae de Frost, 2004).

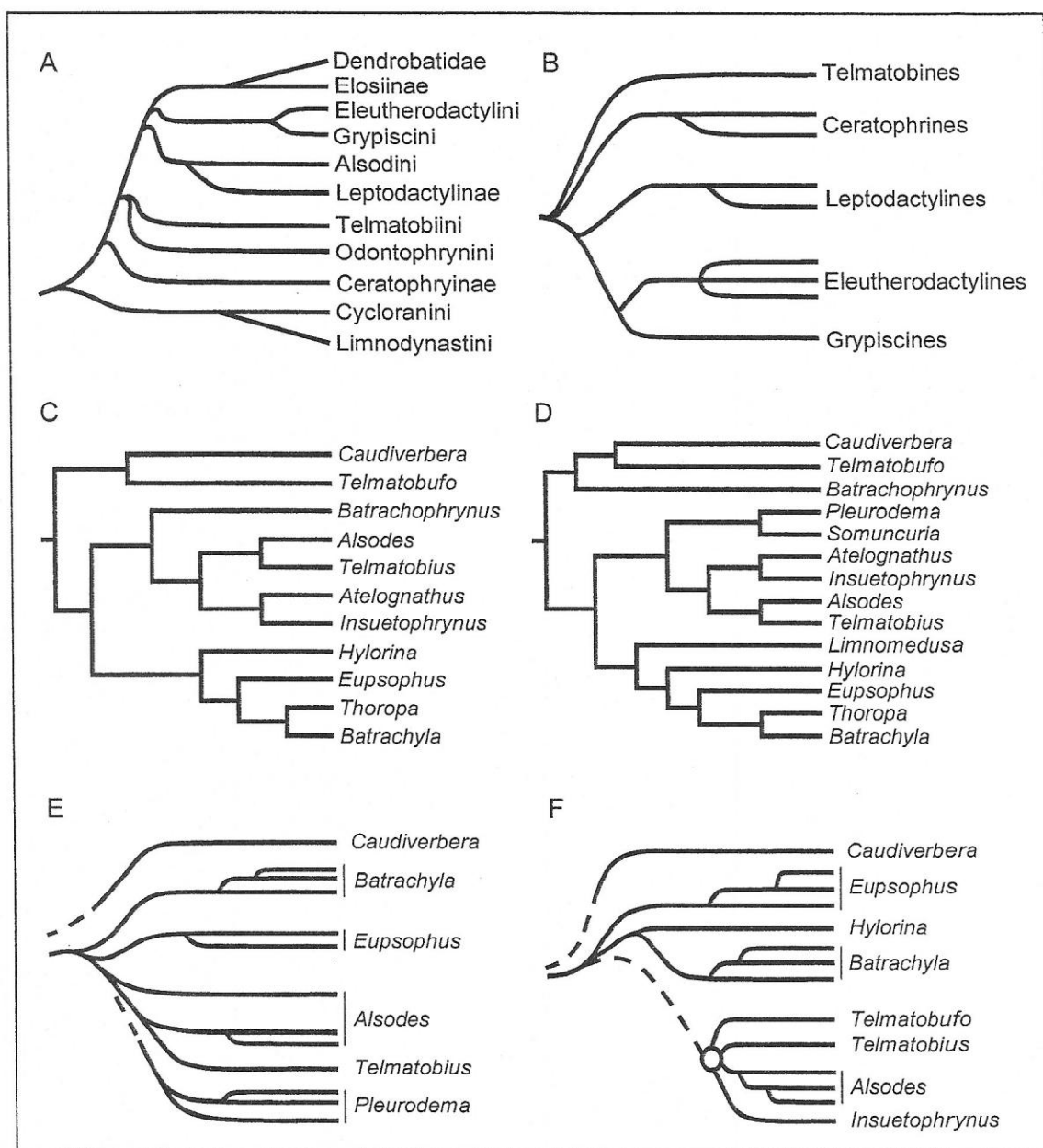


Figura 1.- Hipótesis filogenéticas propuestas para Leptodactylidae (A y B) y Telmatobiinae (C, D, E y F) por diversos autores. A: Lynch (1971), esquema de las relaciones intrafamiliares de los leptodactílidos; Telmatobiinae, según este autor, comprende las tribus Alsodini, Eleutherodactylini, Grypiscini, Odontophrynini y Telmatobiini. B: Heyer (1975), relaciones entre los cinco grupos informales definidos por este autor. C y D: Lynch (1978), cladogramas obtenidos por un análisis de 19 caracteres (principalmente osteológicos) para 11 géneros de telmatobinos (C) y 14 de leptodactílidos (D). E: Díaz y Veloso (1979), esquema de las relaciones intergenéricas para algunos leptodactílidos chilenos, basado principalmente en evidencia cromosómica y patrones de hexoquinetas hepáticas. F: Díaz (1986), relaciones filogenéticas propuestas para algunos géneros de telmatobinos chilenos basadas en un análisis cladístico de 13 caracteres (principalmente morfológicos).

Leptodactylinae, según Lynch (1971), es una subfamilia pobremente definida y posiblemente polifilética, sin embargo no se han propuesto cambios posteriores en su composición. Con el reconocimiento de Eleutherodactylini como una subfamilia por Laurent (1986) y los cambios de posición de Grypiscini y Odontophrynini propuestos por el mismo autor, la composición de Telmatobiinae fue reducida a las tribus Alsodini y Telmatobiini de Lynch (1971). En resumen, la clasificación de Frost (2004) es en términos generales equivalente a las cinco agrupaciones informales reconocidas por Heyer (1975) y a la composición de las subfamilias establecida por Laurent (1986): Ceratophryinae, Eleutherodactylinae, Cycloramphinae (= Grypiscines de Heyer, 1975), Leptodactylinae y Telmatobiinae. Por otra parte hay que añadir que hay evidencia morfológica, datos moleculares y antecedentes biogeográficos que permiten cuestionar la validez taxonómica de Leptodactylidae (Lynch, 1971; Duellman y Trueb, 1986; Ford y Cannatella, 1993; Ruvinsky y Maxson, 1996; Haas, 2003; Darst y Cannatella, 2004).

Es importante señalar que Heyer (1975) constituye la revisión más reciente de la sistemática de la familia en su totalidad. Entre los estudios sistemáticos posteriores se destacan Lynch (1978), en que se analizan las relaciones entre los géneros de telmatobinos inferiores (agrupación que corresponde a las tribus Alsodini y Telmatobiini de Lynch, 1971), y algunos trabajos en que se han utilizado metodologías inmunológicas para estudiar las relaciones entre algunos géneros de la familia (Cei, 1970; Maxson y Heyer, 1982). El estudio de Lynch (1978) tiene una importancia fundamental para la sistemática de los leptodactílicos chilenos, por lo que los resultados de este trabajo se presentarán en el contexto de la sistemática de los telmatobinos (Sección 1.4).

Entre los primeros métodos inmunológicos que se aplicaron a problemas filogenéticos se encuentra el ensayo de precipitinas, el cual consiste en medir la

cantidad de precipitados producidos al mezclar antígeno y antisuero de distintas especies. Las cantidades relativas de estos precipitados son utilizadas como una estimación de la divergencia entre los taxa comparados. Cei (1970) analizó las relaciones entre algunos miembros de Leptodactylidae utilizando esta metodología, con el objetivo de evaluar algunas de las proposiciones de Lynch (este último autor publicó su tesis doctoral en 1969, en la cual se basó su trabajo de 1971). Los resultados de Cei (1970) indican la temprana divergencia del género *Calyptocephalella* (= *Caudiverbera*) y sustentan la separación de *Odontophrynus* de la subfamilia Telmatobiinae. La técnica de fijación de microcomplemento es otro método inmunológico basado en reacciones entre antígenos y anticuerpos, que también permite estimar la divergencia relativa entre taxa y los tiempos de separación de especies cuya divergencia es relativamente reciente. Este tipo de metodología fue aplicada por Maxson y Heyer (1982) para examinar las relaciones entre géneros del sureste de Brasil (*Cycloramphus*, *Hylodes*, *Megaelosia* y *Thoropa*, todos ellos integrantes de Grypiscines de Heyer, 1975) dentro del contexto de la familia. Las distancias inmunológicas encontradas en la mayor parte de las comparaciones sobrepasaron la resolución de la técnica por lo que no permitieron a estos autores inferir las relaciones entre los géneros estudiados. Como conclusión ellos indican que los géneros incluidos son antiguos, con tiempos de divergencia que probablemente se remontan al Cretáceo.

A diferencia de los ejemplos recién señalados, los estudios en que se han utilizado secuencias de DNA y han incluido especies de leptodactílicos (por ejemplo Ruvinsky y Maxson, 1996; Vences et al., 2000, 2003; Darst y Cannatella, 2004) no han tenido como objetivo estudiar las relaciones filogenéticas de esta familia. Darst y Cannatella (2004) incluyeron 21 especies de la familia, pero se limitaron a discutir problemas filogenéticos entre otras familias de Hyloidea. En todos estos casos la

cantidad de *taxa* de Leptodactylidae no ha sido suficiente para establecer las relaciones inter e intrafamiliares de esta familia, aunque cabe señalar que todos estos análisis muestran una falta de agrupación de las especies de leptodactílicos incluidas.

1.3 TAXONOMÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ANFIBIOS CHILENOS

Los anfibios son el grupo menos numeroso de vertebrados presentes en Chile. En una revisión del estado de conservación de los anfibios chilenos, Díaz-Páez y Ortiz (2003) reconocen 50 especies nativas pertenecientes a tres familias: Bufonidae, Leptodactylidae y Rhinodermatidae. Las tres familias se encuentran desigualmente representadas. La mayor parte, 42 especies, pertenece a la familia Leptodactylidae, mientras las otras dos familias agrupan seis especies (Bufonidae) y dos especies (Rhinodermatidae). Sin considerar las diferencias entre las clasificaciones propuestas para los leptodactílicos chilenos (Díaz y Veloso, 1979; Díaz, 1986), los 11 géneros reconocidos por Díaz-Páez y Ortiz (2003) pueden adscribirse a dos subfamilias (Frost, 2004): Leptodactylinae, que incluye el género *Pleurodema* con tres especies, y Telmatobiinae, que incluye los géneros *Alsodes*, *Atelognathus*, *Batrachyla*, *Caudiverbera*, *Eupsophus*, *Hylorina*, *Insuetophrynus*, *Telmalsodes*, *Telmatobufo* y *Telmatobius*, con un total de 39 especies. La validez de *Telmalsodes* fue rechazada por Wiens (1993), género que Frost (2004) incluye en *Alsodes*.

El número de especies descritas en Chile ha tenido un incremento constante desde la monografía realizada por Cei (1962), quien reconoce sólo nueve géneros y 19 especies para las tres familias. Los números publicados con posterioridad revelan esta tendencia: 33 (Díaz y Veloso, 1979), 36 (Díaz, 1986), 38 (Veloso y Navarro, 1988), 43 (Formas, 1995) y 50 (Díaz-Páez y Ortiz, 2003). Desde que se publicó la revisión de Díaz-Páez y Ortiz (2003) se han descrito varias especies de telmatobinos con

distribuciones muy restringidas, todas ellas pertenecientes a géneros con numerosas especies y con rangos de distribución relativamente amplios entre los telmatobinos. Como ejemplo se mencionan dos especies incluidas en el presente estudio: *Atelognathus jeinimenensis* (Meriggio et al., 2004) y *Eupsophus* sp., que se encuentra en proceso de descripción. En contraste, la cantidad de géneros de telmatobinos representados en Chile se ha mantenido relativamente estable desde el trabajo de Lynch (1978). En este trabajo, el autor incluyó a *Alsodes*, género revalidado por Gallardo (1970), que fue considerado parte de *Eupsophus* en trabajos previos (Cei, 1962; Lynch, 1971), y definió un nuevo género, *Atelognathus*, para algunas especies patagónicas incluidas anteriormente en *Telmatobius*. Desde esa fecha el único cambio a nivel genérico lo constituye la creación de *Telmalsodes* para un par de especies del género *Alsodes*, una de ellas endémica de la cordillera central de Chile (Díaz, 1989).

La distribución de Telmatobiinae se restringe al extremo suroeste de Sudamérica, la región andina desde la línea del Ecuador hasta los 29° S y parte de la Patagonia (Figura 2). Sólo dos de los diez géneros de telmatobinos representados en Chile tienen más especies fuera del país: *Telmatobius*, con una extensa distribución en los Andes, y *Atelognathus*, con una distribución fragmentada en la Patagonia argentina y chilena. Los dos géneros de Telmatobiinae que no tienen especies en Chile son *Batrachophrynus* (dos especies del lago Junín, Perú) y *Somuncuria* (una especie de la meseta de Somuncurá, Argentina). El género leptodactilino *Pleurodema* se distribuye ampliamente en Sudamérica, pero sólo una especie tiene una distribución que abarca parte importante del territorio nacional (*P. thaul*) (Figura 2, recuadro).

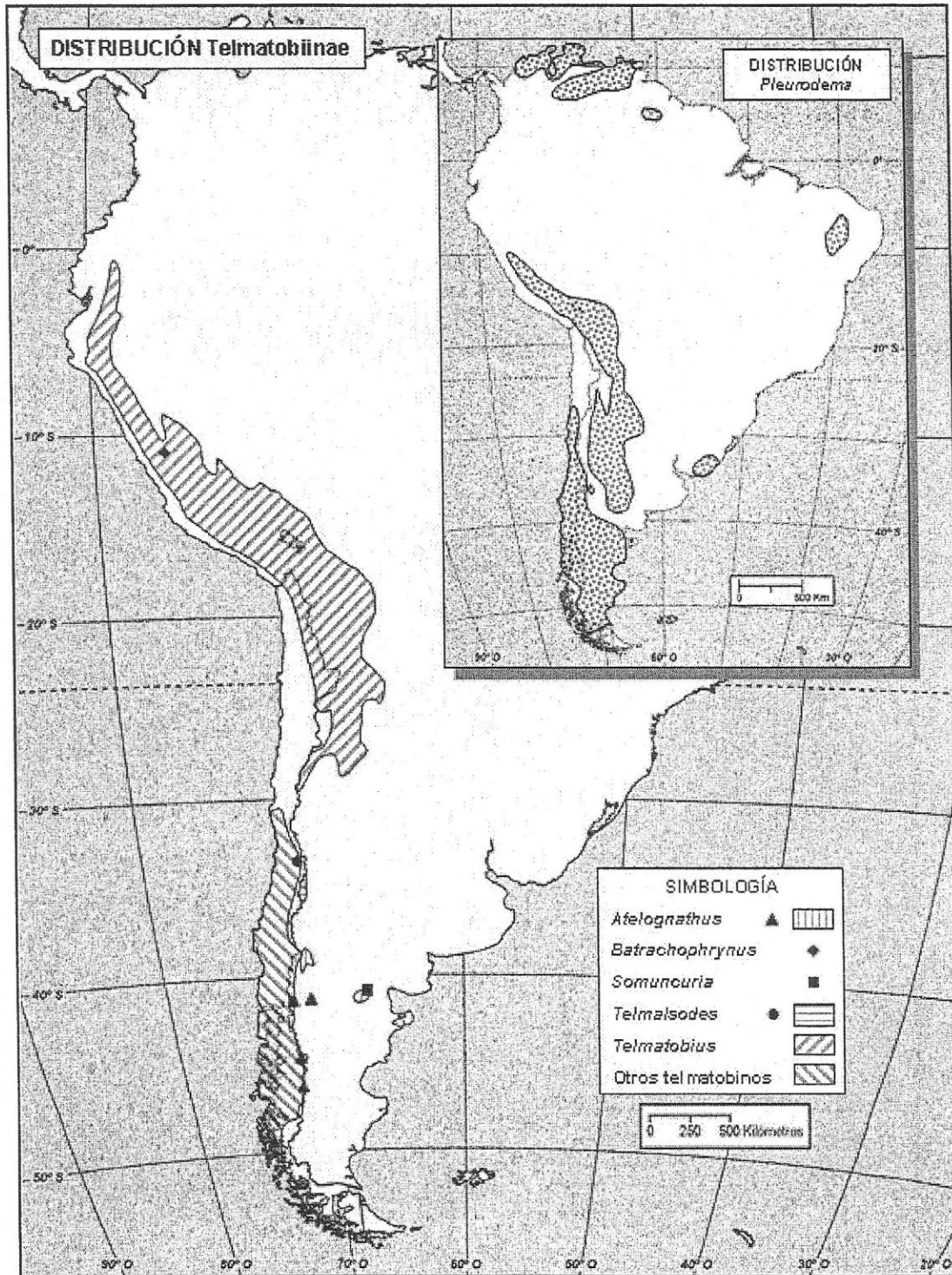


Figura 2.- Distribución de la subfamilia Telmatobiinae (composición *sensu* Frost, 2004, pero incluyendo *Telmalsodes*) y el género leptodactilino *Pleurodema* (recuadro). La categoría Otros telmatobinos comprende los géneros *Alsodes*, *Batrachyla*, *Caudiverbera*, *Eupsophus*, *Hylorina*, *Insuetophrynus* y *Telmatobufo*. La distribución de Telmatobiinae fue obtenida de Ceí (1962, 1980), Lavilla y Ceí (2001) y Lynch (1978). La distribución de *Pleurodema* fue obtenida de Ceí (1962, 1980), Duellman (1979) y Duellman y Veloso (1977).

1.4 SISTEMÁTICA DE LOS TELMATOBINOS

La composición, el estatus taxonómico y la sistemática de los telmatobinos han sido objeto de numerosos cambios, lo cual se refleja en la existencia de una extensa literatura. Lynch (1971) reconoce cinco tribus dentro de la subfamilia Telmatobiinae, dos de las cuales abarcan los géneros que comprenden actualmente esta subfamilia (Frost, 2004): Alsodini (géneros *Batrachyla*, *Eupsophus*, *Hylorina* y *Thoropa*) y Telmatobiini (*Batrachophrynus*, *Caudiverbera*, *Telmatobius* y *Telmatobufo*). Las otras tres tribus (Eleutherodactylini, Grypiscini y Odontophrynini) actualmente se consideran como parte de subfamilias distintas (Frost, 2004). Heyer (1975) reunió los géneros *Batrachophrynus*, *Batrachyla*, *Caudiverbera*, *Eupsophus*, *Hylorina*, *Insuetophrynus*, *Telmatobius* y *Telmatobufo* en la agrupación informal Telmatobines, una de las cinco en que dividió la familia. Sin embargo, este autor indica que el alcance de sus análisis no le permitió inferir relaciones al interior de las agrupaciones definidas.

La sistemática de los telmatobinos a nivel de géneros fue revisada por Lynch (1978) por medio de análisis cladísticos de 19 caracteres (18 de ellos osteológicos). Este autor investigó las relaciones filogenéticas entre los géneros de Alsodini y Telmatobiini, tribus definidas en su anterior trabajo (Lynch, 1971) y que colectivamente reciben el nombre de telmatobinos inferiores (Figura 1C y 1D). En este estudio se añadieron a los telmatobinos inferiores los géneros *Atelognathus* y *Somuncuria* definidos a partir de especies patagónicas de *Telmatobius*. También se agregó *Alsodes*, género incluido anteriormente en *Eupsophus* por el mismo autor (Lynch, 1971). En algunos de los análisis se incluyeron, además, los géneros *Limnomedusa* y *Pleurodema* de la subfamilia Leptodactylinae, debido a que estudios previos sugerían relaciones de estos géneros con algunos telmatobinos (Figura 1D). Barrio y Rinaldi de Chieri (1971) sugirieron en base a evidencia cariológica que *Limnomedusa* podría ser

considerado como parte de Telmatobiinae, mientras que Lynch (1971) planteó una posible relación de *Pleurodema* con el género telmatobino *Eupsophus*. Los análisis de Lynch (1978) permitieron separar los 13 géneros de telmatobinos inferiores en tres tribus: Calyptocephalellini (*Caudiverbera* y *Telmatobufo*), Telmatobiini (*Alsodes*, *Atelognathus*, *Batrachophrynus*, *Eupsophus*, *Hylorina*, *Insuetophrynus*, *Limnomedusa*, *Somuncuria* y *Telmatobius*) y Batrachylini (*Batrachyla* y *Thoropa*). La inclusión de *Thoropa* en esta subfamilia, un género del sudeste de Brasil, deriva del trabajo de Lynch (1971), posición que no fue sustentada por los análisis de Heyer (1975) quien lo incluyó en la agrupación Grypiscines. Es importante señalar que la posición variable de *Limnomedusa* con respecto a *Pleurodema* en los análisis de Lynch (1978) (uno de los cladogramas obtenidos se muestra en la Figura 1D), llevó a concluir a este autor que alguno de estos géneros estaba mal asignado a Leptodactylinae, por lo que decidió excluir a *Limnomedusa* de esa subfamilia e incluirlo en Telmatobiinae.

Díaz y Veloso (1979) revisaron la utilidad taxonómica y sistemática de varios tipos de caracteres (cromosómicos, morfológicos y moleculares, específicamente lactato deshidrogenasas y hexoquinasas hepáticas) para la definición de géneros de las tres familias que habitan en Chile. En base a estos caracteres, los autores sugieren relaciones entre los géneros *Alsodes* y *Telmatobius*, *Alsodes* e *Insuetophrynus*, y entre *Pleurodema* y los telmatobinos (Figura 1E). Los caracteres también permiten separar claramente a *Caudiverbera* del resto de los géneros y señalar que *Eupsophus* y posiblemente *Batrachyla* conforman un linaje que se separó tempranamente del ancestro de los telmatobinos. Posteriormente, Díaz (1981) estudió las enzimas lactato deshidrogenasas en diez géneros de telmatobinos chilenos sugiriendo relaciones entre *Hylorina* y *Batrachyla taeniata*, y entre *Telmatobius montanus* (= *Telmalsodes montanus*) y *Alsodes*. El estudio de estos patrones enzimáticos le permitió señalar la

diferenciación de *Caudiverbera* e *Insuetophrynus*, los cuales no muestran afinidades evidentes para este carácter con otros géneros de telmatobinos. Díaz y Valencia (1985) estudiaron caracteres morfológicos larvales de ocho géneros de telmatobinos chilenos y en base a un análisis fenético concluyeron que estos caracteres no respaldan agrupaciones establecidas anteriormente. Debido a esto, los autores señalan que la morfología larval debería usarse en conjunto con otros tipos de caracteres para construir una clasificación subfamiliar para esos géneros, lo que es discutible dado la metodología utilizada. Díaz (1986) sintetizó la sistemática de los leptodactílidos chilenos incorporando nueva evidencia y realizando un análisis filogenético con caracteres morfológicos, de historia de vida y moleculares (hexoquinasas hepáticas). Los análisis y la incorporación de otros antecedentes permitieron a este autor distinguir tres linajes: subfamilia Calyptocephalellinae (*Caudiverbera*), tribu Alsodini (*Batrachyla*, *Eupsophus* e *Hylorina*) y tribu Telmatobiini (*Atelognathus*, *Alsodes*, *Insuetophrynus*, *Telmatobius* y *Telmatobufo*). De estas tres agrupaciones, Calyptocephalellinae sería la que divergió más tempranamente (Figura 1F).

