

Capítulo XI

Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los Anfibios y Reptiles ibéricos

Salvador CARRANZA



1. Los inicios

Durante cientos de años los naturalistas han intentado detectar, describir y explicar la diversidad biológica de nuestro planeta. Esta ardua tarea se conoce con el nombre de sistemática. Uno de los primeros avances en sistemática fue la aparición del sistema de nomenclatura binomial desarrollado por el naturalista sueco LINEO en 1758. Este sistema estableció el marco para describir y categorizar la diversidad biológica, identificando primero a las diferentes especies para agruparlas posteriormente en categorías superiores (familia, clase, orden, filum y reino). Inicialmente independiente de la teoría evolutiva, la nomenclatura binomial de Lineo persistió hasta que pioneros de la evolución como Charles DARWIN (1809-1882), Carl GEGENBAUER (1826-1903), y Ernst HAECKEL (1834-1919) la adoptaron y complementaron con ideas personales (por ej. la teoría de la recapitulación propuesta por Haeckel) para producir algunas de las primeras clasificaciones basadas en relaciones filogenéticas. De todos modos, desde la época que podríamos llamar post-Darwiniana hasta la primera mitad del siglo XX, no existieron ni consenso ni criterios objetivos claros para la reconstrucción filogenética, basándose ésta principalmente en la opinión personal de devotos especialistas que destinaban años al estudio de un grupo taxonómico. Aunque generalmente se aceptaba el concepto de evolución, no todos los científicos compartían exactamente la teoría propuesta por DARWIN (1859). La falta de un concepto común de evolución y una metodología de inferencia filogenética objetiva, estandarizada y unificadora, tuvo importantes consecuencias, como por ejemplo que para cada grupo taxonómico toda la autoridad sistemática se centrara en un grupo de personas reducido. La existencia y credibilidad de la “autoridad sistemática” se veía reforzada por la falta de un procedimiento formalizado de corroboración y refutación de hipótesis. Otro aspecto importante fue la falta de una clara orientación filosófica sobre qué aspectos evolutivos debían ser reflejados en las clasificaciones. Sin embargo, la aproximación casi puramente descriptiva de la sistemática y la existencia de numerosos expertos y escuelas en la mayoría de grandes grupos taxonómicos propició que se produjese un avance significativo en la catalogación de la diversidad del mundo natural, resultando en la mayor parte de la clasificación biológica tal y como la conocemos hoy en día.

En el campo de la herpetología, el conocimiento de la diversidad de reptiles y anfibios a nivel mundial aumentaba a medida que las principales potencias de la época enviaban expediciones alrededor del globo y traían a su regreso numerosos especímenes a los principales museos de historia natural de Europa y EEUU, donde se recopilaban en los cada vez más completos catálogos de la fauna mundial. Entre las obras europeas más importantes de la primera mitad del siglo XVIII, destacan las de los franceses FRANÇOIS DAUDIN (*Histoire naturelle, générale et particulière des reptiles*, 9 volúmenes, 1802-1803) y la de Constante Duméril, su hijo AUGUSTE & GABRIEL BIBRON (*Herpetologie générale ou histoire naturelle complète des reptiles*, 9 volúmenes, 1834-1854). Entre las obras más importantes publicadas durante la segunda mitad del siglo XIX se encuentra el monumental catálogo de los reptiles y anfibios del British Museum (Natural History), realizado por GEORGE BOULENGER (*Catalogue of the amphibians and reptiles of the British Museum*, 9 volúmenes, 1882-1896), resumiendo el conocimiento herpetológico de la época y convirtiéndose en referencia imprescindible incluso en la actualidad. En Norteamérica, el objetivo de las primeras exploraciones fue el de intentar catalogar la diversidad herpetológica en la parte oeste del país. La primera monografía sobre la herpetología norteamericana fue publicada por John Holbrook en tres volúmenes entre los años 1836 y 1838. La mayoría de especímenes recolectados durante esta primera época de exploración Norteamericana se encuentran en las colecciones de la Academy of Natural Sciences of Philadelphia y en el National Museum of Natural History (Smithsonian Institution) en Washington, D.C. y en el Museum of Comparative Zoology, Harvard University, habiendo sido una buena parte de ellos descritos por EDWARD COPE, SPENCER BAIRD & CHARLES GIRARD, e incluidos en las cinco ediciones de la *Check list of North American Amphibians and Reptiles* realizadas por LEONHARD STEJNEGER & THOMAS BARBOUR entre 1900 y 1950.