Los trabajos posteriores en esta área han tenido un alcance más limitado. Díaz (1989) examinó las relaciones entre algunas especies de *Alsodes* y *Telmatobius* para establecer la posición de los *taxa* *Alsodes montanus* y *A. pehuenche*. En base a varios análisis morfológicos este autor propuso la definición de un nuevo género para estas dos especies: *Telmalsodes*. Además, para examinar la posición sistemática de este género con respecto a otros géneros de telmatobinos realizó un análisis cladístico cuyos resultados no fueron discutidos. Otros trabajos han tenido como objetivo establecer las relaciones filogenéticas al interior de ciertos géneros. Ejemplos de éstos lo constituyen el estudio de *Eupsophus* utilizando técnicas inmunológicas (Formas y

Brieva, 1992), el de *Batrachyla* en base a caracteres morfológicos (Basso, 1994), el enfoque integrado de Formas et al. (2001) en *Telmatobufo*, en el que se utilizan caracteres morfológicos y moleculares, y el trabajo de Núñez (2003) en taxonomía y sistemática de *Eupsophus*. Cabe señalar que los dos últimos constituyen los primeros trabajos de sistemática en anfibios chilenos en que se incorporan secuencias de DNA.

1.5 UNA APROXIMACIÓN MOLECULAR A LA SISTEMÁTICA DE LOS TELMATOBINOS

Los antecedentes señalados en las secciones previas resumen el estado actual del estudio de la sistemática de los anfibios chilenos pertenecientes a la familia Leptodactylidae, para los cuales se han propuesto diferentes clasificaciones. Por otra parte, la tasa constante de descripción de especies de la subfamilia Telmatobiinae en Chile indica que el conocimiento de la diversidad de este grupo aún es parcial. Sin embargo, hay un aspecto más básico de la sistemática de Telmatobiinae que puede ser cuestionado al examinar con más detenimiento la literatura. Como se mencionó anteriormente, diversos estudios han puesto en duda la validez de la familia Leptodactylidae (véase Sección 1.2), pero siempre se ha considerado que los telmatobinos conforman un grupo bien definido dentro de la familia (Ceï, 1970; Barrio y Rinaldi de Chieri, 1971; Heyer, 1975; Lynch, 1971, 1978; Díaz y Veloso, 1979; Díaz, 1986). Hay un antecedente que vale la pena volver a mencionar al considerar esta postura. En los análisis cladísticos de los géneros de telmatobinos inferiores realizados por Lynch (1978) se incluyeron dos géneros, *Limnomedusa* y *Pleurodema*, tradicionalmente clasificados como leptodactilinos. Debido a que en todos los análisis estos dos géneros aparecían en diferentes agrupaciones, este autor concluyó que uno de ellos estaba mal asignado a la subfamilia Leptodactylinae (Figura 1D). Una

explicación para este resultado es una falta de resolución de los caracteres utilizados, los que no permitieron distinguir entre las dos subfamilias. Pero hay otra alternativa: que los telmatobinos inferiores sean un grupo parafilético, por lo menos en relación a *Limnomedusa* y *Pleurodema*. A esto se puede añadir otro antecedente que parece tener consecuencias más amplias para el estudio de las relaciones al interior de Leptodactylidae y particularmente para los telmatobinos. El árbol que Lynch (1971) muestra como resumen de las relaciones evolutivas propuestas entre las agrupaciones que define (Figura 1A), muestran a las tribus Alsodini y Telmatobiini de Telmatobiinae separadas, más relacionadas con otras agrupaciones de la familia. Esta proposición filogenética no se refleja en la clasificación que este autor plantea (véase Sección 1.2) ni es considerada posteriormente en trabajos sistemáticos de éste u otros autores.

De una manera similar a lo que ha sucedido con otros grupos de animales, el desarrollo de la sistemática molecular ha revigorizado el estudio de las relaciones filogenéticas de los anfibios. En particular, la incorporación de secuencias de DNA al estudio de la sistemática de los anuros ha permitido reevaluar hipótesis filogenéticas basadas en caracteres morfológicos que han sido intensamente debatidas (Cannatella y Hillis, 1993). Los primeros estudios de sistemática de anfibios en que se utilizó este tipo de caracteres se enfocaron en problemas a nivel de órdenes y utilizaron genes ribosomales nucleares (por ejemplo Hedges et al., 1990). Trabajos posteriores comenzaron a incorporar genes ribosomales mitocondriales, específicamente los genes 12S y 16S, que presentan tasas de evolución relativamente más altas que sus contrapartes nucleares (Hedges y Maxson, 1993; Hay et al., 1995). El nivel de variación observado en estos genes (y otros genes mitocondriales) no sólo permitió examinar las relaciones dentro de los órdenes de anfibios, sino que amplió las posibilidades de reexaminar problemáticas a nivel de familias y géneros.

Desde una perspectiva más general, las características hereditarias del DNA mitocondrial (herencia uniparental, ausencia de recombinación, tasa de evolución relativamente alta, genes con distinto grado de variación) hacen de esta molécula un marcador adecuado para inferir la historia filogenética de los organismos (Moritz et al., 1987). Por otra parte, la dinámica demográfica del genoma mitocondrial con respecto al nuclear hace más confiable la inferencia de árboles de especies a partir de genes mitocondriales (Moore, 1995). Como consecuencia, la mayoría de los trabajos de sistemática molecular de anuros ha utilizado secuencias de genes mitocondriales y por tanto corresponde al tipo de secuencias que se encuentra con mayor frecuencia en las bases de datos. La disponibilidad de esta información plantea la posibilidad de incorporar nueva evidencia al estudio de la sistemática de los leptodactílidos chilenos. De esta forma, la utilización de secuencias de DNA permitiría establecer la posición filogenética de estas especies dentro de la familia y obtener un marco de referencia más completo para investigar su origen, diversificación y evolución.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer una hipótesis de relaciones filogenéticas para los leptodactílicos presentes en Chile basada en secuencias de los genes mitocondriales 12S y 16S.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener secuencias de los genes mitocondriales 12S y 16S de especies de todos los géneros de leptodactílicos presentes en Chile.
- Incorporar a los análisis secuencias publicadas de especies de las cinco subfamilias reconocidas de leptodactílicos.
- Realizar análisis filogenéticos utilizando diversos métodos de reconstrucción (parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana).
- Comparar las hipótesis filogenéticas obtenidas con los datos moleculares con aquellas planteadas anteriormente.
- Discutir las consecuencias de las hipótesis basadas en los datos moleculares para la comprensión de la sistemática de la subfamilia Telmatobiinae.

2.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Las especies de la subfamilia Telmatobiinae que habitan en Chile constituyen un grupo monofilético.
- Las especies de la subfamilia Telmatobiinae que habitan en Chile ocupan una posición basal en la filogenia de la familia Leptodactylidae.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL DE ESTUDIO

3.1.1 Especies de anfibios chilenos. Se seleccionaron 24 especies de leptodactílicos chilenos pertenecientes a 10 géneros y dos subfamilias (Tabla 1). En el caso de los géneros con más de una especie se incluyeron varias especies para tratar de abarcar una mayor parte de la variabilidad dentro de cada género. Todos los ejemplares pertenecen a las colecciones del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Chile (DBGUCH), del Instituto de Zoología de la Universidad Austral (IZUA) y del Museo de Zoología de la Universidad de Concepción (MZUC). Para la obtención de tejido, los ejemplares fueron anestesiados hasta la inmovilidad en una solución de MS222 (1 mg/mL; ajustada a pH 7 con bicarbonato de sodio) y luego sacrificados por demedulación. Inmediatamente se extrajo tejido de hígado y/o dedo el que fue sumergido en etanol absoluto y almacenado a -20°C .

3.1.2 Otras especies de leptodactílicos. Se incluyeron datos moleculares de especies pertenecientes a las cinco subfamilias actualmente reconocidas de leptodactílicos (Frost, 2004): Ceratophryinae, Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae y Telmatobiinae. Las secuencias se obtuvieron del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y forman parte de los estudios de Darst y Cannatella (2004) y Vences et al. (2003). Darst y Cannatella (2004) utilizaron un segmento de DNA mitocondrial de 2,4 kilobases que abarca parte de los genes 12S, 16S y el tRNA para valina que se ubica entre ellos. Estos autores incluyeron 20 especies de leptodactílicos pertenecientes a cuatro subfamilias (Ceratophryinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae y Telmatobiinae), de las cuales 18 se utilizaron

en el presente estudio (Tabla 2). Vences et al. (2003) estudiaron la evolución de la coloración en los sapos venenosos de la familia Dendrobatidae, para lo cual realizaron una reconstrucción filogenética con fragmentos de los genes 12S y 16S. Estos autores incluyeron siete especies de leptodactílidos como parte del grupo externo, dos de las cuales se seleccionaron para el presente estudio (Tabla 2).

3.1.3 Especies del grupo externo. Un grupo externo es el *taxon* (o *taxa*) que se asume haber divergido más tempranamente con respecto a todos los *taxa* en estudio (grupo interno) y es utilizado para enraizar los árboles. El grupo externo es particularmente importante en las reconstrucciones filogenéticas por parsimonia ya que además es el método habitual para determinar la polarización de los caracteres (Maddison et al., 1984). Debido a que las relaciones entre la mayor parte de las familias de Hyloidea no han sido establecidas, no hay un consenso para definir el grupo hermano o las familias más relacionadas con respecto a Leptodactylidae. Por lo tanto, la elección del grupo externo en este estudio se basó en el trabajo de Lynch (1973). Este autor establece que Helophryninae y Cyclorantinae son los actuales representantes del grupo que dio origen a los leptodactílidos. Actualmente estas subfamilias son consideradas como familias (Frost, 2004): Heleophrynidae y Limnodynastidae (equivalente a Cyclorantinae de Lynch, 1973). En este estudio se incluyó una especie de cada familia, datos pertenecientes al trabajo de Darst y Cannatella (2004) (Tabla 2).

ESPECIE	LOCALIDAD, REGIÓN	Nº DE COLECCIÓN
<i>Alsodes barrioi</i>	Piedra del Águila, Octava	IZUA 3213
<i>Alsodes monticola</i>	Puente La Herradura, Décima	DBGUCH 2919
<i>Alsodes nodosus</i>	Tiltil, Metropolitana	DBGUCH SN
<i>Alsodes sp.</i>	Futaleufú, Décima	DBGUCH 3372
<i>Alsodes tumultuosus</i>	La Parva, Metropolitana	IZUA SN
<i>Atelognathus jeinimenensis</i>	Laguna Jeinimeni, Décimoprimerá	DBGUCH 3438
<i>Batrachyla antartandica</i>	Cuesta Bahamondes, Décima	DBGUCH 2961
<i>Batrachyla leptopus</i>	Llico, Décima	DBGUCH 2931
<i>Batrachyla taeniata</i>	Llico Bajo, Décima	DBGUCH 2943
<i>Caudiverbera caudiverbera</i>	Pam Ba, Décima	DBGUCH 3028
<i>Eupsophus calcaratus</i>	Bosque mixto, Décima	DBGUCH 2904
<i>Eupsophus migueli</i>	Mehuín, Décima	IZUA 3476
<i>Eupsophus roseus</i>	La Saval, Décima	IZUA 3506
<i>Eupsophus sp.</i>	Los Queules, Séptima	DBGUCH 3273
<i>Eupsophus emiliopugini</i>	Cucao, Décima	DBGUCH 3342
<i>Hylorina sylvatica</i>	Gemelas, Décima	DBGUCH 3031
<i>Insuetophrynus acarpicus</i>	Queule, Novena	DBGUCH 3125
<i>Pleurodema marmorata</i>	Lauca, Primera	DBGUCH 2725
<i>Pleurodema thaul</i>	Llico Bajo, Décima	DBGUCH 2918
<i>Telmatobius marmoratus</i>	Caquena, Primera	DBGUCH 3384
<i>Telmatobius vilamensis</i>	Vilama, Segunda	IZUA 3080
<i>Telmatobius zapahuirensis</i>	Zapahuirá, Primera	DBGUCH 3382
<i>Telmatobufo bullocki</i>	Caramávida, Octava	MZUC SN
<i>Telmatobufo venustus</i>	Altos de Vilches, Séptima	IZUA 3054

Tabla 1.- Especies de leptodactílidos chilenos incluidos en este estudio. Se indica la procedencia de cada espécimen y el número de colección. La especie *Atelognathus jeinimenensis* fue descrita recientemente (Meriggio et al., 2004) y *Eupsophus sp.* está en proceso de descripción por lo que no aparecen en Díaz-Páez y Ortiz (2003). Todos los géneros están clasificados en la subfamilia Telmatobiinae (Frost, 2004) con excepción de *Pleurodema* (subfamilia Leptodactylinae). SN: sin número de colección.

ESPECIE	Nº DE ACCESO	REFERENCIA	CLASIFICACIÓN
<i>Ceratophrys cornuta</i>	AY326014	1	Ceratophryinae
<i>Ceratophrys ornata</i>	AY326013	1	Ceratophryinae
<i>Eleutherodactylus augusti</i>	AY326011	1	Eleutherodactylinae
<i>Eleutherodactylus chloronotus</i>	AY326007	1	Eleutherodactylinae
<i>Eleutherodactylus duellmani</i>	AY326003	1	Eleutherodactylinae
<i>Eleutherodactylus fitzingeri</i>	AY326001	1	Eleutherodactylinae
<i>Eleutherodactylus mexicanus</i>	AY326006	1	Eleutherodactylinae
<i>Eleutherodactylus supernatis</i>	AY326005	1	Eleutherodactylinae
<i>Eleutherodactylus thymelensis</i>	AY326009	1	Eleutherodactylinae
<i>Eleutherodactylus w-nigrum</i>	AY326004	1	Eleutherodactylinae
<i>Lepidobatrachus sp.</i>	AY326019	1	Ceratophryinae
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	AY326017	1	Leptodactylinae
<i>Lithodytes lineatus</i>	AY326012	1	Leptodactylinae
<i>Phrynopus sp.</i>	AY326010	1	Eleutherodactylinae
<i>Physalaemus nattereri</i>	AY326020	1	Leptodactylinae
<i>Physalaemus riograndensis</i>	AY326021	1	Leptodactylinae
<i>Telmatobius niger</i>	AY326015	1	Telmatobiinae
<i>Telmatobius vellardi</i>	AY326018	1	Telmatobiinae
<i>Heleophryne purcelli</i>	AY326072	1	Heleophrynidae
<i>Limnodynastes salmini</i>	AY326071	1	Limnodynastidae
<i>Hylodes perpiclatus</i>	AY263214, AY263225	2	Cycloramphinae
<i>Telmatobius simonsi</i>	AY263218, AY263220	2	Telmatobiinae

Tabla 2.- Especies de leptodactílidos y de otras familias de los cuales se obtuvieron secuencias publicadas de los genes 12S y 16S. Se indican los números de acceso de GenBank, el trabajo donde estas secuencias se utilizaron (Referencia 1: Darst y Cannatella, 2004; 2: Vences et al., 2003) y la familia o subfamilia en la cual estas especies están clasificadas (Frost, 2004). En el caso de las secuencias utilizadas en Darst y Cannatella (2004) se indica sólo un número de acceso debido a que las secuencias obtenidas en ese estudio conforman un solo fragmento que incluye parte de los genes 12S y 16S.

3.2 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS

3.2.1 Extracción de DNA. Se extrajo DNA total de tejido de dedo o hígado preservado en alcohol absoluto. Se utilizó un protocolo basado en el método de extracción estándar de fenol-cloroformo (Sambrook et al., 1989). Un trozo de tejido de aproximadamente 2 mm de diámetro se homogeneizó en 600 μ L de búfer STE (NaCl 0,1 M; Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0), 30 μ L de SDS al 20% y 5 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Esta mezcla se mantuvo agitada a 45 °C por toda la noche hasta la disolución completa del tejido. Posteriormente se realizó una extracción fenólica de acuerdo al siguiente protocolo: se agregaron sobre la mezcla anterior, 600 μ L de fenol saturado con Tris 0,1M pH 8, se agitó hasta obtener una solución de aspecto lechoso y se centrifugó por 10 min a 2500 rpm. Luego se separó la fase superior y se agregaron subsecuentemente 500 μ L de fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) siguiendo el mismo procedimiento antes descrito. Para precipitar el DNA se agregaron 900 μ L de etanol absoluto a -20 °C sobre la fase superior resultante de la mezcla anterior. El DNA se sumergió en etanol al 70% para eliminar las sales, se dejó secar y se resuspendió finalmente en búfer TE 0,1X (Tris 1 mM pH 8; EDTA 0,1 mM pH 8). La calidad y cantidad relativa del DNA total fueron chequeadas por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

3.2.2 Elección de los genes. Se seleccionaron segmentos de los genes ribosomales 12S y 16S que corresponden a los sitios 2475-2924 (12S) y 3956-4572 (16S) del genoma mitocondrial de *Xenopus laevis* (Roe et al., 1985). El nivel de variación observado en estos dos genes ha sido útil para estudios filogenéticos en anfibios tanto a nivel intrafamiliar (por ejemplo Vences et al., 2000; Chek et al., 2001) como interfamiliar (por ejemplo Ruvinsky y Maxson, 1996; Darst y Cannatella, 2004). Un

estudio reciente demostró la utilidad de estos dos genes para estudiar eventos de divergencia relativamente recientes dentro del orden Anura (Hertwig et al., 2004).

3.2.3 Condiciones de PCR. Se amplificaron por PCR los fragmentos de los genes 12S y del 16S utilizando los siguientes partidores: H1478 (5'-TGACT GCAGA GGGTG ACGGG CGGTG TGT-3') y L1091 (5'-AAAAA GCTTC AAAC TGGGAT TAGAT ACCCC ACTAT-3') para el 12S (Kocher et al., 1989), y 16Sbr-H (5'-CCGGT CTGAA CTCAG ATCAC GT-3') y 16Sar-L (5'-CGCCT GTTTA TCAAA AACAT-3') para el 16S (Palumbi et al., 1991). La mezcla de PCR fue la siguiente (15 µL de volumen total): 11,22 µL de H₂O; 1,5 µL de búfer de amplificación 10X; 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,15 µL de dNTPs (10 mM); 0,1 µL de partidores (10 µM); 0,18 µL de polimerasa Taq (5 U/µL, Invitrogen) y 1,0 µL de DNA total. La reacción se llevó a cabo con el siguiente perfil térmico: 1 minuto de denaturación inicial a 94 °C, 32 ciclos de 30 s de denaturación a 94 °C, 45 s de "annealing" a 58-60 °C y 45 s de extensión a 72 °C, y 10 minutos de extensión final a 72 °C. En todos los casos se realizaron controles positivos (con DNA amplificado anteriormente) y controles negativos (con agua en lugar de DNA). La calidad y la intensidad relativas de los productos de PCR se chequearon en geles de agarosa al 1%.

3.2.4 Purificación y secuenciación. Para obtener suficiente producto de PCR para secuenciar, se realizaron reacciones de 50 µL con cantidades de reactivos proporcionales a las señaladas anteriormente. Se realizaron de una a tres réplicas dependiendo de la intensidad de amplificación de las diferentes muestras. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit Qiaquick (Qiagen) el que separa el DNA de todos los componentes de la reacción de PCR por medio de una membrana

de silica-gel. Los fragmentos de ambos genes fueron secuenciados en ambos sentidos por secuenciación automática con el equipo ABI 377 (Applied Biosystems). Este método de secuenciación se basa en una reacción de PCR que incorpora aleatoriamente nucleótidos marcados con fluorescencia que interrumpen la polimerización. Los productos fluorescentes son separados posteriormente por medio de cromatografía capilar. Los resultados de la secuenciación son visualizados como perfiles cromatográficos (cromatogramas) en que cada señal corresponde a una de las bases nucleotídicas de la secuencia. Se obtuvieron secuencias de ambos genes de un ejemplar por especie (Tabla 1).

3.2.5 Edición y comparación de las secuencias. Los cromatogramas de ambas hebras de cada secuencia fueron comparadas entre sí con el programa Chromas versión 1.45 (McCarthy, 1998) y luego alineadas y editadas con el programa BioEdit versión 5.0.9 (Hall, 1999). Las secuencias editadas fueron comparadas con secuencias del GenBank, utilizando la herramienta BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"), para establecer si los productos secuenciados correspondían a los genes mitocondriales 12S y 16S de anuros.

3.3 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

3.3.1 Alineamientos. El alineamiento es el paso fundamental para el proceso de inferir filogenias a partir de datos moleculares ya que es la instancia en que se identifican los caracteres homólogos (en este caso los sitios nucleotídicos) que serán utilizados para construir las hipótesis de relaciones entre los *taxa* estudiados (Hillis et al., 1996; Felsenstein, 2004). Las secuencias de cada gen fueron alineadas con el programa ClustalX (Thompson et al., 1997). Este programa utiliza un árbol guía, construido con el

algoritmo "neighbor joining", para agrupar secuencias por similitud y realizar un alineamiento progresivo de múltiples secuencias. Se ha mostrado que tiene un desempeño superior a otros programas de alineamiento al recuperar segmentos conservados de genes ribosomales (Hickson et al., 2000). Un aspecto crítico en el alineamiento es la introducción de "gaps", los cuales representan eventos de inserción o deleción de porciones variables de una secuencia que son inferidos al realizar un alineamiento de secuencias de distinta longitud. ClustalX permite establecer los valores iniciales de dos parámetros que determinan la cantidad (parámetro "gap opening" o de apertura) y la longitud (parámetro "gap extension" o de extensión) de los "gaps". Estos parámetros se establecen separadamente para el alineamiento entre pares de secuencias (que es el primer paso en que se comparan todas las secuencias entre sí) y para el alineamiento múltiple.

Los RNA ribosomales presentan una estructura secundaria formada por regiones apareadas ("stems") y desapareadas ("loops") (Mindell y Honeycutt, 1990). Debido a que los "stems" están constituidos por la unión de bases complementarias, cualquier cambio nucleotídico en las secuencias correspondientes podría afectar la formación de estas estructuras. Esta restricción estructural no se aplica a las regiones de "loops", por lo que teóricamente la mayoría de los cambios en estas regiones no tendrían un efecto perjudicial en la formación estructura secundaria de la molécula (Mindell y Honeycutt, 1990). Por esta razón las regiones del gen que corresponden a los "loops" podrían variar en longitud de una especie a otra provocando la aparición de "gaps" en un alineamiento. Esto es lo que se ha observado en los estudios moleculares en anfibios en que se ha considerado la estructura secundaria de los genes ribosomales (Richards y Moore, 1996; Graybeal, 1997).

Para establecer si hay una variación significativa en la posición, cantidad y longitud de los "gaps" debido a la utilización de distintos esquemas de alineamiento, se realizaron tres alineamientos para cada gen con valores diferentes de los parámetros de alineamiento múltiple. Los parámetros para el alineamiento entre pares de secuencias se mantuvieron en sus valores por defecto, 10 para el de apertura y 5 para el de extensión. Los valores de los parámetros de alineamiento múltiple probados fueron 5, 10 y 20 para el de apertura y 0,01, 0,05 y 0,1 para el de extensión. Los valores por defecto de ClustalX para estos parámetros son 10 y 0,05 respectivamente. Se verificó además si las regiones conservadas observadas en este estudio correspondían a las mismas identificadas en otros estudios de anfibios (Ruvinsky y Maxson, 1996; Austin et al., 2002). Después de comparar los resultados con los distintos parámetros, se escogió uno de estos alineamientos para los análisis posteriores considerando la recuperación de las regiones conservadas mencionadas (alineamiento A). Debido a que la posición de los "gaps" dentro de una región homóloga puede ser afectada por el orden en que las secuencias son analizadas por el programa ClustalX, todos los alineamientos fueron posteriormente revisados y eventualmente modificados utilizando el programa BioEdit. De esta manera se corrigió la posición de algunas bases del alineamiento A produciendo el alineamiento B.

Una alternativa de análisis, cuyo objetivo es eliminar la influencia que podrían tener las regiones ambiguas al alinear (o sea aquellas que presentan más de una alternativa de alineamiento) sobre las reconstrucciones filogenéticas posteriores, es eliminar estas regiones del alineamiento. Basándose en este principio se eliminaron algunos segmentos del alineamiento B produciendo el alineamiento C. Sin embargo, para minimizar la pérdida de información que potencialmente presentan estos sitios, no se excluyeron todas las regiones ambiguas.

3.3.2 Prueba ILD o de homogeneidad de particiones. Uno de los problemas frecuentes al utilizar más de una fuente de datos para reconstruir una filogenia es la falta de congruencia (concordancia de las topologías entre árboles) debido a una diferencia potencial en la señal filogenética que contienen los distintos datos (Sanderson y Shaffer, 2002). El método más utilizado para establecer si existe incongruencia entre los distintos datos (particiones en este contexto) es la prueba ILD ("Incongruence Length Difference") (Farris et al., 1995). Esta prueba se basa en la creación de una distribución de longitudes de árboles para particiones combinadas obtenidas al azar del mismo tamaño de las originales. La significancia estadística es medida como la probabilidad de que la suma de las longitudes de las particiones originales caiga dentro de esa distribución: una probabilidad baja implica incongruencia (Dolphin et al., 2000). La prueba ILD se realizó con el programa PAUP* versión 4.0b10 (Swofford, 2002), donde recibe el nombre de prueba de homogeneidad de particiones. La distribución se creó con 200 réplicas de las particiones. Se realizaron pruebas para los tres alineamientos obtenidos (A, B, y C). Esta prueba se utilizó para establecer cuándo aplicar el mismo modelo a ambos genes en las reconstrucciones por máxima verosimilitud e inferencia bayesiana.

3.4 RECONSTRUCCIONES FILOGENÉTICAS

3.4.1 Elección de métodos. Los métodos de reconstrucción filogenética se pueden dividir principalmente en dos clases de acuerdo a cómo los caracteres son tratados para extraer la señal filogenética contenida en ellos: métodos de distancia, en los que las diferencias entre *taxa* son reducidas a una medida cuantitativa, y métodos de optimización, en que los estados de carácter observados son utilizados para inferir las relaciones bajo un criterio que optimiza las transformaciones de esos caracteres (Page

y Holmes, 1998). La principal limitación de los métodos de distancia es que hay pérdida de información al reducir la variación a una medida cuantitativa. Entre los métodos de optimización se encuentra parsimonia y máxima verosimilitud ("maximum likelihood"). Debido a que estos métodos incorporan supuestos explícitos para explicar la evolución de los caracteres, se ha establecido que tienen un mejor desempeño para el análisis de secuencias nucleotídicas. En el caso de parsimonia se prefiere la hipótesis (topología) que implique el menor número de cambios nucleotídicos inferidos para explicar la variación observada, mientras que en máxima verosimilitud se utiliza explícitamente un modelo de evolución molecular para encontrar la topología que maximice la probabilidad de observar los datos. Recientemente un tercer tipo de aproximación se ha aplicado a la sistemática molecular, la inferencia bayesiana. A diferencia de los métodos mencionados anteriormente, la inferencia bayesiana encuentra el conjunto de árboles que mejor se ajustan al modelo de evolución proveyendo al mismo tiempo una medida de confianza estadística de las topologías obtenidas. Los fundamentos, ventajas y desventajas de estos métodos son discutidos ampliamente en Hillis et al. (1996) y Felsenstein (2004). Debido a que los métodos mencionados se basan en distintos supuestos y que una congruencia entre ellos robustece las hipótesis filogenéticas inferidas con cada uno, se realizaron reconstrucciones con los métodos de parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana.

3.4.2 Soporte estadístico. Los datos para construir una hipótesis filogenética consisten en una matriz de *taxa* y caracteres (en este caso los sitios nucleotídicos), por lo que es imposible obtener un valor de confianza estadística a partir de esta única muestra. Debido a esto se han planteado diversos métodos para determinar los límites

de confianza de las topologías (Hillis et al., 1996), pero el más usado es el “bootstrap” no paramétrico (Felsenstein, 1985). Este método pretende generar una representación del error de muestreo que se obtendría al muestrear repetidamente los caracteres. Básicamente consiste en un remuestreo de sitios nucleotídicos con reemplazo para generar alineamientos del mismo tamaño que el original, cada uno de los cuales se denomina seudoréplica. Este procedimiento se repite muchas veces realizando cada vez una reconstrucción filogenética con el nuevo alineamiento generado. El soporte de cada nodo es calculado como la proporción de veces que cada nodo aparece en el total de árboles construidos con todas las seudoréplicas. Generalmente se consideran significativos aquellos valores de “bootstrap” sobre 50 (expresados como porcentajes).

3.4.3 Análisis por máxima parsimonia (MP). El principio de parsimonia aplicado a una reconstrucción filogenética establece que la hipótesis (topología) que puede explicar la transformación de los caracteres en un menor número de pasos se debe elegir ante otras hipótesis alternativas. La transformación de cada carácter en una topología dada se determina por los procesos de polarización y optimización. La polarización requiere un grupo externo (uno o varios *taxa* relacionados con el grupo en estudio o grupo interno) para establecer la dirección de transformación y distinguir los estados de carácter primitivo y derivado. La optimización busca explicar la transformación de cada carácter por el menor número de pasos en una topología dada. Como resultado de estos procesos, cada carácter tendrá una distribución distinta de estados de carácter y un distinto desempeño con respecto a los otros caracteres evaluados. De esta manera, al considerar todos los caracteres en una topología, se pretende minimizar el número de homoplasias (convergencias, paralelismos y reversiones) y maximizar las apomorfías (caracteres derivados). Las agrupaciones de

taxa se infieren tomando en cuenta el máximo número de caracteres compartidos derivados (sinapomorfías). Por lo tanto, una medida adecuada para medir la calidad relativa de una topología es el índice de consistencia reescalado (ICR) el cual se calcula multiplicando el índice de consistencia (que mide el grado de homoplasia de los caracteres en una topología) con el índice de retención (que mide el grado de similitud de los caracteres que puede ser interpretado como sinapomorfía en una topología). Detalles acerca de la reconstrucción filogenética por MP y principios básicos del análisis de los caracteres pueden encontrarse en Wiley et al. (1991) y Kitching et al. (1998).

Se realizaron análisis por parsimonia de los alineamientos A, B y C de los genes 12S y 16S combinados con el programa PAUP*. Se realizó una búsqueda heurística debido a que el número de *taxa* utilizado no permite realizar búsquedas exhaustivas (es decir, evaluando todas las topologías posibles), lo cual no garantiza encontrar el árbol más parsimonioso. Para incorporar la información potencial que podrían representar los "gaps" producidos al alinear, se realizaron análisis adicionales para los tres alineamientos considerando los "gaps" como quinto estado de carácter. En todos los análisis se realizó una restricción topológica forzando a los grupos externos (*Heleophryne purcelli* y *Limnodynastes salmini*) a separarse del grupo interno. Los resultados de los seis análisis fueron evaluados considerando los índices de calidad de los árboles (específicamente el ICR) y el número de árboles más parsimoniosos. Para establecer el soporte estadístico de los nodos se realizaron 1000seudoréplicas de "bootstrap" con el programa PAUP*. Los árboles fueron visualizados con el programa Treeview versión 1.6.5 (Page, 1996).

3.4.4 Máxima verosimilitud (MV). El método de MV aplicado a la reconstrucción filogenética a partir de secuencias de DNA fue implementado por Felsenstein (1981). Este método incorpora explícitamente un modelo de evolución molecular para establecer la topología que maximiza la probabilidad de observar los datos (los sitios nucleotídicos) dados ciertos valores de los parámetros del modelo. A esta probabilidad en particular se le conoce como "likelihood" y es la cantidad que se busca maximizar cuando se considera la evolución de cada sitio en particular. La topología elegida es aquella que maximiza el "likelihood" de todos los sitios considerados en conjunto. Los supuestos de MV, fuera de la evolución independiente de cada sitio, son matemáticamente explícitos e incluyen parámetros para describir el proceso de sustitución, la longitud de los brazos de un árbol (expresados en términos del número esperado de cambios por sitio) y la heterogeneidad de las tasas de evolución entre sitios (se asume que la distribución de las tasas de cambio entre sitios se ajusta a una distribución gamma). Más específicamente, un modelo de sustitución puede incorporar tasas de cambio entre bases, frecuencias de bases, un parámetro (α) de la distribución gamma que determina la forma de la distribución y una proporción de sitios invariables. Los distintos modelos descritos difieren en la cantidad de parámetros que incorporan por lo que se espera que aquellos que incluyen más parámetros representen en forma más completa el proceso de cambio a nivel nucleotídico. Un método para elegir el modelo que mejor se ajusta a los datos es el LRT ("Likelihood Ratio Test"). Esta prueba requiere calcular el "likelihood" de una topología construida con los datos para cada uno de los 56 modelos descritos. Luego se evalúa cada modelo calculando la razón de "likelihood" para pares de modelos anidados hasta encontrar el que mejor se ajusta a los datos. Detalles de la base teórica y cálculos detrás del método de MV y la prueba LRT se encuentran en Huelsenbeck y Crandall (1997).

El análisis de MV fue realizado con PAUP* y el programa Modeltest versión 3.5 (Posada y Crandall, 1998). Los parámetros para los 56 modelos descritos fueron calculados en PAUP*. Luego el archivo creado con los parámetros de los modelos fue utilizado por Modeltest para calcular los LRTs y los parámetros del modelo escogido se agregaron a la matriz de datos para realizar el análisis de MV en PAUP*. Para este análisis también se realizó una restricción topológica para separar el grupo externo del interno. Se realizaron sólo 100 seudoréplicas de “bootstrap” debido a la mayor exigencia computacional de este método. El árbol resultante fue visualizado con Treeview.

3.4.5 Inferencia bayesiana (IB). La IB aplicada a una reconstrucción filogenética se basa en un valor denominado la probabilidad posterior de un árbol. El teorema de Bayes relaciona la probabilidad *a priori* de una filogenia con el “likelihood” para producir una distribución de probabilidades posteriores. Este valor puede interpretarse como la probabilidad de que ese árbol sea correcto de manera que el árbol con la mayor probabilidad posterior podría ser elegido como el mejor estimado de la filogenia (Huelsenbeck et al., 2001). Usualmente todos los árboles son considerados *a priori* como equiprobables y el “likelihood” es calculado bajo uno de los modelos estándar de evolución molecular. La probabilidad posterior requiere evaluar todas las topologías posibles y para cada topología considerar todas las combinaciones posibles de longitudes de brazos y valores de los parámetros del modelo de sustitución. Debido a que es imposible realizar esta operación de manera analítica se utiliza un método numérico conocido como MCMC (“Markov Chain Monte Carlo”). Una cadena es el procedimiento de muestrear periódicamente árboles desde un espacio de parámetros, utilizando como criterio su valor de “likelihood”. Si el muestreo se realiza un número

suficiente de veces se logra una buena aproximación de la distribución posterior de árboles. Algunos detalles acerca de las probabilidades *a priori* y posterior y del método MCMC aplicados a la IB se encuentran en Lewis (2001).

La IB fue realizada con el programa MrBayes versión 3.0B4 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Dentro del contexto del análisis, el número de pasos de la cadena recibe el nombre de generación y se puede especificar el número de generaciones por cadena y cuán a menudo es muestreada. Cada generación corresponde a una topología con cierto valor de "likelihood". En este análisis se corrieron 1.000.000 de generaciones y se muestreó cada 100, para cuatro cadenas independientes. Se especificó como modelo *a priori* el estimado con Modeltest. Para delimitar la distribución posterior a aquellos árboles muestreados con los valores mayores de "likelihood", se eliminaron los primeros 500 árboles muestreados (equivalentes a 50.000 generaciones). El árbol consenso, el cual resume la información de todos los nodos que se han observado más del 50% en la distribución posterior, fue visualizado con Treeview.

4. RESULTADOS

4.1 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS

4.1.1 Amplificación por PCR. Se obtuvo una banda para cada gen en todas las muestras probadas. Estos fragmentos presentaron los tamaños esperados para ambos genes según la posición de los partidores descrita en *Xenopus laevis*: aproximadamente 450 pares de bases (pb) para el 12S y 630 pb para el 16S.

4.1.2 Secuenciación y edición. Se obtuvieron secuencias de longitud variable para ambos genes debido a la variación intrínseca que presentan este tipo de genes y a la calidad de los cromatogramas. Para el gen 12S se obtuvieron entre 344 y 380 bases y para el 16S entre 523 y 555 bases después de eliminar los fragmentos de las secuencias correspondientes a los partidores. La comparación de estas secuencias con las del GenBank indicó que los fragmentos amplificados correspondían a los genes 12S y 16S de anuros.

4.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

4.2.1 Alineamientos. La posición, la cantidad y la longitud de los "gaps" variaron entre los tres alineamientos realizados con los distintos valores de los parámetros de alineamiento. Las regiones con "gaps" en el gen 12S, que variaron entre uno y aproximadamente ocho sitios nucleotídicos, se distribuyen más o menos uniformemente a través de toda la extensión secuenciada. En el caso del 16S, la mayor parte de los sitios variables se concentraron en una región central de aproximadamente 50 bases de longitud en que se observó un alto número de "gaps". El número de "gaps" generados fue mayor en el alineamiento con los valores menores

de los parámetros en el caso de los dos genes, pero las diferencias se observaron sólo en algunas regiones de ambos genes. No se observaron diferencias entre los alineamientos con los valores mayores de los parámetros para el gen 12S y sólo se produjeron cambios menores en la región central del 16S. Para los análisis posteriores se escogió el alineamiento con los valores intermedios de los parámetros de alineamiento porque presentó una mayor correspondencia con la posición y longitud de los "gaps" identificados en trabajos previos (alineamiento A). La longitud de este alineamiento, así como el alineamiento B, fue de 355 sitios nucleotídicos para el gen 12S y de 482 para el 16S. El alineamiento del gen 16S fue más corto que las longitudes de las secuencias obtenidas (523-555 pb) debido a que las secuencias disponibles en GenBank no corresponden a la longitud completa del fragmento secuenciado. En la Anexo 1 se muestra el alineamiento editado (alineamiento B) de los fragmentos de los genes 12S y 16S utilizando los valores de 10 (apertura) y 0,05 (extensión) para los parámetros de alineamiento. En este alineamiento se indican además los segmentos eliminados para obtener el alineamiento C, el cual redujo la cantidad de sitios a 340 para el gen 12S y 463 para el 16S.

4.2.2 Prueba de homogeneidad de particiones. Las probabilidades para cada prueba fueron: $P = 0,005$ (alineamiento A), $P = 0,07$ (alineamiento B) y $P = 0,005$ (alineamiento C). Estos resultados indican que habría incongruencia entre las topologías obtenidas para ambos genes por separado con los alineamientos A y C y que sólo los alineamientos B de ambos genes pueden ser combinados y analizados en conjunto.

4.3 RECONSTRUCCIONES FILOGENÉTICAS

4.3.1 Máxima parsimonia (MP). Los resultados de los análisis de MP realizados con los alineamientos A, B y C de ambos genes combinados se muestran en la Tabla 3. Se entregan los valores de varios parámetros que resumen los análisis en que se consideraron los sitios con “gaps” como datos faltantes (SG) o como un quinto carácter (CG).

Análisis:	SG				CG			
Parámetro:	NAMP	LA	ICR	NSIP	NAMP	LA	ICR	NSIP
Alineamiento A	6	2054	0,191	348	18	2253	0,204	359
Alineamiento B	6	2058	0,187	344	13	2236	0,197	352
Alineamiento C	100	1762	0,202	312	44	1859	0,212	318

Tabla 3.- Parámetros descriptivos de los análisis de MP de los tres alineamientos de los genes 12S y 16S combinados. Se realizaron distintos análisis considerando los “gaps” como datos faltantes (SG) o como quinto carácter (CG). Se entregan el número de árboles más parsimoniosos (NAMP), largo de los árboles (LA), índice de consistencia reescalado (ICR) y número de sitios informativos por parsimonia (NSIP).

Considerando el índice de consistencia reescalado y el número de caracteres informativos se escogió el análisis del alineamiento A, tratando los “gaps” como quinto estado, como la mejor aproximación posible por MP. Se descartó el análisis con el alineamiento C (que presentó un mayor ICR) porque produjo una cantidad mucho mayor de topologías alternativas. Los 18 árboles más parsimoniosos obtenidos con el alineamiento A difieren en agrupaciones alternativas dentro de los clados que contienen a *Alsodes*, *Batrachyla* y *Telmatobius*. En la Figura 3 se muestra uno de estos árboles con valores significativos de “bootstrap” (sobre 50) para algunos nodos.

4.3.2 Máxima verosimilitud (MV). Para este análisis se escogió el alineamiento B ya que es el que muestra la mayor correspondencia con las zonas conservadas identificadas en estudios previos para ambos genes. Utilizando como criterio la prueba de homogeneidad de particiones, se aplicó el mismo modelo de evolución molecular para ambos genes. El modelo escogido por medio de LRT fue el GTR + Γ + I ("General Time Reversible" más distribución gamma más proporción de sitios invariantes). Los parámetros del modelo fueron: frecuencia de A = 0,3425, frecuencia de C = 0,2347, frecuencia de G = 0,1804, frecuencia de T = 0,2424, tasa de cambio A-C = 8,6216, tasa de cambio A-G = 18,1941, tasa de cambio A-T = 14,5110, tasa de cambio C-G = 0,9603, tasa de cambio C-T = 72,0520, tasa de cambio G-T = 1,0000; proporción de sitios invariables (I) = 0,3372 y α = 0,5883. En la Figura 4 se muestra el árbol de MV (-Ln "likelihood" = 9470.8768) indicando los valores significativos de "bootstrap" (sobre 50) para algunos nodos.

4.3.3 Inferencia bayesiana (IB). Para este análisis también se utilizó el alineamiento B. En la Figura 5 se muestra el árbol consenso con los valores de probabilidad posterior significativos (sobre 0,95) para algunos nodos. El intervalo de confianza del 95% corresponde a 7203 árboles muestreados.

4.3.4 Topologías de MP, MV e IB. Los árboles de MP, MV e IB mostraron esencialmente la misma topología para los nodos terminales y basales. Sólo hubo una diferencia importante entre los árboles de MP y los de MV e IB: la posición más basal de los *taxa* de Leptodactylinae en los árboles de MP (compárese la Figura 3 con las Figuras 4 y 5). En los tres análisis se observan las especies de cada género de Telmatobiinae agrupadas con altos valores de respaldo estadístico, con la excepción

de *Batrachyla* que se agrupa con *Hylorina*. Otro aspecto en común entre los tres análisis es la posición basal de los grupos *Caudiverbera-Telmatobufo* y *Eleutherodactylus-Phrynopus*, los cuales se separan de todos los otros taxa incluidos con altos valores de soporte. En todos los análisis se obtuvieron además las siguientes agrupaciones de géneros con valores significativos de soporte: *Alsodes-Eupsophus*, *Atelognathus-Batrachyla-Hylorina*, *Lithodytes-Physalaemus-Pleurodema* y *Ceratophrys-Lepidobatrachus*. Las especies del género *Telmatobius* así como los géneros *Hylodes* e *Insuetophrynus* aparecen separados de los otros géneros, aunque en el primer caso hay un soporte marginal con MP para la agrupación de este género con *Ceratophrys-Lepidobatrachus* (Figura 3). En ninguno de los análisis se obtuvo respaldo estadístico para los nodos intermedios, los cuales incluyen la mayor parte de los taxa excluyendo a *Caudiverbera*, *Eleutherodactylus*, *Phrynopus* y *Telmatobufo*.

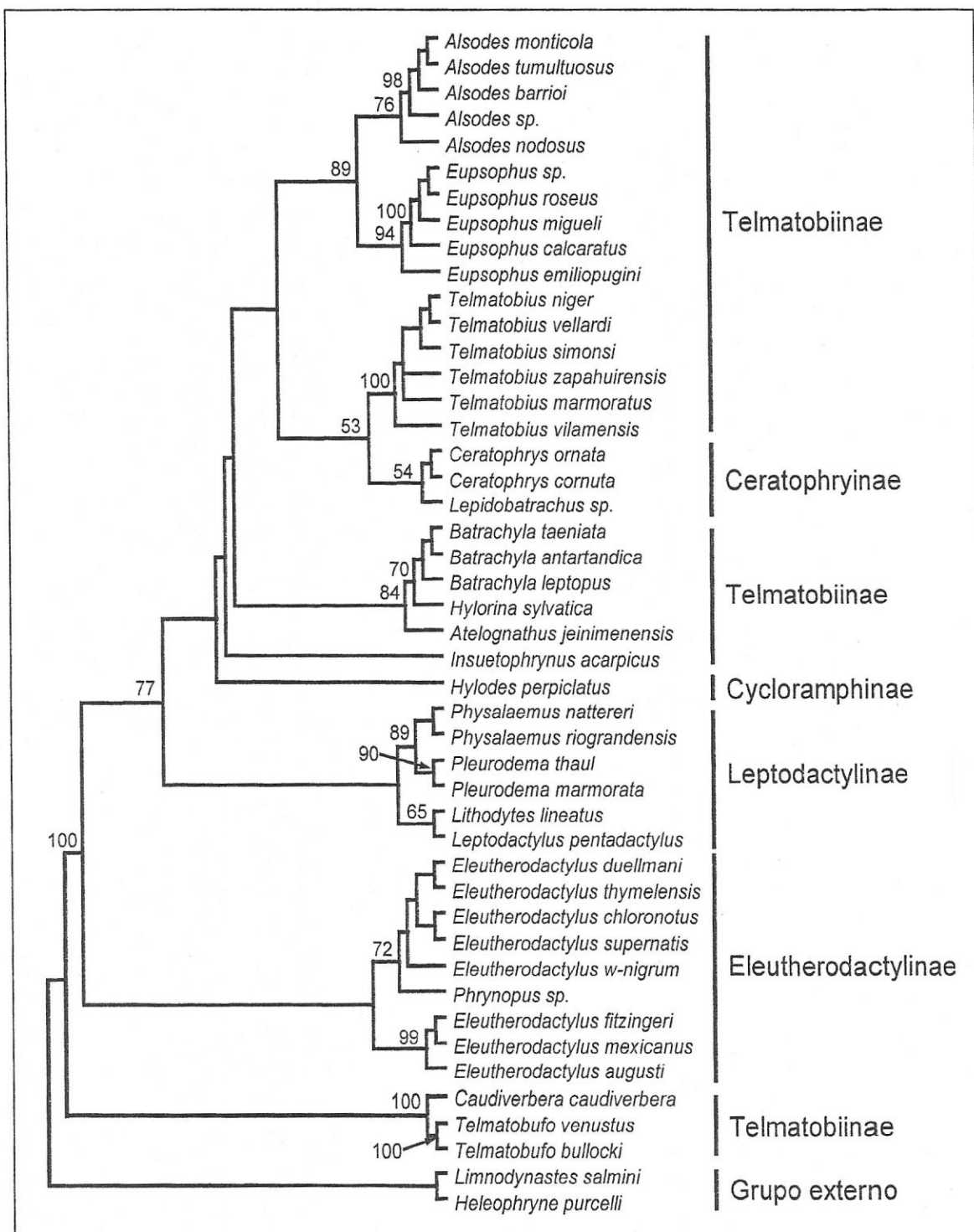


Figura 3.- Uno de los 18 cladogramas obtenidos por parsimonia utilizando 837 sitios nucleotídicos de los genes 12S y 16S de 46 taxa (Alineamiento A), considerando los "gaps" como quinto estado de carácter. Las especies utilizadas como grupos externos pertenecen a las familias Heleophrynidae y Limnodynastidae. La asignación de especies a subfamilias se basó en Frost (2004). Los números sobre los nodos corresponden a valores de "bootstrap" de 1000seudoréplicas.