A principios del siglo XX, diversos herpetólogos empezaron a mostrar un interés cada vez mayor en inferir las relaciones filogenéticas entre los diferentes grupos de reptiles y anfibios y utilizarlas en sus clasificaciones. En 1920, Boulenger escribió en su monografía sobre el género *Rana*: “ha llegado el momento de dejar a un lado los métodos empíricos que han prevalecido durante tanto tiempo en taxonomía y dedicarnos a agrupar a las diferentes especies de acuerdo con sus relaciones filogenéticas” (BOULENGER, 1920a). Ese mismo año, en su *Monograph of the Lacertidae*, Boulenger realizó un análisis morfológico detallado utilizando información sobre ontogenia y paleontología para polarizar caracteres e inferir relaciones del tipo ancestro descendiente a nivel de especie y expresarlas en forma de diagrama arborescente. En sus palabras: “el diagrama mostrado expresa mi concepción de las relaciones entre especies y variedades que constituyen esta sección” (pág. 38; BOULENGER, 1920b) (Fig. 1). Casi al mismo tiempo, al otro lado del Atlántico se estaba produciendo una revolución similar que también estaba relacionada con la forma de

abordar la manera de clasificar los reptiles y anfibios, intentando considerar sus relaciones filogenéticas. Esta revolución vino de la mano del joven Charles L. Camp, el cual a la edad de 30 años publicó el libro *Classification of the Lizards*, sentando las bases de la sistemática moderna de los escamosos y produciendo la primera filogenia del grupo (pág. 333 de la reimpression de la obra de CAMP de 1923; CAMP, 1971). En su trabajo, Camp mostró un gran interés en inferir las relaciones filogenéticas entre los diferentes grupos de reptiles objeto de su estudio, recopilando gran cantidad de información sobre su morfología, distribución geográfica, ontogenia y paleontología, y discutiendo de forma explícita los siempre difíciles conceptos de homología, convergencia y paralelismo que tan familiares se harían 40 años más tarde de la mano de Willi Hennig (entomólogo alemán que sentó las bases de la teoría cladista). De todos modos, y pese al interés y los esfuerzos mostrados por Boulenger en el Reino Unido y Camp en EEUU, pocos fueron los herpetólogos que siguieron sus pasos, provocando que durante los siguientes 20-30 años los esfuerzos se volvieran a centrar básicamente en perfeccionar la alfa-taxonomía de los diferentes grupos, sin mostrar gran interés en sus relaciones evolutivas. Una de las posibles explicaciones de este “lapso filogenético” fue la creencia que la morfología a altos niveles estaba demasiado afectada por fenómenos de paralelismos y convergencias, imposibilitando la correcta inferencia de las relaciones filogenéticas entre organismos. Otra de las posibles razones es que todavía no se había definido formalmente un procedimiento de análisis filogenético suficientemente explícito desde el punto de vista filosófico y metodológico. A pesar de estas limitaciones, a partir de los años cincuenta se produjo un resurgir de las ideas filogenéticas iniciales de Boulenger y Camp de la mano de diversos científicos de la época como por ejemplo UNDERWOOD (1954), ETHERIDGE (1966) y sobretodo por Kluge, uno de los primeros herpetólogos en adoptar la incipiente metodología cladista siguiendo las ideas de HENNIG (1957, 1966) y en introducir nuevos criterios cuantitativos para la evaluación de las distintas hipótesis filogenéticas de diversos grupos de reptiles y anfibios (KLUGE, 1968, 1969). Del mismo modo que el resto de áreas de la biología, la herpetología se benefició en gran medida de la revolución metodológica (tanto cladista como fenética) ocurrida en el campo de la inferencia filogenética durante los años setenta y ochenta, abriendo un abanico de nuevas posibilidades para el estudio de la biología comparada y la evolución (FARRIS, 1982; FELSENSTEIN, 1981; KLUGE, 1969; NEI, 1972). Al mismo tiempo que se producían avances importantes en el campo analítico, se le dedicaba mucho más tiempo y esfuerzos al estudio detallado de la biología de los reptiles y anfibios, obteniéndose gran cantidad de caracteres morfológicos, fisiológicos y ontogénicos con los que poder inferir las relaciones filogenéticas. Como resultado de dichas investigaciones se publicaron numerosos artículos científicos y, en el caso de los reptiles, una magnífica obra de 19 volúmenes y más de 10.000 páginas que empezó a editarse en 1969 por Carl Gans y colaboradores. Este trabajo incluye de una manera extremadamente detallada aspectos morfológicos (vol. 1-4, 6, 11 y 19), fisiológicos (vol. 5, 8, 12-13, y 18), ecológicos y de comportamiento (vol. 7 y 16), neurológicos (vol. 9-10 y 17) y de la biología del desarrollo (vol. 14 y 15) de los repti-