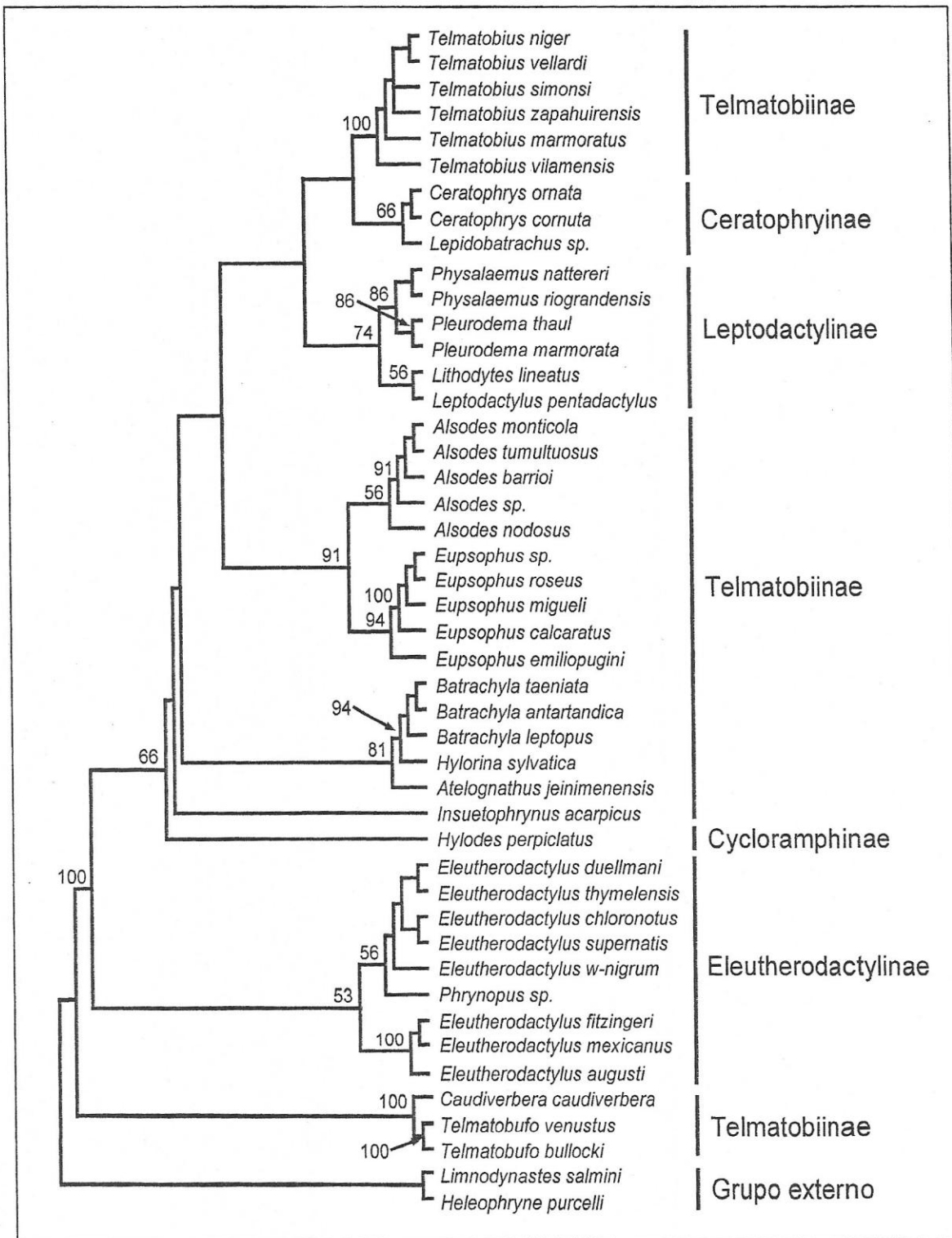


Figura 4.- Árbol de máxima verosimilitud construido con 837 sitios nucleotídicos de los genes 12S y 16S de 46 *taxa* (Alineamiento B). Las especies utilizadas como grupos externos pertenecen a las familias Heleophrynidae y Limnodynastidae. La asignación de especies a subfamilias se basó en Frost (2004). Los números sobre los nodos corresponden a valores de "bootstrap" de 100 seudorélicas.

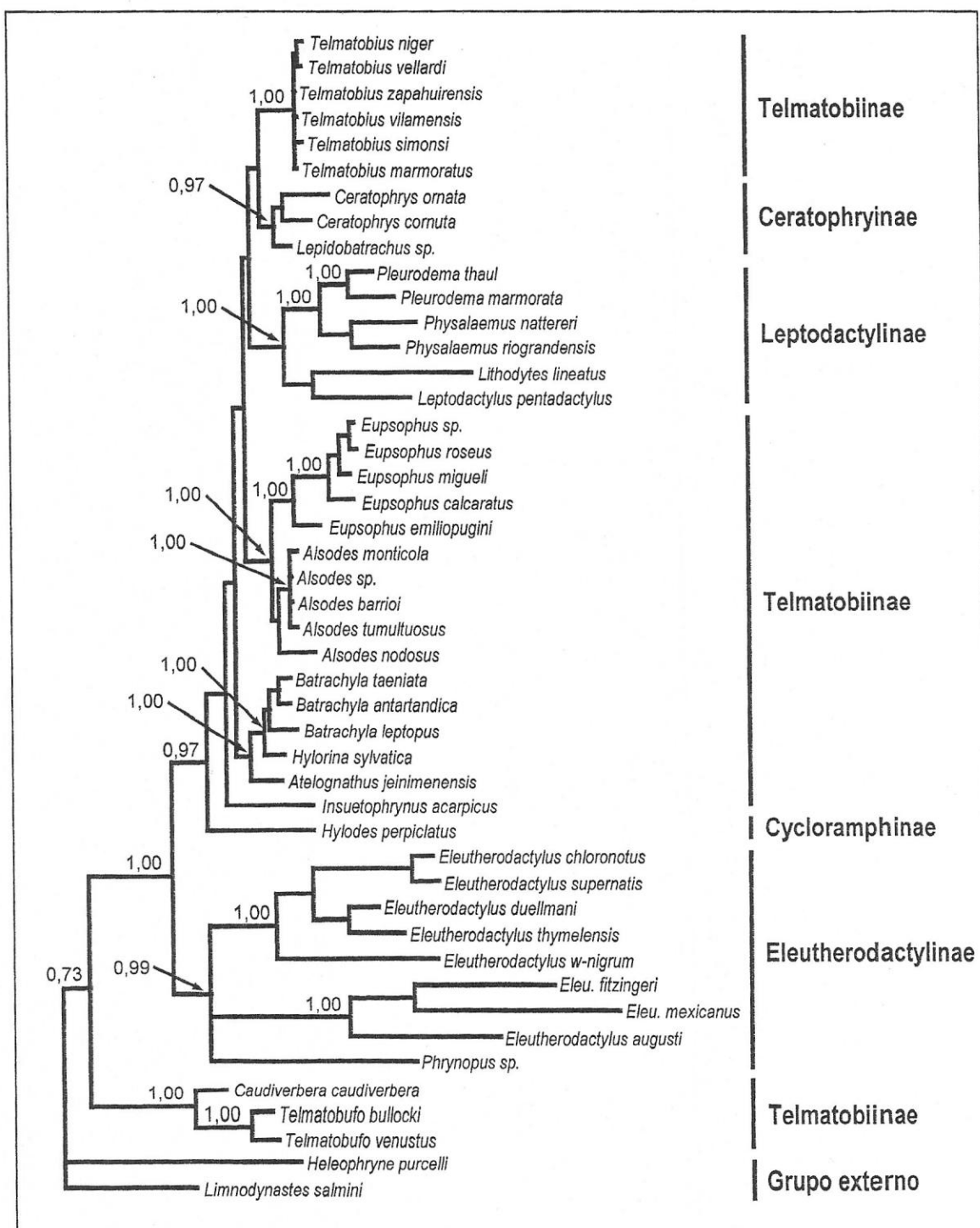


Figura 5.- Árbol consenso de inferencia bayesiana construido con 837 sitios nucleotídicos de los genes 12S y 16S de 46 *taxa* (Alineamiento B). Como grupo externo se utilizaron dos especies de las familias Heleophrynidae y Limnodynastidae. La asignación de especies a subfamilias se basó en Frost (2004). Los números sobre los nodos corresponden a valores de probabilidad posterior para una distribución construida con 9500 árboles muestreados (ver sección 3.4.5 para más detalles). La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones nucleotídicas.

5. DISCUSIÓN

5.1 UTILIDAD DE LOS GENES 12S Y 16S

La concordancia entre los estudios de sistemática de anfibios basados en caracteres morfológicos y moleculares por separado, indica que ambas aproximaciones son válidas, por lo menos en lo que se refiere a la distinción de las grandes agrupaciones tradicionalmente reconocidas dentro del orden Anura (Archaeobatrachia y Neobatrachia; Hyloidea y Ranoidea dentro de Neobatrachia). Por lo tanto, la discusión de la utilidad de los caracteres se ha trasladado a establecer el grado de resolución que se puede obtener tanto con datos morfológicos como moleculares. Haas (2003) muestra que un número suficientemente alto de caracteres morfológicos, en este caso 136 larvarios y 14 de adultos, permite distinguir agrupaciones hasta el nivel de subfamilias. Por otra parte, Hertwig et al. (2004) señalan que los genes ribosomales mitocondriales 12S y 16S presentan una señal filogenética adecuada para estudiar eventos filogenéticos relativamente recientes (en este caso a nivel de familias), pero que no permite resolver consistentemente entre los mayores grupos del orden Anura al utilizar distintos métodos y modelos. Varios estudios ratifican estos resultados, donde estos genes han sido utilizados para estudiar problemas filogenéticos tanto a nivel inter como intrafamiliar (por ejemplo Vences et al., 2000; Austin et al., 2002; Darst y Cannatella, 2004).

Los resultados del presente estudio ilustran el rango de resolución que se puede alcanzar al combinar la información de los genes mitocondriales 12S y 16S. Por una parte se pueden reconocer tres linajes (que presentan altos valores de soporte estadístico en los análisis de MP, MV e IB) que podrían considerarse las principales divisiones observadas dentro de la familia: *Caudiverbera-Telmatobufo*,

Eleutherodactylus-Phrynopus y un grupo conformado por los restantes telmatobinos, Ceratophryinae, *Hylodes* y Leptodactylinae (Figuras 3, 4 y 5). Por otra parte, la inclusión de varios representantes de algunos géneros, permitió constatar que también se puede obtener cierta resolución a nivel intragenérico. Es así como dentro de *Eupsophus* se puede apreciar una separación entre *E. emillopugini* del resto de las especies, lo cual concuerda con la división en dos grupos reconocida dentro del género (Formas, 1991; Formas y Brieva, 1992; Núñez, 2003). Del mismo modo, los análisis muestran la divergencia de *Alsodes nodosus* de las otras especies del género, separación respaldada por otro tipo de evidencia (Díaz y Veloso, 1979; Formas y Vera, 1983).

Como se puede observar hay eventos de divergencia a nivel basal y terminal que presentan altos valores de soporte estadístico en todos los análisis (MP, MV e IB). Con respecto a los nodos intermedios, la principal diferencia entre los análisis MP y MV-IB es la posición de los *taxa* de Leptodactylinae, los cuales aparecen en una posición más basal en el análisis de MP (Figura 3). Aunque en ninguno de los análisis hay soporte estadístico para respaldar la posición de este grupo, las topologías obtenidas con MV e IB (Figuras 4 y 5) son compatibles con la relación propuesta entre los géneros *Pleurodema* y *Eupsophus* (Lynch, 1971; Duellman y Veloso, 1977). La falta de soporte en los nodos intermedios podría estar relacionada con una baja resolución de los fragmentos de los genes analizados o con la utilización de un número insuficiente de caracteres. Sin embargo, la interpretación histórica es que los eventos filogenéticos que llevaron a la diferenciación de estos grupos fueron casi simultáneos como sugieren las longitudes de ramas entre los nodos intermedios del análisis de IB (Figura 5).

5.2 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS TELMATOBINOS

Los cambios realizados en la composición de las subfamilias de Leptodactylidae desde la revisión de Lynch (1971) reflejan que no se ha alcanzado un consenso en esta materia, por lo que un paso previo para entender las consecuencias de una potencial redefinición de la familia es establecer si las agrupaciones que la conforman pueden reconocerse a su vez como grupos naturales. El presente trabajo se enmarca dentro de esta perspectiva considerando en particular la subfamilia Telmatobiinae. Los resultados de los análisis moleculares se presentarán y discutirán en base a las principales relaciones propuestas anteriormente para esta subfamilia y el género leptodactilino *Pleurodema*.

Frost (2004) define la subfamilia Telmatobiinae con los géneros *Alsodes*, *Atelognathus*, *Batrachophrynus*, *Batrachyla*, *Caudiverbera*, *Eupsophus*, *Hylorina*, *Insuetophrynus*, *Somuncuria*, *Telmatobius* y *Telmatobufo*. A este conjunto se puede agregar *Telmalsodes*, género definido por Díaz (1989) para dos especies de *Alsodes* con afinidades problemáticas. Los únicos géneros que no se incluyeron en el presente estudio fueron *Batrachophrynus*, *Somuncuria* y *Telmalsodes*, los cuales corresponden a géneros poco diversificados y muy localizados geográficamente. Los análisis realizados con MP, MV e IB, en que se incluyeron representantes de nueve géneros de telmatobinos (Tabla 1) y ocho géneros pertenecientes a las otras cuatro subfamilias de leptodactílidos (Tabla 2), indican que no hay sustento para reconocer a Telmatobiinae como un grupo monofilético (Figuras 3, 4 y 5). Estos análisis muestran que la mayoría de los géneros de telmatobinos forman una agrupación con géneros de otras subfamilias. Esto implica que Telmatobiinae como es definida actualmente es polifilética. Los grupos reconocidos en todos los análisis son *Caudiverbera-Telmatobufo*, *Atelognathus-Batrachyla-Hylorina* y *Alsodes-Eupsophus*. Los géneros

Insuetophrynus y *Telmatobius* no se agrupan con otros telmatobinos. Sin embargo, en el caso de *Telmatobius* hay una asociación con los miembros de Ceratophryinae, aunque con un respaldo estadístico marginal solo en el análisis de MP (Figura 3).

La posición basal de *Caudiverbera* y *Telmatobufo* dentro de los telmatobinos fue sostenida por Lynch (1978) quien agrupó estos dos géneros en la tribu Calyptocephalellini dentro de la subfamilia Telmatobiinae. Con anterioridad este autor (1971) incluyó a *Caudiverbera* y *Telmatobufo* con *Batrachophrynus* y *Telmatobius* (más el género fósil *Neoprocoela*) en la tribu Telmatobiini, una de las cinco que conformaban la subfamilia Telmatobiinae. La subfamilia Calyptocephalellini fue definida considerando la divergencia morfológica de *Caudiverbera* (Reig, 1960). Estudios posteriores indican que este género monotípico ocupa una posición basal dentro de la filogenia de los telmatobinos (Díaz y Veloso, 1979; Díaz, 1986). La posición de *Telmatobufo* ha sido más problemática. Cei (1962) consideró a este género como *incertae sedis*, mientras que en un trabajo posterior (1970) lo considera estrechamente relacionado con *Telmatobius*. Lynch (1971) lo incluyó dentro de la tribu Telmatobiini, pero más tarde, al revisar las relaciones entre los telmatobinos inferiores (Lynch, 1978), lo separa junto a *Caudiverbera* en la subfamilia Calyptocephalellini. Formas y Espinoza (1975) aportaron evidencia cromosómica que sustenta la agrupación de *Caudiverbera* y *Telmatobufo*. Trabajos posteriores no respaldaron esta evidencia (por ejemplo Díaz y Valencia, 1985, en base a la morfología larval) sugiriendo afinidades de *Telmatobufo* con otros géneros (Díaz, 1986). Los estudios más recientes de relaciones al interior del género *Telmatobufo* han considerado a este género como el grupo hermano de *Caudiverbera* (Núñez y Formas, 2000; Formas et al., 2001). Los análisis de los genes 12S y 16S muestran a Calyptocephalellini, *sensu* Lynch (1978), como un grupo diferenciado (con soporte estadístico en todos los análisis) que ocupa una posición

basal en todas las reconstrucciones filogenéticas. Este resultado contrasta con las relaciones propuestas por Lynch (1971) quien indica una posición relativamente basal de los telmatobinos en la filogenia de los leptodactílidos, pero sitúa a Ceratophryinae como el linaje más tempranamente divergente de la familia.

Otra agrupación observada en todos los análisis moleculares está constituida por los géneros *Atelognathus*, *Batrachyla* e *Hylorina*. Lynch (1971) considera a los dos últimos géneros como parte de la tribu Alsodini (*Batrachyla*, *Eupsophus*, *Hylorina* y *Thoropa*), pero más tarde separa a *Batrachyla* y *Thoropa* para formar la tribu Batrachyliini (Lynch, 1978). La relación entre *Batrachyla* e *Hylorina* ha sido sustentada en base a caracteres morfológicos y moleculares (Díaz, 1981, 1986; Basso, 1994), pero no es apoyada por la morfología larval (Díaz y Valencia, 1985). Las relaciones de *Atelognathus* con otros géneros telmatobinos son menos claras. Lynch (1978) creó este género para especies patagónicas originalmente consideradas como pertenecientes a *Telmatobius*. Los análisis cladísticos realizados por este autor agrupan a este género con *Insuetophrynus* dentro de la tribu Telmatobiini. Especies de este género no fueron incluidas en análisis posteriores de los telmatobinos por autores chilenos (Díaz y Veloso, 1979; Díaz, 1986).

La agrupación de *Alsodes* y *Eupsophus* ha sido apoyada por diversos autores. De hecho Grandison (1961), Cei (1962) y Lynch (1971) consideraron las especies de *Alsodes* como parte de *Eupsophus*. Lynch (1978) incluyó *Alsodes* en su análisis de las relaciones entre los telmatobinos inferiores donde lo agrupa con *Telmatobius* dentro de la tribu Telmatobiini. Esta misma relación ha sido sustentada en varios trabajos posteriores (Díaz y Veloso, 1979; Díaz y Valencia, 1985; Díaz, 1986, 1989). *Eupsophus*, por otra parte, ocupa distintas posiciones en los distintos análisis de Lynch (1978), pero también es asignado a Telmatobiini. Estudios posteriores indican la

posición basal de *Eupsophus* con respecto a todos los otros géneros de Telmatobiinae, con excepción de *Caudiverbera* (Díaz y Veloso, 1979; Díaz, 1986). Estos mismos trabajos indican una relación más estrecha de este género con *Batrachyla* e *Hylorina*.

Otros dos géneros, *Insuetophrynus* y *Telmatobius*, no se agrupan con los otros representantes de Telmatobiinae incluidos en este estudio. Debido a ciertos rasgos morfológicos de *Insuetophrynus* y algunas características peculiares de su historia de vida (Díaz et al., 1983), las relaciones de este género han sido estudiadas con particular interés (Díaz et al., 1983; Díaz y Valencia, 1985). Estos estudios indican una relación más estrecha con *Alsodes* y *Telmatobius* que con otros géneros. Otros estudios de más amplio alcance (Díaz y Veloso, 1979; Díaz, 1986) ubican a *Insuetophrynus* con estos mismos géneros, pero indican una relación más estrecha con *Alsodes*. El género *Telmatobius* fue incluido por Lynch (1971) en la tribu Telmatobiini quien señala sus relaciones con los géneros *Neoprocoela* y *Batrachophrynus*. Posteriormente este mismo autor (1978) excluyó las formas patagónicas del género y realizó varios análisis cladísticos que sustentan la relación de *Telmatobius* y *Alsodes*. Trabajos posteriores de autores chilenos ratifican esta hipótesis (Díaz y Valencia, 1985; Díaz, 1989). Cabe destacar que en ninguno de estos estudios se ha propuesto la separación de *Insuetophrynus* o *Telmatobius* del resto de los géneros de telmatobinos.

El otro género de leptodactílido chileno incluido en este estudio es *Pleurodema*, el cual pertenece a la subfamilia Leptodactylinae (Lynch, 1971; Heyer, 1975; Duellman y Trueb, 1986; Frost, 2004). Varios autores han señalado la relación de *Pleurodema* con los telmatobinos, específicamente con el género *Eupsophus* (Lynch, 1971; Duellman y Veloso, 1977; Díaz y Veloso, 1979). Los datos moleculares del presente estudio muestran la agrupación de *Pleurodema* con los otros géneros leptodactilinos

incluidos (*Lithodytes* y *Physalaemus*), con alto soporte estadístico en todos los análisis (Figuras 3, 4 y 5).

Los párrafos previos muestran el amplio espectro de relaciones que han sido propuestas entre los géneros de telmatobinos. Como se puede apreciar, los análisis moleculares de esta subfamilia permiten respaldar varias de las relaciones propuestas principalmente en base a estudios morfológicos y cariológicos. Una comparación similar podría aplicarse a las otras subfamilias, pero el muestreo de géneros del presente estudio es insuficiente para discutir las relaciones al interior de ellas. Sin embargo, es importante destacar que las especies incluidas de cada subfamilia se agrupan entre sí con altos valores de soporte estadístico. Es así como en todos los análisis se observan las agrupaciones *Eleutherodactylus-Phrynopus* (Eleutherodactylinae), *Lithodytes-Physalaemus-Pleurodema* (Leptodactylinae) y *Ceratophrys-Lepidobatrachus* (Ceratophryinae). La posición aislada de *Hylodes*, género que no pudo ser comparado con ningún otro miembro de Cycloramphinae, sugiere que por lo menos este género no tiene afinidades estrechas con otras subfamilias. En cuanto a las relaciones entre las otras subfamilias, destaca la separación de las especies de los géneros *Eleutherodactylus* y *Phrynopus*, las cuales se ubican en una posición basal con un alto valor de soporte en todos los análisis. La posición de estos *taxa* difiere notablemente de las relaciones propuestas para esta subfamilia dentro de la familia (Lynch, 1971; Heyer, 1975) (Figura 1A y B), pero considerando la cantidad de especies comprendidas en esta subfamilia (el género *Eleutherodactylus* es el más numeroso de la clase Amphibia) es imposible generalizar este resultado. En cualquier caso, los resultados moleculares muestran claramente que por lo menos algunas especies de esta subfamilia divergieron tempranamente del resto de los leptodactílicos.

Finalmente queda por señalar aquellos resultados de los análisis que podrían considerarse como novedosos. Las posiciones aisladas de *Insuetophrynus* y *Telmatobius* con respecto a otros géneros de telmatobinos representan nuevas hipótesis de relaciones para estas especies. *Insuetophrynus* ocupa una posición basal con respecto a todos los otros telmatobinos, con la excepción de *Caudiverbera* y *Telmatobufo* (Figuras 3, 4 y 5). Este resultado sugiere una diferenciación relativamente temprana de *Insuetophrynus* que concuerda con la divergencia morfológica descrita para este género (Díaz, 1983). *Telmatobius* en cambio aparece en una posición más terminal, relacionado con miembros de la subfamilia Ceratophryinae y separado de los otros telmatobinos. En este caso hay un soporte estadístico marginal en el análisis de MP (Figura 3). La relación de *Atelognathus* con *Batrachyla* e *Hylorina* tiene alto soporte estadístico en todos los análisis, pero es necesario incluir más especies del primer género para respaldar esta hipótesis.

5.3 CONSIDERACIONES BIOGEOGRÁFICAS

Como Duellman y Trueb (1986) enfatizan, cualquier síntesis biogeográfica debería basarse en un análisis filogenético de los *taxa* en estudio. Estos mismos autores señalan además que a medida que el registro fósil de los anuros se va completando y se obtienen más datos moleculares con los cuales estimar tiempos de divergencia, el cuadro biogeográfico de este grupo de anfibios debería mejorar. En este sentido, el escaso registro fósil de los leptodactílicos es de poca utilidad para establecer su filogenia por lo que tiene un limitado valor en un contexto biogeográfico (Lynch, 1971). La información paleontológica de los telmatobinos también es escasa, por lo que este tipo de evidencia aporta pocos datos a la discusión de las relaciones filogenéticas de esta subfamilia. Debido a esto, no hay datos que permitan estimar los

tiempos de origen de las subfamilias de Leptodactylidae y por ende, obtener puntos de calibración que puedan aplicarse a los datos de secuencias. Por este motivo parece poco justificado aplicar un reloj molecular a los datos del presente estudio. Sin embargo, es posible extraer alguna información a partir de las divergencias relativas observadas entre las especies incluidas.

Se considera que los leptodactílidos se originaron en los bosques templados de Sudamérica durante el Cretáceo tardío y que los telmatobinos constituyen un remanente del stock original que ha permanecido en el extremo austral del continente (Cej, 1962; Lynch, 1971; Savage, 1973; Heyer, 1975; Formas, 1979; Duellman y Trueb, 1986). Aunque hay registros fósiles de fines del Cretáceo que podrían atribuirse a la familia, los restos que pueden relacionarse con las formas actuales, específicamente con *Caudiverbera*, datan del Eoceno temprano (Lynch, 1971; Báez y Gasparini, 1979). En los depósitos del Oligoceno inferior de la Patagonia argentina se han descrito fósiles atribuibles a los géneros actuales *Caudiverbera* y *Eupsophus* (Schaeffer, 1949). La presencia de *Caudiverbera* en esta época indica una diferenciación temprana de los telmatobinos y remonta por lo menos al Eoceno el origen de algunos de los géneros actuales. La posición de *Caudiverbera* y *Eupsophus* en los análisis de los datos moleculares podría ser compatible con la presencia de ambos géneros en el Oligoceno, pero remonta muy atrás, quizás hacia fines del Cretáceo, el origen de *Caudiverbera* (y por lo tanto de *Telmatobufo*).

La distribución actual de Telmatobiinae, con la mayor diversidad de géneros localizada en el extremo suroeste de Sudamérica (Figura 1), es el resultado de los cambios fisiográficos y climáticos del Cenozoico, particularmente el levantamiento de la cordillera de los Andes y la disminución en la extensión de los bosques templados del sur de Sudamérica (Cej, 1962; Vuilleumier, 1968; Formas, 1979). Con respecto al

origen de esta subfamilia, algunos autores señalan que las especies que habitan actualmente estos bosques representan los restos de una fauna de anfibios más numerosa que ya estaba diversificada en el Cenozoico (Vellard, 1957; Cei, 1962). Una interpretación de esta hipótesis es un origen único y una diversificación *in situ* de los telmatobinos en los bosques australes. Una hipótesis alternativa (Vuilleumier, 1968), postula que la fauna de anfibios de los bosques australes estaría compuesta por cuatro elementos (grupos de géneros o especies) con historias diferentes, por lo que la actual diversidad y el alto nivel de endemismo observados en esta subfamilia son el resultado de una larga y compleja historia en estos bosques. Las relaciones filogenéticas observadas en el presente estudio concuerdan más con el escenario planteado por este autor que con la hipótesis de una fauna remanente sostenida por Vellard (1957) y Cei (1962), aunque la identificación de los elementos históricos mencionados por Vuilleumier (1968) se complica por las relaciones observadas de los telmatobinos con especies de otras subfamilias.

Las otras subfamilias consideradas en este estudio merecen comentarios adicionales. La posición relativamente terminal de los *taxa* de la subfamilia Ceratophryinae, la cual ha sido considerada por algunos autores como una familia diferente basándose en su divergencia morfológica (Cei, 1980), no es respaldada por la evidencia paleontológica ya que los fósiles más antiguos de esta subfamilia se remontan al Plioceno tardío (Lynch, 1971; Báez y Gasparini, 1979). De este modo los datos moleculares concuerdan más con la información paleontológica que con las relaciones inferidas en base a otros tipos de evidencia y en particular no sustentan la separación de este grupo como una familia diferente.

La posición basal que muestran las especies de eleuterodactilinos incluidos en este estudio contrasta con las relaciones propuestas para esta subfamilia (Lynch, 1975;

Heyer, 1975). Un origen temprano podría explicar por una parte la extraordinaria diversificación y el enorme número de especies conocidas dentro de esta subfamilia, y por otra parte la presencia de formas diferenciadas en las Antillas y otras regiones de Sudamérica (Savage, 1973). En la ausencia de una muestra más numerosa de especies de esta subfamilia, es imposible descartar un estatus polifilético o parafilético para esta agrupación, con algunos miembros ocupando una posición equivalente a la tradicionalmente aceptada para los telmatobinos y ceratofrinos en la filogenia de la familia (como sugieren los datos moleculares). Por otra parte, la posición y los largos de rama observados entre las especies incluidas de esta subfamilia (Figura 5), concuerdan con la edad inferida para algunas especies de *Eleutherodactylus* de América Central (Crawford, 2003).

Otro taxón incluido en estos análisis cuya posición es importante en el contexto de las relaciones propuestas para los telmatobinos, es *Hylodes*. Se considera que la subfamilia Cycloramphinae (= Grypiscines de Heyer, 1975) divergió tempranamente de un ancestro tipo telmatobino y evolucionó aisladamente en el macizo del sureste de Brasil (Heyer, 1975). La posición relativamente basal de *Hylodes*, separado de todas las otras especies en todos los análisis, concuerda con los resultados de Maxson y Heyer (1982) quienes consideran a esta subfamilia como un linaje antiguo que probablemente comenzó a diversificarse ya en el Paleoceno.

Las posiciones de *Pleurodema* y *Telmatobius* merecen comentarios adicionales. Basándose principalmente en caracteres morfológicos se ha postulado una relación entre *Pleurodema* y *Eupsophus*, lo que pondría a *Pleurodema* en un contexto temporal y geográfico que podría explicar la diversificación alcanzada por este género (Duellman y Veloso, 1977). Con la excepción del análisis de MP, los datos moleculares son consistentes con un origen común para ambos géneros, pero habría que extender esta

relación a otros *taxa*, específicamente a los géneros *Alsodes* y *Telmatobius* y a los otros leptodactilinos y ceratofrinos incluidos. Por otra parte, cabe destacar la agrupación y la ubicación de las especies de *Telmatobius* incluidas. El muestreo incluyó dos especies de Ecuador, una de Bolivia y tres de Chile con el objeto de abarcar una parte importante del rango de distribución de este género andino. Aunque se ha indicado que *Telmatobius* no constituiría una agrupación natural (Wiens, 1993), se destaca la poca variación observada en secuencias obtenidas de especies tan distanciadas geográficamente (lo que se refleja en los largos de ramas que separan estos *taxa*, Figura 5). Este resultado concuerda con las bajas distancias inmunológicas calculadas entre especies de *Telmatobius* por Maxson y Heyer (1982), las que fueron interpretadas como indicación de un proceso reciente de especiación para este género. Esto se puede relacionar con la posición más terminal de esta agrupación con respecto a otros telmatobinos y otras subfamilias, lo que concuerda con la distribución andina de este género y por lo tanto con un origen relativamente reciente para estas especies.

5.4 UNA NUEVA PERSPECTIVA PARA LA SISTEMÁTICA DE LOS LEPTODACTÍLIDOS CHILENOS

Los antecedentes mencionados en las secciones previas ponen de manifiesto la falta de concordancia para las relaciones entre las agrupaciones que conforman Leptodactylidae según su definición actual. Aunque la resolución de este problema es fundamental para un entendimiento más profundo de la historia evolutiva de Hyloidea, el grupo más diverso y numeroso de anuros, un paso previo es establecer si los linajes reconocidos como parte de esta familia son grupos evolutivos independientes. En este contexto la definición y las relaciones de los telmatobinos adquieren una especial relevancia debido a la posición basal que se ha postulado para esta subfamilia.

El cuadro general de relaciones obtenido con los datos moleculares indica que Telmatobiinae no constituye una subfamilia monofilética (con la composición aceptada actualmente, Frost, 2004) ni hay sustento para alguna de las divisiones propuestas por Lynch (1971, 1978) o posteriormente por otros autores para esta agrupación. Estos resultados implican un cuadro más complejo para el origen y diversificación de los anfibios chilenos. Esta nueva perspectiva también plantea la necesidad de reevaluar algunas de las hipótesis evolutivas, por ejemplo de estudios cromosómicos o de las estrategias reproductivas, considerando las relaciones de estas especies con miembros de otras subfamilias que se derivan de los datos moleculares.

De esta forma, el presente estudio aporta nueva evidencia a la discusión de la sistemática, el origen y la diversificación de los anfibios chilenos. Estos datos muestran un panorama bastante distinto de las relaciones entre los géneros presentes en nuestro territorio, el cual podría ampliarse considerando dos aspectos principales de los datos utilizados. En primer lugar, la tarea de analizar parte de la familia Leptodactylidae se ve limitada por el elevado número de linajes que la componen. En segundo lugar, la cantidad y la calidad de los caracteres incluidos podría ser la causa del bajo soporte estadístico en los nodos intermedios de las topologías obtenidas. Ambos aspectos deben ser considerados para profundizar el estudio de la sistemática de la subfamilia Telmatobiinae. En el primer caso, el esfuerzo debería concentrarse en incluir un número mucho mayor de *taxa* para obtener un marco de comparación más amplio y representativo de la enorme cantidad de linajes de la familia. El segundo punto debería ser enfrentado incorporando nuevos tipos de caracteres, como por ejemplo otros genes mitocondriales o nucleares, o combinando la evidencia molecular con los numerosos estudios morfológicos realizados hasta la fecha.

6. CONCLUSIONES

- La señal filogenética contenida en los segmentos de los genes 12S y 16S permite distinguir eventos de divergencia relativamente antiguos, como la separación de *Caudiverbera-Telmatobufo* del resto de los leptodactílidos incluidos, y otros más recientes, como la diferenciación de ciertas especies al interior de los géneros *Alsodes* y *Eupsophus*.
- Los datos moleculares permiten agrupar todas las especies de cada género de Telmatobiinae incluido, con la excepción de *Hylorina*.
- Las topologías obtenidas con los distintos métodos de reconstrucción filogenética, indican que Telmatobiinae (*sensu* Frost, 2004) no conforma una agrupación natural (monofilética), ni ocupa la posición basal en la filogenia de la familia.
- Los datos moleculares respaldan hipótesis previas basadas en otro tipo de evidencia (por ejemplo las agrupaciones *Caudiverbera-Telmatobufo*, *Batrachyla-Hylorina* y *Alsodes-Eupsophus*) y sustentan otras nuevas para los géneros de telmatobinos incluidos (por ejemplo la posición aislada de *Insuetophrynus* y la relación de *Telmatobius* con géneros de otras subfamilias).
- En conjunto, los resultados contrastan con las hipótesis de relaciones propuestas al interior de Leptodactylidae y en particular con la composición aceptada actualmente para la subfamilia Telmatobiinae, lo que sugiere la necesidad de una reevaluación de la sistemática de la familia incorporando datos moleculares.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Austin, J. D., S. C. Loughheed, K. Tanner, A. A. Chek, J. P. Bogart y P. T. Boag. 2002. A molecular perspective on the evolutionary affinities of an enigmatic neotropical frog, *Allophryne ruthveni*. Zool. J. Linn. Soc. 134: 335-346.
- Báez, A. M. y Z. M. de Gasparini. 1979. The South American herpetofauna: an evaluation of the fossil record. En: Duellman, W. D. (ed.). The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution and Dispersal. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas Monograph. 7: 141-156.
- Barrio, A. y P. Rinaldi de Chieri. 1971. Contribución al esclarecimiento de la posición taxofilética de algunos batracios patagónicos de la familia Leptodactylidae mediante el análisis cariotípico. Physis 81: 673-685.
- Basso, N. G. 1994. Una nueva especie de *Batrachyla* (Anura: Leptodactylidae: Telmatobiinae) de Argentina. Relaciones filogenéticas interespecíficas. Cuadernos de Herpetología 8: 51-56.
- Biju, S. D. y F. Bossuyt. 2003. New frog family from India reveals an ancient biogeographical link with the Seychelles. Nature 425: 711-714.
- Cannatella, D. C. y D. M. Hillis. 1993. Amphibian relationships: phylogenetic analysis of morphology and molecules. Herpetol. Mongr. 7: 1-7.
- Cei, J. M. 1962. Batracios de Chile. Ediciones Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Cei, J. M. 1970. La posición filética de Telmatobiinae, su discusión reciente y significado crítico de algunos inmunotests. Acta Zool. Lilloana 27: 181-192.
- Cei, J. M. 1980. Amphibians of Argentina. Monitore Zool. Ital. (N. S.) Monogr. 2: 1-609.
- Chek, A. A., S. C. Loughheed, J. P. Bogart y P. T. Boag. 2001. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of Neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). Mol. Phylogenet. Evol. 18: 370-385.
- Crawford, A. J. 2003. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. Mol. Ecol. 12: 2525-2540.
- Darst, C. R. y D. C. Cannatella. 2004. Novel relationships among hylid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 31: 462-475.
- Díaz, N. F. 1981. Aspectos comparativos de lactato deshidrogenasas de cristalinos aplicados a la sistemática de los anfibios chilenos. Medio Ambiente 5: 39-44.
- Díaz, N. F., J. Valencia y M. Sallaberry. 1983. Life history and phylogenetic relationships of *Insuetophrynus acarpicus* (Anura: Leptodactylidae). Copeia 1983: 30-37.

- Díaz, N. F. 1986. Biosistemática de los Leptodactylidae chilenos. An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso 17: 65-85.
- Díaz, N. F. 1989. Phenetic and phylogenetic relationships of the Chilean *Alsodes* and *Telmatobius* (Amphibia, Leptodactylidae) and proposal of a new genus. Stud. Neotrop. Fauna Environ. 24: 25-33.
- Díaz, N. F. y J. Valencia. 1985. Larval morphology and phenetic relationships of the Chilean *Alsodes*, *Telmatobius*, *Caudiverbera* and *Insuetophrynus* (Anura: Leptodactylidae). Copeia 1985: 175-181.
- Díaz, N. F. y A. Veloso. 1979. Sistemática y evolución de los anfibios de Chile. Arch. Biol. Med. Exper. 12: 59-70.
- Díaz-Páez, H. y J. C. Ortiz. 2003. Evaluación del estado de conservación de los anfibios chilenos. Rev. Chil. Hist. Nat. 76: 509-525.
- Dolphin, K., R. Belshaw, C. D. L. Orme y D. L. J. Quicke. 2000. Noise and incongruence: interpreting results of the incongruence length difference test. Mol. Phylogenet. Evol. 17: 401-406.
- Duellman, W. E. 1979. The South American Herpetofauna: A Panoramic View. En: Duellman, W. D. (ed.). The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution and Dispersal. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas Monograph. 7: 1-28.
- Duellman, W. E. y L. Trueb. 1986. Biology of Amphibians. The Johns Hopkins Press Ltd., London.
- Duellman, W. E. y A. Veloso. 1977. Phylogeny of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae): a biogeographic model. Occas. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas 64: 1-46.
- Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge y C. Bult. 1995. Constructing a significance test for incongruence. Syst. Biol. 44: 570-572.
- Feller, A. E. y S. B. Hedges. 1998. Molecular evidence for the early history of living amphibians. Mol. Phylogenet. Evol. 9: 509-516.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17: 368-376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Felsenstein, J. 2004. Inferring Phylogenies. Sinauer Associates, Inc.; Sunderland, Massachusetts.
- Ford, L. S. y D. C. Cannatella. 1993. The major clades of frogs. Herpetol. Mongr. 7: 94-117.

- Formas, J. R. 1979. La Herpetofauna de los Bosques Temperados de Sudamérica. En: Duellman, W. D. (ed.). *The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution and Dispersal*. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas Monograph. 7: 341-369.
- Formas, J. R. 1991. The karyotypes of the Chilean frogs *Eupsophus emiliopugini* and *E. vertebralis*. Proc. Biol. Soc. Wash. 104: 7-11.
- Formas, J. R. 1995. Anfibios. En: Simonetti, J. A., M. T. K. Arroyo, A. E. Spotorno y E. Lozada (eds.). *Diversidad biológica de Chile*, pp. 314-325. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Santiago, Chile.
- Formas, J. R. y L. Brieva. 1992. Immunological relationships of the South American frog genus *Eupsophus* (Leptodactylidae). Biochem. Syst. Ecol. 20: 747-751.
- Formas, J. R. y N. D. Espinoza. 1975. Karyological relationships of frogs of the genus *Telmatobufo* (Anura: Leptodactylidae). Herpetologica 31: 429-432.
- Formas, J. R., J. J. Nuñez y L. Brieva. 2001. Osteología, taxonomía y relaciones filogenéticas de las ranas del género *Telmatobufo* (Leptodactylidae). Rev. Chil. Hist. Nat. 74: 365-387.
- Formas, J. R. y 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: 1101-1107.
- Frost, D. R. 2004. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 3.0 (22 August, 2004). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Gallardo, J. M. 1970. A propósito de los Telmatobiinae (Anura, Leptodactylidae) patagónicos. Neotropica 16: 73-85.
- Glaw, F. y J. Köhler. 1998. Amphibian species diversity exceeds that of mammals. Herpetol. Rev. 29: 11-12.
- Grandison, A. G. C. 1961. Chilean species of the genus *Eupsophus* (Anura, Leptodactylidae). Bull. British Mus. (Nat. Hist.), Zool. 9: 111-149.
- Graybeal, A. 1997. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. Zool. J. Linn. Soc. 119: 297-338.
- Haas, A. 2003. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia: Anura). Cladistics 19: 23-89.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Versión 5.0.9, 2001. Nucl. Acids Symp. Ser. 41: 95-98.

- Hay, J. M., I. Ruvinsky, S. B. Hedges y L. R. Maxson. 1995. Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. *Mol. Biol. Evol.* 12: 928-937.
- Hedges, S. B. y L. R. Maxson. 1993. A molecular perspective on lissamphibian phylogeny. *Herpetol. Mongr.* 7: 27-42.
- Hedges, S. B., K. D. Moberg y L. R. Maxson. 1990. Tetrapod phylogeny inferred from 18S and 28S ribosomal RNA sequences and a review of the evidence for amniote relationships. *Mol. Biol. Evol.* 7: 607-633.
- Hertwig, S., R. O. de Sá y A. Haas. 2004. Phylogenetic signal and the utility of 12S and 16S mtDNA in frog phylogeny. *J. Zool. Syst. Evol. Research* 42: 2-18.
- Heyer, W. R. 1975. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. *Smithsonian Contrib. Zool.* 199: 1-55.
- Hickson, R. E., C. Simon y S. W. Penny. 2000. The performance of several multiple-sequence alignment programs in relation to secondary-structure features for an rRNA sequence. *Mol. Biol. Evol.* 17: 530-539.
- Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (eds). 1996. *Molecular Systematics*. Second Edition. Sinauer Assoc., Massachusetts.
- Hoegg, S., M. Vences, H. Brinkmann y A. Meyer. 2004. Phylogeny and comparative substitution rates of frogs inferred from sequences of three nuclear genes. *Mol. Biol. Evol.* 21: 1188-1200.
- Huelsenbeck, J. P. y K. A. Crandall. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28: 437-466.
- Huelsenbeck, J. P. y F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Huelsenbeck, J. P., F. Ronquist, R. Nielsen y J. P. Bollback. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- Kitching, I. J., P. L. Forey, C. J. Humphries y D. M. Williams. 1998. *Cladistics: The theory and Practice of Parsimony Analysis*. Second Edition. Oxford University Press.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca y A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6196-6200.
- Laurent, R. F. 1986. Sous classe des lissamphibiens. *Systématique*. En: P.-P. Grassé y M. Delsol (eds.). *Traité de Zoologie*, Tome 14, 1B, pp. 594-797. Masson, Paris.
- Lavilla, E. O. y J. M. Cei. 2001. *Amphibians Of Argentina. A Second Update, 1987-2000*. *Mus. Reg. Sci. Nat. Torino. Monografie XXVIII*: 1-177.

- Lewis, P. O. 2001. Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *Trends Ecol. Evol.* 16: 30-37.
- Lynch, J. D. 1971. Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactyloid frogs. *Misc. Publ. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas* 53: 1-238.
- Lynch, J. D. 1973. The transition from archaic to advanced frogs. En: Vial, J. L. (ed.). *Evolutionary Biology of the Anurans*, pp. 133-182. Univ. Missouri Press, Columbia.
- Lynch, J. D. 1978. A re-assessment of the Telmatobiine leptodactylid frogs of Patagonia. *Occas. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas* 72: 1-57.
- Maddison, W. P., M. J. Donoghue y D. R. Maddison. 1984. Outgroup analysis and parsimony. *Syst. Zool.* 33: 83-103.
- Maxson, L. R. y W. R. Heyer. 1982. Leptodactylid frogs and the Brazilian Shield: and old and continuing adaptive relationship. *Biotropica* 14: 10-15.
- McCarthy, C. 1998. Chromas 1.45. School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australia.
- Meriggio, V., A. Veloso, S. Young y H. Núñez. 2004. *Atelognathus jeinimenensis* n. sp. de Leptodactylidae para el sur de Chile. *Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile* 53: 99-123.
- Mindell, D. P. y R. L. Honeycutt. 1990. Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic applications. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21: 541-566.
- Moore, W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial gene-trees versus nuclear gene-trees. *Evolution*, 49: 718-726.
- Moritz, C., T. E. Dowling y W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.
- Núñez, J. J. 2003. Taxonomía y sistemática de las ranas del género *Eupsophus* (Leptodactylidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Núñez, J. J. y J. R. Formas. 2000. Evolutionary history of the Chilean frog genus *Telmatobufo* (Leptodactylidae): an immunological approach. *Amphibia-Reptilia* 21: 351-356.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Page, R. D. M. y E. Holmes. 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science.

- Palumbi, S. R., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice y G. Grabowski. 1991. The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0. Privately published document compiled by S. Palumbi, Dept. Zoology, Univ. Hawaii, Honolulu, HI, 96822.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Reig, O. A. 1958. Propositiones para una nueva macrosistemática de los anuros. Nota preliminar. *Physis* 21: 109-118.
- Reig, O. A. 1960. Las relaciones genéricas del anuro chileno *Calyptocephalella gayi* (Dum. & Bibr.). *Actas Trab. Cong. Sudamer. Zool.* 4: 113-131.
- Richards, C. M. y W. S. Moore. 1996. A phylogeny for the African treefrog family Hyperoliidae based on mitochondrial rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5: 522-532.
- Roe, B. A., D.-P. Ma, R. K. Wilson y F.-H. Wong. 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* 260: 9759-9774.
- Ruvinsky, I. y L. Maxson. 1996. Phylogenetic relationships among bufonoids frogs (Anura: Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5: 533-547.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanderson, M. J. y H. B. Shaffer. 2002. Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 33: 49-72.
- Savage, J. M. 1973. The geographic distribution of frogs: patterns and predictions. En: Vial, J. L. (ed.). *Evolutionary Biology of the Anurans*, pp. 351-445. Univ. Missouri Press, Columbia.
- Schaeffer, B. 1949. Anurans from the early Tertiary of Patagonia. *Bull. Amer. Nat. Hist.* 93: 47-68.
- Swofford, D. L. 2002. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Vellard, J. 1957. Repartition des batracien dans les Andes au sud de l'Equateur. *Trav. Inst. Français Etud. Andines*, Lima 5: 141-161.
- Veloso, A. y J. Navarro. 1988. Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. *Boll. Mus. Reg. Sci. Nat. Torino* 6: 481-539.

Vences, M., J. Kosuch, S. Lötters, A. Widmer, K. Jungfer, J. Köhler y M. Veith. 2000. Phylogeny and classification of poison frogs (Amphibia: Dendrobatidae), based on mitochondrial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15: 34-40.

Vences, M., J. Kosuch, R. Boistel, C. F. B. Haddad, E. La Marca, S. Lötters y M. Veith. 2003. Convergent evolution of aposematic coloration in Neotropical poison frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Org. Divers. Evol.* 3: 215-226.

Vuilleumier, F. 1968. Origin of frogs of Patagonian forests. *Nature* 219: 87-89.

Wiens, J. J. 1993. Systematics of the Leptodactylid Frog Genus *Telmatobius* in the Andes of Northern Peru. *Occas. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas* 162: 1-76.

Wiley, E. O., D. Siegel-Causey, D. R. Brooks y V. A. Funk. 1991. *The Compleat Cladist: a Primer of Phylogenetic Procedures*. The University of Kansas, Museum of Natural History, Special Publication N° 19.

	5	15
1. <i>Alsodes barrioi</i> IZUA 3213	TAGCCGTA	AA C-TTTAAATT
2. <i>Alsodes monticola</i> DBGUCH 2919	TAGCCGTA	AA C--TTAAATT
3. <i>Alsodes nodosus</i> DBGUCH SN	CAGCCGTA	AA C-TTTAAATT
4. <i>Alsodes sp.</i> DBGUCH 3372	TAGCCGTA	AA C-TTTAAATT
5. <i>Alsodes tumultuosus</i> IZUA SN	TAGCCGTA	AA C-TTTAAATT
6. <i>Atelognathus jeininimensis</i> DBGUCH 3438	TCGCCGTA	AA C-TTTTAATT
7. <i>Batrachyla antartandica</i> DBGUCH 2961	TGGCCGTA	AA C-TTTTAATT
8. <i>Batrachyla leptopus</i> DBGUCH 2931	TCGCCGTA	AA C-TTTTAATT
9. <i>Batrachyla taeniata</i> DBGUCH 2943	TCGCCGTA	AA C-CTTTAATT
10. <i>Caudiverbera caudiverbera</i> DBGUCH 3028	CAGCCGTA	AA CCTTTAACT
11. <i>Eupsophus calcaratus</i> DBGUCH 2904	TAGTCGTA	AA C-TTTAAATT
12. <i>Eupsophus migueli</i> IZUA 3476	TAGTCGTA	AA C-TTTAAATT
13. <i>Eupsophus roseus</i> IZUA 3506	TAGTCGTA	AA C-TTTAAATT
14. <i>Eupsophus sp.</i> DBGUCH 3273	TAGTCGTA	AA C-TTTAAATT
15. <i>Eupsophus emiliopugini</i> DBGUCH 3342	TAGCCGTA	AA C-TTTAAATT
16. <i>Hylorina sylvatica</i> DBGUCH 3031	TTGCCGTA	AA C-TTTCATT
17. <i>Insuetophrynus acarpicus</i> DBGUCH 3125	CAGACATA	AA C-TTTAAACT
18. <i>Pleurodema marmorata</i> DBGUCH 2725	TAGCCGTA	AA C-TTTAATTT
19. <i>Pleurodema thaul</i> DBGUCH 2918	CAACCGTA	AA C-TTTAATTT
20. <i>Telmatobius marmoratus</i> DBGUCH 3384	TAACCGTA	AA C-TTTTATTT
21. <i>Telmatobius vilamensis</i> IZUA 3080	TAACCGTA	AA C-TTTTATTT
22. <i>Telmatobius zapahuirensis</i> DBGUCH 3382	TAACCGTA	AA C-TTTTATTT
23. <i>Telmatobufo bullocki</i> DBGUCH SN	TAGTCGTA	AA CCTTTAACT
24. <i>Telmatobufo venustus</i> IZUA 3054	TAGTCGTA	AA CCTTTAACT
25. <i>Ceratophrys cornuta</i>	CAGCCGTA	AA C-TTTAACTT
26. <i>Ceratophrys ornata</i>	CAGCCGTA	AA C-TTTAACTT
27. <i>Eleutherodactylus augusti</i>	TAGTCGTA	AA C-TTTAACTT
28. <i>Eleutherodactylus chloronotus</i>	TAGTTATA	AA C-TTTAAATT
29. <i>Eleutherodactylus duellmani</i>	TAGTCATA	AA C-TATAACTT
30. <i>Eleutherodactylus fitzingeri</i>	CACCCGTA	AA C-TATTATTT
31. <i>Eleutherodactylus mexicanus</i>	CAGCCGTA	AA C-TA--ATTT
32. <i>Eleutherodactylus supernatis</i>	TAGTCATA	AA CCTTTAAATT
33. <i>Eleutherodactylus thymelensis</i>	CAGTCATA	AA C-TCTAACTT
34. <i>Eleutherodactylus w-nigrum</i>	CAATTATA	AA C-TTTAACTT
35. <i>Lepidobatrachus sp.</i>	CAGCCGTA	AA C-TTTAATTT
36. <i>Leptodactylus pentadactylus</i>	TAGCCGTA	AA C-TTTTATTT
37. <i>Lithodytes lineatus</i>	TGACCGTA	AA A-CTTTATTT
38. <i>Phrynopus sp.</i>	TAGTCGTA	AA C-TTTAACTT
39. <i>Physalaemus nattereri</i>	TAACCGTA	AA C-TCTAACTT
40. <i>Physalaemus riograndensis</i>	TAACCGTA	AA C-CTTAATTT
41. <i>Telmatobius niger</i>	TAACCGTA	AA C-TTTTATTT
42. <i>Telmatobius vellardi</i>	TAACCGTA	AA C-TTTTATTT
43. <i>Heleophryne purcelli</i>	CAGCCGTA	AA CTTTACTATT
44. <i>Limnodynastes salmini</i>	CAGCCGTA	AA CCTTTAAATT
45. <i>Hylodes perpiciatus</i>	TGATCGTA	AA C-TTTTAACT
46. <i>Telmatobius simonsi</i>	TAACCGTA	AA C-TTTTATTT

ANEXO 1.- Alineamiento combinado de los genes 12S y 16S (837 sitios nucleotídicos en total) de 46 taxa de leptodactílidos y otras familias, utilizado en los análisis de máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana (Alineamiento B del texto). El alineamiento fue realizado con el programa ClustalX con un valor de 10 para el parámetro de alineamiento múltiple de apertura y 0,05 para el de extensión, y posteriormente chequeado visualmente y editado con el programa Bioedit. Las secuencias corresponden a 24 especies de anfibios chilenos obtenidas en este trabajo (1-24) y 22 obtenidas de GenBank (25-46). Las secuencias ya publicadas pertenecen a los trabajos de Darst y Cannatella (2004) (25-44) y Vences et al. (2003) (45 y 46). La clasificación de estas especies se basó en Frost (2004) y se indica en las Tablas 1 y 2 del texto. Las regiones encerradas en rectángulos fueron eliminadas para obtener el Alineamiento C, que fue utilizado sólo en los análisis de máxima parsimonia. Los "gaps" son indicados con el símbolo "-". Las secuencias corresponden a la hebra L del genoma mitocondrial, escritas en dirección 5' → 3'.

 25 35 45 55 65
1.	ACACCTACA-	TCGCCTGAGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
2.	ACACCCGCA-	TCGCCTGAGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
3.	ACACCTACA-	TCGCCTGAGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
4.	ACACCTACA-	TCGCCTGAGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
5.	ACACCCACA-	TCGCCTGAGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
6.	ACACCCACTA	TCGCCAGGGA	ACTACAAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
7.	ACACCCCAA-	TCGCCCAGGGA	ACTACAAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
8.	ACACCTCAA-	TCGCCCAGGGA	ACTACAAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
9.	ACACCTCAA-	TCGCCCAGGGA	ACTACAAGCC	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
10.	ACATACAAA	CCGCCAGGGA	ACTACAAGCC	CAAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
11.	ACAACCTCA-	TCGCCTGAGA	ACTACGAGCT	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
12.	ACAACCTCA-	TCGCCTGAGA	ACTACGAGCT	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
13.	ACAATTTCA-	TCGCCTGAGA	ACTACGAGCT	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
14.	ACAATTTCA-	TCGCCTGAGA	ACTACGAGCT	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
15.	ACAACCTCA-	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
16.	ACACCTCAA-	TCGCCCAGGGA	ACTACAAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
17.	ACACCATTA	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
18.	ACACCTACA-	TCGCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
19.	ACATCTATA-	TCGCCTGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
20.	ACTTCGTA-	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
21.	ACCTTCGTA-	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
22.	ACTTCGTA-	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
23.	ACCCACAAA	CCGCCAGGGA	ACTACAAGCC	CAAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
24.	ACCCACTAAA	CCGCCAGGGA	ACTACAAGCC	CAAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
25.	ACTTTGACA-	TCGCCTGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
26.	ACTTTAACA-	TCGCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
27.	ACACCCAAA-	TCGCCAGGGA	ACTACGAGCC	-ATGCTTAAA	ACCCAAAGGA
28.	ACACC-CAA-	TCGCCAGGAA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
29.	ACACCCGATC	TCGCCTGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
30.	ACATC-AAAC	CCGCCAGAGA	ACTACGAGCT	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
31.	ACAAC-CAA	CCGCCAGAGA	ACTACGAGCT	-TAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
32.	ACATC-CAA-	TCGCCAGGAA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
33.	ACACCCCA-	TCGCCTGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
34.	ACACCCACAT	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-ATGCTTAAA	ACCCAAAGGA
35.	ACTCCAACA-	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
36.	ACACCCACA-	TCGCCAGGGA	ACTACGAGCC	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
37.	ACAATATCTA	TCGCCAGGGA	ACTACGAGCT	-ATGCTTAAA	ACCCAAAGGA
38.	ACACCCACAA	-CGCCTGGGA	ACTACAAGCT	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
39.	ACATAACA-	TCGCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
40.	ACACCTAAA-	TCGCCTGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
41.	ACTTCGTA-	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
42.	ACTTCGTA-	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
43.	ACCCCCAC	TCGCCCAGGGA	ATTACGAGCT	CAAGCTTAAA	ACCCAAAGGA
44.	ACATTTAAAA	CCGCCAGGGA	ACTACGAGCC	CACCCTTAAA	ACCCAAAGGA
45.	ACACCTCCA-	TCGCCAGGGA	ACTACGAGCT	-AAGCTTAAA	ACTCAAAGGA
46.	ACCTTCGTA-	TCGCCCAGGGA	ACTACGAGCA	-AAGCTTAAA	ACCCAAAGGA

	75	85	95	105	115
1.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
2.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
3.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
4.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
5.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
6.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTT	TAATCGATAA
7.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
8.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
9.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTG	TAATCGATAA
10.	CTTGACGGTG	CCCCA-ATCC	ACCTAGAGGA	GCCTGTCCTT	TAATCGATGA
11.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CTCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATTGATAA
12.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATTGATAA
13.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATTGATAA
14.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATTGATAA
15.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATTGATAA
16.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
17.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
18.	CTTGACGGTA	CCCCAAATCC	ACCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
19.	CTTGACGGTA	CCCCAAATCC	ACCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
20.	CTTGACGGTA	CCCCAT-TCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
21.	CTTGACGGTA	CCCCAT-TCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
22.	CTTGACGGTA	CCCCAT-TCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
23.	CTTGACGGTG	CCCCA-ACCC	ACCTAGAGGA	GCCTGTCCTT	TAATCGATGA
24.	CTTGACGGTG	CCCCA-ACCC	ACCTAGAGGA	GCCTGTCCTT	TAATCGATGA
25.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
26.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
27.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	ACCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAACCGATGA
28.	CTTGACGGTG	CCCCATATCC	CTCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAACCGATAC
29.	CTTGACGGTG	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAACCGATAC
30.	CTTGTCGGTG	TCCCAC-CCC	CTCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	GAATCGATGA
31.	CTTGACGGTG	CCCCACATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TCATCGATGA
32.	CTTGACGGTG	CCCCATATCC	CTCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAACCGATAC
33.	CTTGACGGTA	CCCCACATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTG	TAACCGATAC
34.	CTTGACGGTG	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAC
35.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
36.	CTTGACGGTA	CCCCAAATCC	CTCTAGAGGA	GCCTGTCCTG	TAATCGATAA
37.	CTTGACGGTA	CCCCAAATCC	ACCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
38.	CTTGACGGTG	CTCCACATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
39.	CTTGACGGTA	CCCCAAATCC	ACCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
40.	CTTGACGGTA	CCCCACATCC	ACCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
41.	CTTGACGGTA	CCCCAT-TCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
42.	CTTGACGGTA	CCCCAT-TCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
43.	CTTGACGGTA	CCCCA-ATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTTCTT	TAATCGATGA
44.	CTTGACGGTG	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATGA
45.	CTTGACGGTA	CCCCATATCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA
46.	CTTGACGGTA	CCCCAT-TCC	CCCTAGAGGA	GCCTGTCCTA	TAATCGATAA

ANEXO 1.- Continuación.

	125	135	145	155	165
1.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGCC-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
2.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGCC-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
3.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGCT-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
4.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGCC-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
5.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGCC-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
6.	TCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTCTAGTAAT	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
7.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTT-T	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
8.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	CTTTAGTT-T	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
9.	TCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTT-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
10.	TCCACGCTAA	ACCTCACCAC	TCCTAGCC-C	ATCCGCCTGT	ATACCTCCGT
11.	TCCCCGTTTG	ACCTCACCAT	TTTTAGCT-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
12.	TCCCCGTTCA	ACCTTACCAT	TTTTAGCT-A	CTCAGCCTGT	ATACCTCCGT
13.	TCCCCGTTTA	ACCTTACCAT	TTTTAGCT-A	CTCAGCCTGT	ATACCTCCGT
14.	TCCCCGTTTA	ACCTTACCAT	TTTTAGCT-A	CTCAGCCTGT	ATACCTCCGT
15.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGCA-A	ATCAGTCTGT	ATACCTCCGT
16.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTA-C	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
17.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAC	TTCTAGCC-C	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
18.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGCC-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
19.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTCTAGCT-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
20.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTC-T	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
21.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTC-T	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
22.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTC-T	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
23.	TCCACGTTAA	ACCTCACCAC	TTCTGGCC-C	ATCCGCCTGT	ATACCTCCGT
24.	TCCACGTTAA	ACCTCACCAC	TTCTGGCC-C	ATCCGCCTGT	ATACCTCCGT
25.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTA-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
26.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTCTAGTT-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
27.	TCCCCGTTCA	ACCTCACCAC	TTCTAGCC-T	CTCAGCTTGT	ATACTTCCGT
28.	CCCCCGTTCA	ACCTCACCAC	CTCTAGTT-C	CTCAGCCTGC	ATACTTCCGT
29.	CCCACGTTCA	ACCTCACCAT	TTTTAGTT-A	ATCAGCCTGT	ATACTTCCGT
30.	TCCCCGTTAA	ACCTCACCAC	TTCTAGCC-T	ATCAGCCTGT	ATACTTCCGT
31.	CCCCCGCTAA	ACCTCACCAC	TCTTAGCT-T	TTCAGCCTGT	ATACTTCCGT
32.	CCCCCGTTCA	ACCTCACCAC	CCCTAGTC-T	TTCAGCCTGC	ATACTTCCGT
33.	CCCACGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTT--	CTCAGCCTGT	ATACTTCCGT
34.	TCCACGTTCT	ACCCACCAT	TTTTAGCC-T	ATCAGCTTGT	ATACTTCCGT
35.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTT-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
36.	CCCCCGCTTA	ACCTCACCAC	TTCTAGCA-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
37.	CCCCCGCTTA	ACCTCACCAT	TTTTTGAA-A	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
38.	TCCCCGCTAA	ACCTCACCAC	TTTTTGCC-T	CTCAGCCTGT	ATACTTCCGT
39.	CCCCCGCTTA	ACCTCACCAC	CCCTGGCT-A	TTCAGCCTGT	ATACCTCCGT
40.	CCCCCGCTTA	ACCTCACCAA	CTCTTGCT-A	TTCAGCCTGT	ATACCTCCGT
41.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTC-T	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
42.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTC-T	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT
43.	CCCCCGTTAA	ACCTCACCAC	TTCTAGCC-C	ATCCGCCTGT	ATACCTCCGT
44.	TCCACGTTAA	ACCTCACCAC	TTCTTGCC-T	ATCCGCCTGT	ATACCTCCGT
45.	TCCCCGTTAA	ACCTCACCAC	TTTTAGCT-T	CTCAGCCTGT	ATACCTCCGT
46.	CCCCCGTTTA	ACCTCACCAT	TTTTAGTT-T	ATCAGCCTGT	ATACCTCCGT

ANEXO 1.- Continuación.

	175	185	195	205	215
1.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACTCA	GTGAGCTTAA	TGCCCT--TTA
2.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACTCA	GTGAGCTTAA	TGCCCT--TTA
3.	CGCCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AATTTA	GTGAGCTTAA	TGCCCT--TTA
4.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACTTA	GTGAGCTTAA	TGCCCT--TTA
5.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACTCA	GTGAGCTTAA	TGCCCT--TTA
6.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACCTA	GTGAGCTTAA	TGCCA--ATA
7.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACCCA	GTGAGCTTAA	TGCCCT--ATA
8.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACTTA	GTGAGCTTAA	TGCC--ATA
9.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACTTA	GTGAGCCTAA	TGCCCT--ATA
10.	CGTCAGCTTA	CCGCATGAGC	GA----CTTA	GTGAGCTTAA	TGCCCAACC
11.	CGTCAGCTTA	CCTCGTGAGC	GA--AATTTA	GTGAGCTTAA	CGCAC--ATA
12.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACTCA	GTGAGCTTAA	TGCAT--ATA
13.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACTTA	GTGAGCTTAA	TGCAT--ATA
14.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AACTTA	GTGAGCTTAA	TGCAT--ATA
15.	CGTCAGCTTA	CCCCGTGAGC	GA--AACTTA	GTGAGCTTAA	TGCTA--TTA
16.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GC--AACTTA	GTGAGCTTAA	TGCCCT--ATA
17.	CGTAAGCTTA	CCCCGTGAGC	GA--TATTTA	GTGAGCCTAA	TGCC--GTA
18.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GC--ACACTA	GTGAGCTTAA	TGCC--CCA
19.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--ATATAA	GTGAGCTTAA	TGCCCT--CTA
20.	CGTCAGCTTA	CCTCGTGAGC	GA--ATCTTA	GTGAGCTTAA	TGCC--TTA
21.	CGTCAGCTTA	CCTCGTGAGC	GA--ATCTTA	GTGAGCTTAA	TGCC--TTA
22.	CGTCAGCTTA	CCTCGTGAGC	GA--ATCTTA	GTGAGCTTAA	TGCC--TTA
23.	CGTCAGCTTA	CCGCGTGAGC	GA----TTTA	GTGAGCCTAA	TGCCAAACC
24.	CGTCAGCTTA	CCGCGTGAGC	GA----TTTA	GTGAGCCTAA	TGCCAAACC
25.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--TACTTA	GTGAGCTTAA	TGCCA--TTA
26.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GC--CACTTA	GTGAGCTTAA	TGTCC--CTA
27.	CGTCAGCTTA	CCTCGTGAGC	GC--CATTTA	GTGAGCCCTT	AGCTTA--GTC
28.	CGTCAGCTTA	CCGCGTGAGC	GA--AACTCA	GTAAGCCCAA	TGTTT--ACT
29.	CGCCAGCTTA	CCGCGTGAGC	G---TTACAA	GTAAGCTTAA	TGTCC--CTC
30.	CGCTAGCCCA	CCACGTGAGC	GC--TACCCA	GTCGGCTCTA	CGCCTA--TA
31.	CGCAAGCCCA	CCGCGTGAGT	GA--AACTCA	GTCGGCCCAA	CTACTAATTC
32.	CGTCAGCTTA	CCGCGTGAGC	GA--AACTTA	GTAAGCTCAA	TGTTT--ATT
33.	CGCCAGCTTA	CCGCGTGAGC	G---CTTCAA	GTAAGCTTAA	TGTCC----C
34.	CAACAGCTTA	CCGTGTGAAC	G-----TAAA	GTAAGCCCAA	TGTTT--ATT
35.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--TATTTA	GTGAGCTTAA	TGCC--CTA
36.	CGTCAGCTTA	CCTCGTGAGC	GC--CTTTAA	GTGAGCCCAA	TGCCA--ATA
37.	CGTCAGCTTA	CCATGTGAAC	GT--CTTATA	GTGAGCTTAA	CGCTT--ATT
38.	CGTCAGCTCA	CCCCATCAGG	GA--CACTCA	GTGAGCTCAA	TGTCT--GTA
39.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--ATATTA	GTGAGCTTAA	TGCC--TTA
40.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--ATATTA	GTGAGCTTAA	TGTC---TTA
41.	CGTCAGCTTA	CCTCGTGAGC	GA--ATCTTA	GTGAGCTTAA	TGCC--TTA
42.	CGTCAGCTTA	CCTCGTGAGC	GA--ATCTTA	GTGAGCTTAA	TGCC--TTA
43.	CGCCAGCCCA	CCGCCTGAGC	GCATAAGAAA	GTGGGCCTAA	AGGGGCCAT-
44.	CGTCAGCTCA	CCGCATGAGC	GA--TTTATA	GTGAGCAAAA	AGGCC--ATT
45.	CGTCAGCTTA	CCACGTGAGC	GA--AATTTA	GTGAGCTTAA	TGTCC--ACA
46.	CGTCAGCTTA	CCTCGTGAGC	GA--ATCTTA	GTGAGCTTAA	TGCC--TTA

ANEXO 1.- Continuación.

 225 235 245 255 265
1.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGAA	AGAGATGGGC
2.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
3.	CACCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGAA	AGAGATGGGC
4.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGAA	AGAGATGGGC
5.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGAA	AGAGATGGGC
6.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGAGC
7.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
8.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
9.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
10.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGTGTGGGC
11.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
12.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGAA	AGAGATGGGC
13.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGAA	AGAGATGGGC
14.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGAA	AGAGATGGGC
15.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGAA	AGAGATGGGC
16.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
17.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGTAGTGGAA	AGAGATGGGC
18.	CGCCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
19.	CACCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGTAATGGGA	AGAGATGGGC
20.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
21.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
22.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
23.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGTGTGGGC
24.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGTGTGGGC
25.	CGCCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
26.	CACCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGTAATGGGA	AGAGATGGGC
27.	CGCTCATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCACA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
28.	CACCAAAACG	TCAGGTCAAA	GTGCAGCATA	TGAAATGGGA	AGTGTGGGC
29.	CACCAACACG	TCAGGTCAAA	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
30.	CGCAACAACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
31.	AGCACAACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCATA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
32.	CACCAAAACG	TCAGGTCAAA	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGCGATGGGC
33.	CACCAACACG	TCAGGTCAAA	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
34.	CATCAATACG	TCAGGTCAAA	GTGCAGCTTA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
35.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
36.	CGCCAATACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCTAA	TGAAATGGGA	AGAGATCGGC
37.	CACCAAGTACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCTAA	TGAAATGGAC	AGAGATGGGC
38.	CATCAATACG	TCAGGTCTAA	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
39.	CACCAAAACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCACA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
40.	CACCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCACA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
41.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
42.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
43.	CCCCCTCACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCATA	TGAAATGGGA	AGAAATGGGC
44.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCACA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
45.	CGCCCCTACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGTAAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC
46.	CGCCAACACG	TCAGGTCAAG	GTGCAGCAA	TGAAATGGGA	AGAGATGGGC

ANEXO 1.- Continuación.

 275 285 295 305 315
1.	TACACTTTCT	AAT-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACT--TTAT	GAAAG-ATAG
2.	TACACTTTCT	AAC-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACT--TTAT	GAAAT-CTAG
3.	TACACTTTCT	AAT-GTAGAA	AA-CACGAAA	GACT--TTAT	GAAAC-CTAG
4.	TACACTTTCT	AAT-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACT--TTAT	GAAAT-CTAG
5.	TACACTTTCT	AGT-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACT--TTAT	GAAAT-CTAG
6.	TACACTTTCT	AAT-ATAGAA	AATTACGAAA	GACTACCTAT	GAAAC-CTAG
7.	TACACTTTCT	AAT-GTAGAA	AA-TACGAAA	AACTATTTAT	GAAAC-CTAG
8.	TACACTTTCT	AGT-ATAGAA	AA-TACGAAA	GACTACCTAT	GAAAC-CTAG
9.	TACACTTTCT	AGT-ATAGAA	AA-TACGAAA	GACTACCTAT	GAAAC-CTAG
10.	TACATTTTCT	AAT-ATAGAA	CA-CACGAAA	GACA-AATAT	GGAAC-CTTG
11.	TACTACTCTCT	AAC-TTAGAA	CA-CACGAAA	AACTATTTAT	GAAAT-CTAG
12.	TACTACTCTCT	AAT-TTAGAA	CA-CACGAAA	AACTATTTAT	GAAAT-CTAG
13.	TACTACTCTCT	AAC-TTAGAG	AA-TACGAAA	AACTATTTAT	GAAAT-CTAG
14.	TACTACTCTCT	AAT-CTAGAG	AA-CACGAAA	AACTATTTAT	GAAAT-CTAG
15.	TACACTTTCT	AAC-ATAGAA	TA-CACGAAA	GACTATTTAT	GAAAC-CTAG
16.	TACACTTTCT	AGT-ATAGAA	TA-CACGAAA	GACTACCTAT	GAAAC-CTAG
17.	TACACTTTCT	AAT-ATAGAA	AAATACGAAA	GACTACCAAT	GAAAG-TCAG
18.	TACTACTCTCT	AAC-CTAGAG	AA-TACGAAA	AGCTACATAT	GAAAA-CTAG
19.	TACTACTCTCT	AAT-ATAGAG	AA-TACGAAA	GGCTACATAT	GAAAA-CTAG
20.	TACACTTTCT	AAT-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACTATTTAT	GAAAC-CTAG
21.	TACACTTTCT	AAT-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACTATTTAT	GAAAC-CTAG
22.	TACACTTTCT	AAT-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACTATTTAT	GAAAC-CTAG
23.	TACATTTTCT	ATT-ATAGAA	TA-TACGAAA	GATA-AACAT	GAAAC-TTTA
24.	TACATTTTCT	ATT-ATAGAA	TA-TACGAAA	GACA-AATAT	GAAAC-TTTG
25.	TACACTTTCT	AAA-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACTACTTAT	GAAAT-CTAG
26.	TACTACTCTCT	ATT-TTAGAG	GA-CACGAAA	GACTACTTAT	GAAAC-CTAG
27.	TACATTCTCT	AAC-TTAGAG	TA-CACAAAT	GACT--GCAT	GAAAC-CCAG
28.	TACTACTCTCT	TAT-GTAGAA	AA-CACGAAA	AAC--TATGT	GAAATCATAG
29.	TACACTTTCT	AGC-ATAGAA	AA-TACGAAA	GAC--TATAT	GAAAT-CCGG
30.	TACATTCTCT	AAC-TTAGAG	CA-TACGAAA	GGCCA-CTAT	GAAAC-CTGG
31.	TACATTCTCT	AAC-ATAGAG	TA-CACAGAG	AACTA-GTAT	GAAAC-CTAG
32.	TACTACTCTCT	TCT-GTAGAA	AA-CACGAAA	AAC--TATGT	GAAATCGTAG
33.	TACACTTTCT	ATA-ATAGAA	AA-TACGAAA	GAC--TACAT	GAAACATCAA
34.	TACACTTTCT	ATT-TTAGAA	GA-TACGAAA	G--TT-TATGT	GAAACCTTAC
35.	TACACTTTCT	AAT-TTAGAA	AA-TACGAAA	GACTACCTAT	GAAAT-CTAG
36.	TACTACTCTCT	ATTTATAGAA	AA-AACGAAA	GACCACTTAT	GAAAC-CTGG
37.	TACACTTTCT	AAC-ATAGAA	TA-TACGAAA	GATTACTTAT	GAAAC-CTAA
38.	TACTACTCTCT	AAA-CTAGAA	AA-AACAAAA	ACTC-TGAAT	GAAACCCAGA
39.	TACATTTTCT	AAT-TTAGAA	AA-TACGAAA	GACTACCTAT	GAAAC-CTAG
40.	TACTACTCTCT	AAT-TTAGAA	GA-TACGAAA	GACTACCTAT	GAAAT-CTAG
41.	TACACTTTCT	AAT-GTAGAA	AA-CACGAAA	GACT--TTAT	GAAAC-CTAG
42.	TACACTTTCT	AAT-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACTATTTAT	GAAAC-CTAG
43.	TACTACTCTCT	AAC-CTAGAA	AA-TACAAAA	GACTACCC-T	GAAACACCAG
44.	TACATTTTCT	AACTCTAGAA	AA-AACGAAA	GACC--TAGT	GAAAC-CCTG
45.	TACACTTTCT	AGT-ATAGAA	AA-TACGAAA	GACCACATAT	GAAAA-CTGG
46.	TACACTTTCT	AAT-ATAGAA	AA-CACGAAA	GACTATTTAT	GAAAC-CTAG

ANEXO 1.- Continuación.

	12S <	> 16S
	325	335	345	355			365
1.	TCG-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
2.	TCG-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
3.	TCT-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAGAGGA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
4.	TCG-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
5.	TCG-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAAGAA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
6.	TCG-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACCAAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
7.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
8.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACCAAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
9.	TCG-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACCAAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
10.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGAA	GTAAAAAGAG	ACAAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
11.	TTG-AAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
12.	TTG-TAAGGT	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
13.	TTG-AAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
14.	TTG-AAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
15.	TCG-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ATCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
16.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ATTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
17.	TCT-AAAGGT	GGATTTAGTA	GTAAAAAGAA	ACTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
18.	CCA-GAAGGC	GGATTTAGAA	GTAAAAAGAA	ACAAT		TTCAA	CGGCCGCGGT
19.	CCG-GAAGGC	GGATTTAGAA	GTAAAAAGAA	ACAAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
20.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
21.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
22.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
23.	TCA-GAAGGT	GGATTTAGAA	GTAAAAAGAA	ACAAG		TTTAA	CGGCCGCGGT
24.	TCG-GAAGGT	GGATTTAGAA	GTAAAAAGAA	ACAAG		TTTAA	CGGCCGCGGT
25.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACCAAG		TTTAA	CGGCCGCGGT
26.	TCA-GAAGGA	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACCAAG		TTTAA	CGGCCGCGGT
27.	TCG-GAAGGC	GGATTTAGAA	GTAAAAAGAA	AATAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
28.	TTT-AAAGGC	GGATTTAGTA	GTAAGGGGAA	AACAG		TTTAA	CGGCCGCGGT
29.	TCA-GAAGGT	GGATTTAGTA	GTAAGAAGAA	CATAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
30.	CCA-GAAGGC	GGATTTAGAA	GTAAAGATGG	AATAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
31.	TTACAAAGGT	GGATTTAGTA	GTAAAGTAGG	AATAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
32.	TTA-AAAGGC	GGATTTAGTA	GTAAGGGGAA	AACAG		TTTAA	CGGCCGCGGT
33.	CCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAGCAGAA	AATAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
34.	CCT-GAAGGC	GGATTTAGTA	GTAAAAAGAA	AATAG		TTTAA	CGGCCGCGGT
35.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
36.	TCA-GAAGGA	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAG	AACAT		TTCAA	CGGCCGCGGT
37.	TCT-GAAGGC	GGATTTAGAA	GTAAAAAGAA	ACCAAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
38.	GAA-TAAGGT	GGATTTAGTA	GTAAAAAGAA	AACAT		TTCAA	CGGCCGCGGT
39.	TCT-GAAGGC	GGATTTAGAA	GTAAAAAGAA	ACAAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
40.	TCT-AAAGGC	GGATTTAGAA	GTAAAAAGAA	ACAAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
41.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
42.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
43.	TCT-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	AAAAG		TTTAA	CGGCCGCGGT
44.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAGAAAG	ACCAA		TTCAA	CGGCCGCGGT
45.	TCA-AAAGGC	GGATTTAGTA	GTAAGAAA	AGCAG		TTCAA	CGGCCGCGGT
46.	TCA-GAAGGC	GGATTTAGCA	GTAAAAAGAA	ACTAG		TTCAA	CGGCCGCGGT

ANEXO 1.- Continuación. La línea vertical marca la separación de los segmentos de los genes 12S y 16S.

 375 385 395 405 415
1.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
2.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
3.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
4.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
5.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
6.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
7.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
8.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
9.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
10.	ATCCTGACCG	TGCAAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
11.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
12.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
13.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAT	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
14.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAT	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
15.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
16.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
17.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGGCT
18.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
19.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
20.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
21.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
22.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
23.	ATTCTGACCG	TGCAAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
24.	ATTCTGACCG	TGCAAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
25.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
26.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
27.	ATACTAACCG	TGCAAAGGTA	GCACAATCAC	TTGTCCCTTA	AATGGGGACC
28.	ATCCTAACCG	TGCAAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTTCTTA	AATAAAGACT
29.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTCTTCTA	AATAGAGACT
30.	ATACTAACCG	TGCAAAGGTA	GCGCAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAGGGACT
31.	ATACTAACCG	CGCAAAGGTA	GCGCAATCAC	TTGTCTCTTA	AATAGAGACT
32.	ATCCTAACCG	TGCAAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTTCTTA	AATAAAGACT
33.	ATCCTAACCG	TGCAAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTCTTCTA	AATAAAGACC
34.	ACCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTCTTATA	AATGAGGACT
35.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
36.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
37.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
38.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTCTTTTA	AATAAAGACT
39.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
40.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
41.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
42.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT
43.	ATCCTGACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTCTA	AATAAGGACT
44.	ATTCTGACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
45.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATAAGGACT
46.	ATCCTAACCG	TGCGAAGGTA	GCGTAATCAC	TTGTTCTTTA	AATGAGGACT

ANEXO 1.- Continuación.

	425	435	445	455	465
1.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CCAATCAGTG
2.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CCAATCAGTG
3.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CCAATCAGTG
4.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CCAATCAGTG
5.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CCAATCGGTG
6.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAATG
7.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
8.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
9.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
10.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTTCACTG	TCTCCCCCCC	CTAATCAATG
11.	AGTATGAACG	GCACCACGAA	GGTTACACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
12.	AGTATGAACG	GCACCACGAA	GGTTACACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
13.	AGTATGAACG	GCACCACGAA	GGTTACACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
14.	AGTATGAACG	GCACCACGAA	GGTTACACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
15.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTGCACTG	TCTCCTTTCT	CTAATCAGTG
16.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CAAATCAGTG
17.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
18.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTCC	CTAATCAGTG
19.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTTC	CCAATCAGTG
20.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTGATCAGTG
21.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTGATCAGTG
22.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTGATCAGTG
23.	AGTATGAATG	GCCCCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCCCCCC	CTAATCAATG
24.	AGTATGAATG	GCCCCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCCCCCC	CTAATCAATG
25.	AGTATGAATG	GCATCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCCTTTT	CTAATCAGTG
26.	AGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCTTTCT	CTAATCAGTG
27.	TGTATGAAAG	GCATCACGAG	GATTAGACTG	TCTCCTCCCC	CCAATCAGTG
28.	AGTATGAAAG	GCACCACGAG	GGCTAAACTG	TCTCCTTTTT	TTAATCAGTG
29.	AGTATGAAAG	GCATCACGAG	GACTAAACTG	TCTCCTTTCC	CTAATCAGTG
30.	AGTATGAACG	GCACCACGAG	GATTTAACTG	TCTCCCCCCT	CCAATCTGTG
31.	TGTATGAATG	GCATTACGAG	GACTTAACTG	TCTCCCCTTC	TTAATCAGTG
32.	AGTATGAAAG	GCACCACGAG	GACTAAACTG	TCTCCTTTTT	TTAATCAGTG
33.	AGTATGAAAG	GCATCACGAG	GACTAAACTG	TCTCCTCTCC	CTAATCAGTG
34.	AGTATGAAAG	GCTTCACGAG	GGTTAAACTG	TCTCCTTTCT	CTAATCAGTA
35.	AGTATGAACG	GCATCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
36.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTCTCT	CTAATCAGTG
37.	AGTATGAAAG	GCACCACGAG	GGTTGCACTG	TCTCCTTTCT	CTAATCAGTG
38.	AGTATGAAAG	GCATCACGAA	GGTCTAACTG	TCTCCTTTTT	CCAATCAATG
39.	AGTATGAATG	GCATCACGAG	GGTTAAGCTG	TCTCCCCTCT	CTAATCAGTG
40.	AGTATGAATG	GCATCACGAG	GGTTATACTG	TCTCCCCTTT	CTAATCAGTG
41.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTGATCAGTG
42.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CCGATCAGTG
43.	AGTATGAACG	GCACCACGAG	GGCCACACTG	TCTCCCTCCC	CCTATCAGTG
44.	TGTATGAATG	GCACCACGAG	GGTTATGCTG	TCTCCCTTTT	CTAATCAGTT
45.	AGTATGAATG	GCATCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTAATCAGTG
46.	AGTATGAATG	GCACCACGAA	GGTTATACTG	TCTCCTTTTT	CTGATCAGTG

ANEXO 1.- Continuación.

 475 485 495 505 515
1.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TAATTTATAA	GACGAGAAGA
2.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TAATTTATAA	GACGAGAAGA
3.	AAACTAATCT	CCTCGTGAAG	AAGCGAGGAT	AAATTTATAA	GACGAGAAGA
4.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TAATTTATAA	GACGAGAAGA
5.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TAATTTATAA	GACGAGAAGA
6.	AAACTAATCT	TCCCGTGCAG	AAGCGGGGAT	TTTTCTATAA	GACGAGAAGA
7.	AAACTGATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	TTATTTATAA	GACGAGAAGA
8.	AAACTGATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TTTTATATAA	GACGAGAAGA
9.	AAACTGATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	TTATTTATAA	GACGAGAAGA
10.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	AATAGTATAA	GACGAGAAGA
11.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TAGCCTATAA	GACGAGAAGA
12.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	TAGTCTATAA	GACGAGAAGA
13.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TAGTCTATAA	GACGAGAAGA
14.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TAGTCTATAA	GACGAGAAGA
15.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	TAATCTATAA	GACGAGAAGA
16.	AAACTAATCT	TCCCGTGAAG	AAACGGGAAT	TTATATATAA	GACGAGAAGA
17.	AAACTAATTT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	TTATTTATAA	GACGAGAAGA
18.	AAACTAATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TTACTTATAA	GACGAGAAGA
19.	AAACTAATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	ACTTTTATAA	GACGAGAAGA
20.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCTGGGAT	TTTTATATAA	GACGAGAAGA
21.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCTGGGAT	TTTTTTATAA	GACGAGAAGA
22.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCTGGGAT	TTTTATATAA	GACGAGAAGA
23.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	AATACTATAA	GACGAGAAGA
24.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	GACCCTATAA	GACGAGAAGA
25.	AAACTAATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	AAAGCTATAA	GACGAGAAGA
26.	AAACTAATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	AAAATTATAA	GACGAGAAGA
27.	AAACTAATCT	CCCTGTGAAA	AAGCAGGCAT	AACCCTATAA	GACGAGAAGA
28.	AATCTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TTTTATATAA	GACGAGAAGA
29.	AACCTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TTTTATATAA	GACGAGAAGA
30.	AAACTAATCC	CCCTGTGAAA	AAGCAGGGAT	AAAAATATAA	GACGAGAAGA
31.	AAACTAATCT	CCCTGTGAAA	AAGCAGGGGT	GAAACTACAA	GACGAGAAGA
32.	AATCTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TCTTATATAA	GACGAGAAGA
33.	AACCTAATAA	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	TTTTATATAA	GACGAGAAGA
34.	AACCTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	AACTTTATAA	GACGAGAAGA
35.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	ATAAATATAA	GACGAGAAGA
36.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGGT	AATTATATAA	GACGAGAAGA
37.	AAACTAATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	AAAAATATAA	GACGAGAAGA
38.	AAACTAATCT	CCTCGTGAAG	AAGCGAGGAT	AGACCTATTA	GACGAGAAGA
39.	AAACTGATCT	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	ATTTTTATAA	GACGAGAAGA
40.	AAACTAATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	AATTATATAA	GACGAGAAGA
41.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCTGGGAT	TTTTATATAA	GACGAGAAGA
42.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCTGGGAT	TTTTATATAA	GACGAGAAGA
43.	AAACTGATCC	CCCCGTGAAG	AAGCGGGGAT	CTAAATATAA	GACGAGAAGA
44.	AACCTAATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	ATCACTATAA	GACGAGAAGA
45.	AAACTAATCT	TCCCGTGAAG	AAGCGGGAAT	TACTTTATAA	GACGAGAAGA
46.	AAACTAATCT	CCCCGTGAAG	AAGCTGGGAT	TTTTATATAA	GACGAGAAGA

	525	535	545	555	565
1.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	G-ATAACAAT	TGCTAATTAA	T-ATAC TTAT
2.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	G-ATAACAAT	TGCTAATTAA	T-ATAC TTAT
3.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	A-ATAACAAT	TGCTAACCCA	C-TTTAC CCT
4.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	G-ATAACAAT	TGCTAATTAA	T-ATAC TTAT
5.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	G-ATAACAAT	TGCTAATTAA	T-TTAC TTAT
6.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	A-ATAACAAT	TGCTAACATA	A-CTAC TAAT
7.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	A-ATAACAAT	TGCTATACCC	A-TTAATAAT
8.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	C-ATAACAAT	TGCTATATTT	A-TTAATAAT
9.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	A-ATAACAAT	TGCTATACCC	A-TTAATAAT
10.	CCCCATGGAG	CTTTAAACAA	T-ATAGCACA	TGTTA-----	-----ACAAA-
11.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	G-ATAACAAC	TGCTAATCC-	A-CATTTATT
12.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	G-ATAACAAT	TGCTTCCCC	A-CATTTATT
13.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	G-ATAACAAT	TGCTTGCCC-	A-CATTTATT
14.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	G-ATAACAAT	TGCTTGCCC-	A-CATTTATT
15.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	G-ATAACAAT	TGCTAACTT-	A-TATTTAAT
16.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	A-ATAACAAT	TGCTATAATT	A-TTAATAAT
17.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAT	TTATAACAAT	TGCTAATTAA	ACTTTAAAAT
18.	CCCTATGGAG	CTTTAAACTA	A-GCAACAAT	TGCTACTATT	T--TTTAACT
19.	CCCTATGGAG	CTTTAAACTA	C-GCAACAAC	TGCTTCCACC	T-CCTTAACC
20.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAG	A-AAAACAAT	TGCTACCACA	A-TTATTAAT
21.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAG	A-AAAACAAT	TGCTACCACA	A-TTATTAAT
22.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAG	A-AAAACAAT	TGCTACCACA	A-TTATTAAT
23.	CCCCATGGAG	CTTTAAACAA	T-ATAGCACA	TGTTA-----	-----ACCC
24.	CCCCATGGAG	CTTTAAACAA	C-ATAGCACA	TGTTA-----	-----ACACCC
25.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	A-ATAACAAT	TGCTACTATC	A-TTATCTAT
26.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	A-ATAACAAT	TGCTTCTTTA	T-TGCTAAAT
27.	CCCTATGGAG	CTTCAAACAA	T-ATAACAAC	TGCCCTATCT	TCCTCC---T
28.	CCCCATGGAG	CTTAAAACAT	C-ATAACACC	TGCCACCCCA	TCCTCCCTGC
29.	CCCTATGGAG	CTTAAAACAT	C-ACA-CATT	TGCCACTTTA	TCTTATCTAC
30.	CCCCATGGAA	CTTTAAACAA	--ATAATACA	TGCTTCTTTA	CCATTA AATC
31.	CCCTATGGAG	CTTTAAATAA	T-GTAACACC	TGCCTCC---	-----C
32.	CCCCATGGAG	CTTAAAACAT	C-ATAACACC	TGCCACTA-A	TCCCTCCTGC
33.	CCCTATGGAG	CTTAAAACAT	C-ATAACACC	TGCCACACCA	-CTTACTTAC
34.	CCCCATGGAG	CTTTAAACAC	C-ATAACACA	TGCCACATCT	ATCATCT--C
35.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAA	A-ATAACAAT	TGCTATTATT	C-TTATTAAT
36.	CCCTATGGAG	CTTTAAACTA	A-GAATCAAC	TGCTTATTCC	CCTACA-AAT
37.	CCCTATGGAG	CTTTAAACTA	A-ATAATAAT	AGCCTACTCA	TTTACACAAC
38.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAC	A-GTAATTCA	TGCTTTCAAT	TTTCCC---T
39.	CCCTATGGAG	CTTTAAACCG	C-GTAACAAC	TGCTTTCCCA	C-CTTATACT
40.	CCCTATGGAG	CTTTAAACTT	A-GCTACAAT	TGTTCTTTCT	A-TTTTITAC-
41.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAG	A-AAAACAAT	TGCTACTACA	A-TTATTAAT
42.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAG	A-AAAACAAT	TGCTACTACA	A-TTATTAAT
43.	CCCCTTGGAG	CTTCAAACAA	C-ATGGCACC	TGCTTAACAA	--ACCTACTC
44.	CCCCATGGAG	CTTTAGACGA	--ACAGCACT	TGCTA-----	---GCTACTT
45.	CCCTATGGAG	CTTTAAACTA	A--TAACACT	TGCTATTATA	C--CTTCACA
46.	CCCTATGGAG	CTTTAAACAG	A-AAAACAAT	TGCTACCACA	T-TTACTAAT

	575	585	595	605	615
1.	TTCAGAAAAC	TAGACTTC--	-ACCTTAGCA	CTC-TGATTA	TCAGTTTTAG
2.	TTCAGAAAAC	TAAACTTC--	-ACCTTAGCA	CTC-TGATTA	TCAGTTTTAG
3.	TCCAGAAAGCC	TAAACTTT--	-ACCTTAGCA	CTC-TGATTA	TCAGTTTTAG
4.	TTCAGAAAAC	TAGACTTC--	-ACCTTAGCA	CTC-TGATTA	TCAGTTTTAG
5.	TTCAGAAAAC	TAGACTTC--	-ACCTTAGCA	CTC-TGATTA	TCAGTTTTAG
6.	TTCAGAAAAC	TAAACGT--	-ACCTTAGCA	CCA-TGATTA	TTAGTTTTAG
7.	TTCAGAAAAC	TAAACTC--	-ATTCTAGCA	CCA-TGATTA	TTAGTTTTAG
8.	TCCAGAAAGAC	TAAATAT--	-ACCTTAGCA	TTA-TGATTA	TTAGTTTTAG
9.	TTCAGAAAAC	TAAACTC--	-ATTCTAGCA	CCA-TGATTA	TTAGTTTTAG
10.	----AAACCC	CCCCA----	-GTTCAACAT	TAC-TGACTA	TTAGTTTTCG
11.	TTTCGAAACC	TAAACTTTC-	-ATCTTAGCA	TCC-TGATTA	TCAGTTTTAG
12.	TTCAGAAAAT	CAAATTTTC-	-ATCTTAGCA	TTC-TGATTA	TCAGTTTTAG
13.	TTCAGAAAAC	CAAATCTTT-	-ATCTTAGCA	TTC-TGATTA	TCAGTTTTAG
14.	TTCAGAAAAC	CAAATCTTT-	-ATCTTAGCA	TTC-TGATTA	TCAGTTTTAG
15.	TTCAGAAAAC	TAAATTTCTG	CATTTTGGCA	TTC-TGATTA	TCAGTTTTAG
16.	TTCAGAAAAC	TAAATTT--	-ATCTTAGCA	CTA-TGATTA	TTAGTTTTAG
17.	TTCAGAAATA	TTACAATT--	-ATCCTAGCA	CTA-TGATTA	TGAGTTTTAG
18.	TCCAGAAATGA	TAATTTAT--	-ATTTTAACA	CTA-TGTGTG	CTAGTTTTCG
19.	TCCAGAGTAA	TAAATTTT--	-ATTTTAGCA	TTA-TGTATG	CTAGTTTTCG
20.	TTCAGAAAAC	TAAACTTT--	-ATCCTAGCA	TTA-TGATTT	TCAGTTTTAG
21.	TTCAGAAAAC	TAAACTTT--	-ATCCTAGCA	TTA-TGATTT	TCAGTTTTAG
22.	TTCAGAAAAC	TAAACTTT--	-ATCCTAGCA	TTA-TGATTT	TCAGTTTTAG
23.	CCCC---CC	CCCCA----	-GTTTAACAT	CC--TGTCTA	TTAGTTTTCG
24.	CCCCACACTC	CCCCA----	-GTCTAACAT	TCCCTGTCTA	TTAGTTTTCG
25.	TTCAGAAATT	TAAATTTT--	-ATCTTAGCA	TTA-TGATTA	TTAGTTTTAG
26.	TCCAGAAATT	TAAACATT--	-ATTAGAGCA	CTG-TGATTA	TTAGTTTTAG
27.	TTCAGAAAGAG	CCACC-----	-TACAGCGCA	TAT-TGATTA	TAAGTTTTTG
28.	CCCGGCAC--	TTCTTTTT--	---CCAGGCA	CGC-TGATTA	TATGTTTTTG
29.	CCAGGTA---	TTCTTCCC--	---CCCGGCA	CAC-TGATTA	TATGTTTTTG
30.	TCCTGAAAAC	TAAAAACT--	-TATAA-GCA	TGC-TAATTA	AGAGTTTTCG
31.	TTCAAAATAT	TAACT-----	-TACAGCAC-	TAT--GATTA	CAAATTTTAG
32.	CCCGGCAG--	TTCTTTCC--	---ATGGACA	CAC-TGATTA	TATGTTTTTG
33.	CCCGGTT---	CTCTCCCC--	---CGTGACA	CCC-TGATTA	TATGTTTTTG
34.	CCCGGCA---	CTCACACT--	---CGTGACA	TTC-TGTTTA	AATGTTTTTG
35.	TTCAGAAATT	TAAACACT--	-ATCCTAGCA	TTA-TGATTA	TTAGTTTTAG
36.	TTCAGAAAAC	TAACTTTT--	-ACCAAAGCA	CTC-TGATTT	CTAGTTTTAG
37.	TCCAGATGAA	TA--CTTT--	-ACCCTGGCT	CGA-TAATTA	TTAGTTTTTG
38.	TCCAGAACAC	T---CTCC--	-CTCACAGCA	TAC-CAATTA	TAAGTTTTAG
39.	TCCAGGATAA	TAAACTAT--	-ATCTTAGCA	TAA-TGTTAA	CCGGTTTTCG
40.	TCCAGAGCAA	TAAATTTT--	-ATTTTAACA	TTT-TGATTG	CTAGTTTTCG
41.	TTCAGAAAAC	TAAACTTT--	-ATTCTAGCA	TTA-TGATTT	TCAGTTTTAG
42.	TTCAGGAAAC	TAAATTTT--	-ATTCTAGCA	TTA-TGATTT	TCAGTTTTAG
43.	CACAGAACTA	-CCACACT--	-AAACAAGCA	CGCATGACCA	CTAGTTTTTG
44.	TTC-----TT	TCAACA----	-AGCCAAGCA	TAC-TGACTG	CTAGTTTTCG
45.	TCCTGATTTT	TAATTTAT--	-ATATTAGCA	CTA-TGATTA	AGAGTTTTAG
46.	TTCAGAAAAC	TAAACTTT--	-ATTCTAGCA	TTA-TGATTT	TCAGTTTTAG

ANEXO 1.- Continuación.

	625	635	645	655	665
1.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AAATGGAATT
2.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AAATGGAATT
3.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AA-TGGAACT
4.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AAATGGAATT
5.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AAATGGAATT
6.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGA-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AAA-GGACCT
7.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGA-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AAA-GGATAT
8.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGA-	AAAAATCAAC	CTCCATATTG	AAA-GGATAC
9.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGA-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AAA-GGATAT
10.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAAA-	AAAACACAAC	TTCCATGATG	AAC-GGAGCT
11.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	ATACGGGATC
12.	GTTGGGGTGA	CCGTGGAGT-	AAAAATCAAC	CTCCACATTG	ACACGGAAAT
13.	GTTGGGGTGA	CCGTGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	ACATGGAATT
14.	GTTGGGGTGA	CCGTGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	ACATGGAATT
15.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AAACGGGAT-
16.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGA-	AAAAATCAAC	CTCCACATTG	AAA-GGACCT
17.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGC-	AAAAATAAAC	CTCCTCATTG	AAA-GAATTA
18.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGC-	AAAAACAAC	CTCCACATTG	AAAGGAGTCC
19.	GTTGGGGTGA	TCGCGGAGC-	AAAAACAAC	CTCCGCATTG	AAAGGAGTTC
20.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAATATAAC	CTCCGCATTG	AAACGGATTC
21.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAATATAAC	CTCCGCATTG	AAACGGATTC
22.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAATATAAC	CTCCGCATTG	AAACGGATTC
23.	GTTGGGGTGA	CCCCGGAAT	AAAACACAAC	TTCCACGATG	AAT-GGAGAC
24.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAAAT	AAAACACAAC	TTCCACGATG	AAT-GGAGAT
25.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCGCATTG	AAA-GGATAA
26.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AAA-GGATTC
27.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGA-	AAAAAATATC	CTCCACATTG	AATGGGCCTA
28.	GTTGGGGCGA	CCGCGGAGA-	AAAATAATC	CTCCACGATG	AAT-GGGA--
29.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGA-	AAAATTTATC	CTCCACAATG	AAA-GGGAT-
30.	GTTGGGGTGA	CCACGGAGA-	AAAATCATC	CTCCGCATG	AAA-ATTCTA
31.	GTTGGGGTGA	CCATGGAGA-	AAAATAAAC	CACCATGCTG	--CGAGTCTA
32.	GTTGGGGCGA	CCGCGGAGA-	AAAACCTATC	CTCCGCATG	AAC-GGGAA-
33.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGA-	AAAACCTATC	CTCCACAATG	AAGGGGGAC-
34.	GTTGGGGTGA	CCGCGGGGA-	ATAAAATATC	CCCCGCATG	AAAAGGTA--
35.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAATAAAC	CTCCGCATTG	AAA-GGATAC
36.	GTTGGGGTGA	CCACGGAGT-	AAAACCAAC	CTCCGCAATG	AACAGGGATC
37.	GTTGGGGTGA	CCACGGAGA-	AAAAGAAAC	CTCCGCAATG	AAA-GACTCT
38.	GTTGGGACGA	CCACGGAGA-	AAAACCTATC	CTCCATGTTG	AACTAGACTT
39.	GTTGGGGTGA	CCACGGAGC-	AAAAATTAAC	CTCCACGATG	AAAGAAACTT
40.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAAC-	ATAAAATAAC	CTCCACGATG	AAAGAAATTA
41.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAACATAAC	CTCCGCATTG	AAACGGATTT
42.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAACATAAC	CTCCGCATTG	AAACGGATTC
43.	GTTGGGGCGA	CCCCGGAGA-	ATAATAAAC	CTCCGAGATG	TATAGGGCAC
44.	GTTGGGGCGA	CCACGGAGA-	ACAAATAAC	CTCCACGCTG	GAA--GAAAC
45.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAAATTAAC	CTCCACATTG	AATTAGAGT-
46.	GTTGGGGTGA	CCGCGGAGT-	AAAATATAAC	CTCCGCATTG	AAACGGATTC

ANEXO 1.- Continuación.

	675	685	695	705	715
1.	TTATCCTAAG	CAAAAAGCTA	CAACTTTATG	CATCAGAAAA	CTGACATTAA
2.	TTATCCTAAG	CAAGAAGCTA	CAACTTTATG	CATCAGAAAA	CTGACATTAA
3.	TTGTCCTAAA	CAAAAAGCTA	CAACTTTATG	TATCAGTAAA	CTGACATCAA
4.	TTATCCTAAG	CAAAAAGCTA	CAACTTTATG	CATCAGAAAA	CTGACATTAA
5.	TTATCCTAAG	CAAAAAACTA	CAACTTTATG	CATCAGAAAA	CTGACATTAA
6.	TCCTCCTAAG	CAAAAAGCTA	CAACTTTATG	CATCAATAAA	TTGACATGAA
7.	TCCTCCTAAG	CAAAAAGCTA	CAACTTTATG	CATCAATAAA	TTGACATTAA
8.	TA-TCCTAAA	CAAAAAGCCA	CAACTTTATG	TATCAATAAA	TTGACATTAA
9.	TCCTCCTAAG	CAAAAAGCTA	CAACTTTATG	CATCAATAAA	TTGACATTAA
10.	TACTCCTTAA	CTAAAAGCCA	CCGCTTTAAG	TATCAGCAAC	CTGACATCCA
11.	ATGCCCTAAG	CAAAGAGCCA	CAACTTCATG	CATCATTAAA	CTGACATTAA
12.	AAACCCTAAG	CAAAGAGCCA	CAACTTCATG	CATCAATAAA	CTGACATTAA
13.	AGATCCTAAG	CAAAGAGCCA	CAACTTCATG	CATCAACAAA	CTGACATTAA
14.	AAACCCTAAG	CAAAGAGCCA	CAACTTCATG	CATCAGCAAA	CTGACAT-AA
15.	-AACCTTAAG	CAAGAACCCA	CAACTTTATG	CATCAGTAAA	CTGACATTAA
16.	ACCTCCTAAG	CAAAAAGCTA	CAACTTTATG	CATCAATAAA	TTGACATTAA
17.	CACTTCTAAG	CCAAAAGTTA	CAACTTCATG	CATCAACAAA	TTGACATTAA
18.	CACTCCTTAG	CTAAGAGATA	CACCTCAAAG	CATCAAAAAT	TTGACATCCA
19.	TACTCCTTAA	CCTAGAGACA	CATCTCTAAG	TATCAAAAAT	TTGACATCCA
20.	TAT-CCTAAG	CAAAAAGCTA	CGACTTTAAG	CATCAACAAA	TTGACACCAA
21.	TAT-CCTAAG	CAAAAAGCTA	CGACTTTAAG	CATCAACAAA	TTGACACCAA
22.	TAT-CCTAAG	CAAAAAGCTA	CGACTTTAAG	CATCAACAAA	TTGACACCAA
23.	AT-CCCTTAA	CTAAAAGCTA	CGACTTTAAG	TATCAGCAGC	CTGACATCCA
24.	TTATCCTTAA	CTAAAAGCTA	CCACTTTAAG	TATCAGCAGT	CTGACATCCA
25.	TTT-CCTAAG	CAAAAAGTTA	CGACTTTATG	CATCAACAAA	TTGACATTAA
26.	TTTTCTAAG	CAAAAAGCTA	CGACTTTATG	CATCAATAAA	TTGACATTAA
27.	AAACTCAAGC	CAAAA-GATA	CAGCTTTACG	AACCAATAAA	TCGGCATTAA
28.	TTTCCCTAAA	CAATAAGCCA	CAACTTTATG	TATCAACAAA	TTGACATTTA
29.	TTTTCCCTAAA	CAATAAGCTA	CAGCTTTACG	CATCAGTAAA	CTGACAT-CA
30.	AACTTATAAA	CTATAAGCTA	CAGCTTTAAG	AATCAACAAA	CTGACAT-TA
31.	--ACTCAAAT	CTAAGAACTT	CAACTCCACG	AATCAATAAA	TTGACAT-AA
32.	CTTCCCTAAA	CAAAAAGCCA	CAACTTTATG	TATCAACAAA	TTGACATTTA
33.	TTTCCCAAG	CAGTAAGCCA	CAACTTTATG	CATCAGTAAA	CTGACAT-CA
34.	TACCCTTAAA	CTACAAGTCA	CAACTTTAAG	TATCAGAAAA	CTGACATACT
35.	TAT-CCTAAG	CAAAAAGCTA	CGACTTTATG	CATCAATAAA	TTGACATTAA
36.	T-TCCCTTAA	CCAAGGGCCA	CAACCCTAAG	AATCAATACA	TTGACATCAA
37.	C-CTTCTTAG	TTTAGGACTA	CTTTCCTACG	CATCAATAAA	TTGACACATA
38.	T-ACCCTAAT	CAACAAGTTA	CGACTTAATG	AATCAATAAA	TTGACCTCCA
39.	TATTTCTTAA	CCCAGAGCTA	CAACTCAAAG	TATCAAAAAC	CTGACATAAA
40.	CAITTTCTTAA	CCCAGAATTA	CGACTCTAAG	TATCAAAAAT	TTGACATTCA
41.	TAT-CCTAAG	CAAAAAGCTA	CGACTTTAAG	CATCAACAAA	TTGACACCAA
42.	TAT-CCTAAG	CAAAAAGCTA	CGACTTTAAG	CATCAACAAA	TTGACACCAA
43.	CCACCCTAAG	CCAAAAGCCA	CTGCTTTAAG	CATCAACCCC	TTGACACCCC
44.	CTTTTCTTAA	CCATAAGCCA	CACCTTTAAG	TATTAACAAC	TTAACATCCA
45.	-ATTCCTAAG	CAGAAAACAA	CATCTTTAAG	CATCAACAAA	ATGACATTTA
46.	TAT-CCTAAG	CAAAAAGCTA	CGACTTTAAG	CATCAACAAA	TTGACACCCA

ANEXO 1.- Continuación.

 725 735 745 755 765
1.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
2.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
3.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
4.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
5.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
6.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
7.	TTGACCCAAT	ATTTT-GACC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
8.	TTGACCCAAT	ATTTT-GACC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
9.	TTGACCCAAT	ATTTT-GACC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
10.	TTGACCCAAT	ATAATTGACC	AACGAACCAA	GTTACCCTGG	GGATAACAGC
11.	TTGACCCAAT	ATTTTTGATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
12.	TTGACCCAAT	ATTTTTGATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
13.	TTGACCCAAT	ATTTTTGATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
14.	TTGACCCAAT	ATTTTTGATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
15.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
16.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
17.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
18.	TTGACCCAAT	CTATT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
19.	TTGACCCAAT	ATATT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
20.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
21.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
22.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
23.	TTGACCCAAT	ACAATTGACC	AACGAACCTA	GTTACCCTGG	GGATAACAGC
24.	TTGACCCAAT	ACAATTGATC	AACGAACCAA	GTTACCCTGG	GGATAACAGC
25.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
26.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
27.	TTGACCCAAG	TAATTTGATC	AATGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
28.	TTGACCCGAT	ATTTT-GACT	AACGAACCAA	GTTACCCTGG	GGATAACAGC
29.	TTGACCCAAT	ATATT-GATT	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
30.	TTGACCCAAA	CTTTTTGATC	AACGAACCAA	GTTACCCTGG	GGATAACAGC
31.	TTGACCCAAA	CATTT-GATC	AACGAAACAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
32.	TTGACCCGAT	ATACC-GACT	AACGAACCAA	GTTACCCTGG	GGATAACAGC
33.	TTGACCCAAT	ATATTTGATT	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
34.	TTGACCCAAT	TCTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTGG	GGATAACAGC
35.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
36.	TTGATCCAAA	AAATTTGACC	AATGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
37.	TTGACCCAAC	AACGTTGATC	AATGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
38.	TTGACCCAAT	TCATTTGATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
39.	TTGATCCAAT	CTATTTGATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
40.	TTGACCCAAT	ATGTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
41.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
42.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
43.	TTGACCCAAT	TTAATTGATC	AACGAACCAA	GTTACCCCGG	GGATAACAGC
44.	TTGACCCAAT	AAAATTGATC	AACGAACCTA	GTTACCCTGG	GGATAACAGC
45.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
46.	TTGACCCAAT	ATTTT-GATC	AACGAACCAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC

 775 785 795 805 815
1.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	ATATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
2.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	ATATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
3.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	TTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
4.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	ATATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
5.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	ATATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
6.	GCAATCTACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
7.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GCGGGTTTAC	GACCTCGATG
8.	GCAATCCGCT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GCGGGTTTAC	GACCTCGATG
9.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GCGGGTTTAC	GACCTCGATG
10.	GCAATCCACT	TCAAGAGCCC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
11.	GCAATCCTCT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GGGGGTTTAC	GACCTCGATG
12.	GCAATCCTCT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GGGGGTTTAC	GACCTCGATG
13.	GCAATCCTCT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GGGGGTTTAC	GACCTCGATG
14.	GCAATCCTCT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GGGGGTTTAC	GACCTCGATG
15.	GCAATCCGCT	TCAAGAGCTC	ATATCGACAA	GCGGGTTTAC	GACCTCGATG
16.	GCAATCCGCT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GCGGGTTTAC	GACCTCGATG
17.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	ATATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
18.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
19.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
20.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
21.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
22.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
23.	GCAATCCATT	TCAAGAGCCC	CTATCGACAA	ATGGGTTTAC	GACCTCGATG
24.	GCAATCCATT	TCAAGAGCCC	CTATCGACAA	ATGGGTTTAC	GACCTCGATG
25.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
26.	GCAATCTACT	TAAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
27.	GCAATCTACT	TTGAGAGTAC	ATATCGACAA	GTAGGCTTAC	GACCTCGATG
28.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGCTTAC	GACCTCGATG
29.	GCAATCCACT	TTGAGAGCCC	CTATCGACAA	GTGGGCTTAC	GACCTCGATG
30.	GCAATCTACT	TCGAGAGCAC	ATATCGACAA	GTAGGCTTAC	GACCTCGATG
31.	GCCATCCACT	TCAAAAGTAC	ATATTGACAA	GTGGGCTTAC	GACCTCGATG
32.	GCAATCCACT	TCAAGAGCCC	CTATCGACAA	GTGGGCTTAC	GACCTCGATG
33.	GCAATCCACT	TTGAGAGCCC	CTATCGACAA	GTGGGCTTAC	GACCTCGATG
34.	GCAATCCACC	TCGAGAGCCC	TTATCGACAG	GTGGGCTTAC	GACCTCGATG
35.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
36.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
37.	GCAATCCACT	TCAAGAGCCC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
38.	GCAATCCGCT	TCAAGAGCCC	CTATCGACAA	GCGGGTTTAC	GACCTCGATG
39.	GCAATCTACT	TCAAGAGCCC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
40.	GCAATCCACT	TCAAGAGCCC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
41.	GCAATCCACT	TCAAGAACTC	CTATCGACAA	GCGGGTTTAC	GACCTCGATG
42.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG
43.	GCAATCCATT	TTGAGAGCCC	CTATCGACAA	ATGGGTTTAC	GACCTCGATG
44.	GCAATCCATT	TCAAGAGCTC	CTATCGACAA	ATGGGTTTAC	GACCTCGATG
45.	GCAATCCACT	TTGAGAGCTC	TTATCGACAA	GTGGGCTTAC	GACCTCGATG
46.	GCAATCCACT	TCAAGAGCTC	TTATCGACAA	GTGGGTTTAC	GACCTCGATG

ANEXO 1.- Continuación.

	825	835
1.	TTGGATCAGG	GTATCCC
2.	TTGGATCAGG	GTGTCCC
3.	TTGGATCAGG	GTACCCC
4.	TTGGATCAGG	GTATCCC
5.	TTGGATCAGG	GTATCCC
6.	TTGGATCAGG	GTATCCC
7.	TTGGATCAGG	GTATCCC
8.	TTGGATCAGG	GTATCCC
9.	TTGGATCAGG	GTATCCC
10.	TTGGATCAGG	GTGCCCA
11.	TTGGATCAGG	GTATCCC
12.	TTGGATCAGG	GTATCCT
13.	TTGGATCAGG	ATATCCT
14.	TTGGATCAGG	GTATCCT
15.	TTGGATCAGG	GTATCCT
16.	TTGGATCAGG	GTATCCC
17.	TTGGATCAGG	ATATCCC
18.	TTGGATCAGG	GTATCCC
19.	TTGGATCAGG	GTATCCC
20.	TTGGATCAGG	GTATCCC
21.	TTGGATCAGG	GTATCCC
22.	TTGGATCAGG	GTATCCC
23.	TTGGATCAGG	GTACCCA
24.	TTGGATCAGG	GTACCCA
25.	TTGGATCAGG	GTATCCC
26.	TTGGATCAGG	GTATCCC
27.	TTGGATCAGG	ATGTCCC
28.	TTGGATCGGG	GTACCCC
29.	TTGGATCGGG	GTACCCT
30.	TTGGATCAGG	GT-CCCT
31.	TTGGATCAGG	ATACCCC
32.	TTGGATCGGG	GTACCCC
33.	TTGGATCGGG	GTATCCT
34.	TTGGATCAGG	GTATCCT
35.	TTGGATCAGG	GTATCCC
36.	TTGGATCAGG	GTATCCT
37.	TTGGATCAGG	GTATCCC
38.	TTGGATCAGG	GTATCCT
39.	TTGGATCAGG	GTATCCT
40.	TTGGATCAGG	GTATCCT
41.	TTGGATCAGG	GTATCCC
42.	TTGGATCAGG	GTATCCC
43.	TTGGATCAGG	GTACCCC
44.	TTGGATCAGG	GTATCCC
45.	TTGGATCAGG	GTATCCA
46.	TTGGATCAGG	GTATCCC

ANEXO 1.- Continuación.