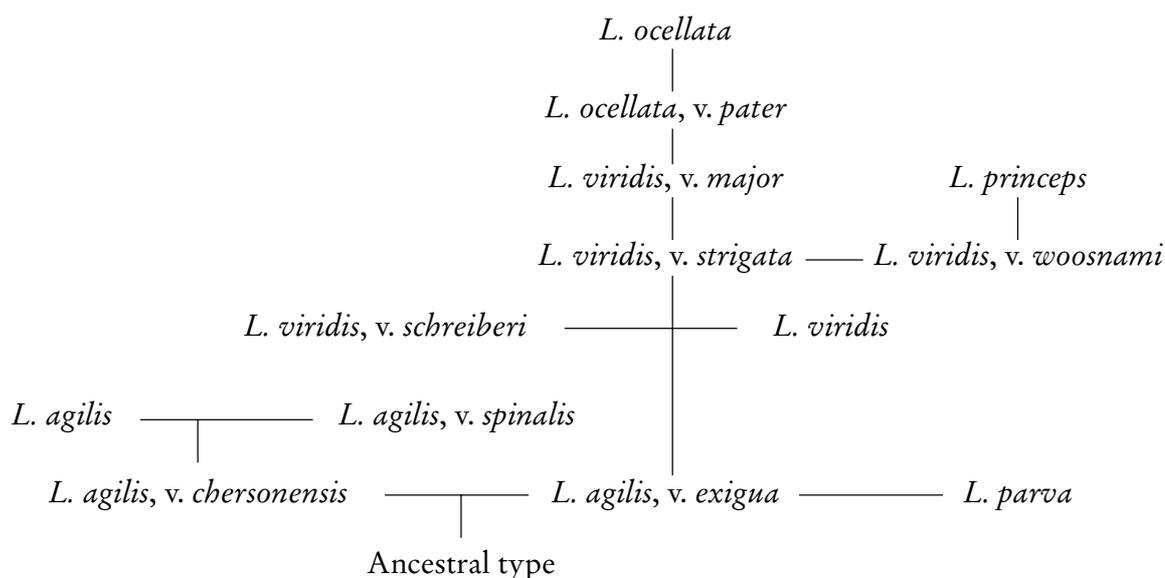


Figura 11. 1. Relaciones filogenéticas de algunos lacértidos según Boulenger 1920b.

les. En otros campos de la herpetología, destacan las obras *Physiology of the amphibia* (3 volúmenes editados por JOHN MOORE (vol. 1) y BRIAN LOFTS (vol. 2 y 3)), *Amphibian biology* (editado por HAROLD HEATWOLE) y la obra *Biology of amphibians* (DUELLMAN y TRUEB, 1986), donde los autores recopilan gran parte del conocimiento sobre la fisiología, biología, sistemática y biogeografía de los anfibios. Paralelamente al intensivo estudio de la biología (especialmente de la morfología) numerosos sistemáticos empezaron a adoptar y aplicar las nuevas metodologías de inferencia filogenética en sus trabajos, enriqueciendo considerablemente el conocimiento tanto a nivel morfológico como evolutivo de diversos grupos de reptiles y anfibios, como por ejemplo los anuros y urodelos (DUELLMAN y TRUEB, 1986), cecilias (NUSSBAUM y WILKINSON, 1989), lacértidos (ARNOLD, 1989a, b), gecónidos (KLUGE, 1983), escíncidos (GREER, 1979), y varios grupos de reptiles (ESTES y PREGILL, 1988). Simultáneamente, las filogenias empezaron a aplicarse para investigar cuestiones biogeográficas (KLUGE, 1988; WATSON y LITTLEJOHN, 1985), ecológicas (SNELL *et al.*, 1984) y gracias al pionero trabajo de GREENE (1986), para trazar la evolución de caracteres morfológicos permitiendo, por ejemplo, diferenciar entre adaptaciones y exaptaciones (ARNOLD, 1994, 1995). Durante todo este periodo comprendido entre los años setenta y ochenta, gran parte de la sistemática de los reptiles y anfibios (especialmente de los reptiles) se basó principalmente en la utilización de caracteres morfológicos. Si la utilización de la morfología en filogenia tenía la ventaja de que obligaba al investigador a profundizar en el conocimiento de la biología, ecología y comportamiento del grupo objeto de estudio, su mayor desventaja era la dificultad de obtener un número suficiente de caracteres válidos para el análisis filogenético. Debido a esto y a los increíbles avances de la biología molecular, ésta fue jugando cada vez un papel más importante en la mayoría de áreas de la herpetología, promoviendo su rápido avance y siendo hoy en día el método más utilizado en estudios filogenéticos y biogeográficos.

El incremento exponencial en los últimos 10 años de la utilización de datos moleculares ha provocado que el número de filogenias haya aumentado de una manera astronómica, haciendo posibles proyectos que hace unos años hubiesen parecido impensables, como por ejemplo el del *Tree of life* (árbol de la vida), cuyo objetivo principal es proporcionar información filogenética sobre todos los grupos de organismos de la tierra (<http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>). Para un ejemplo con aplicación en la herpetología de cómo funciona este proyecto que une más de 2000 páginas web de todo el mundo, véase: <http://tolweb.org/tree/eukaryotes/animals/chordata/salientia/salientia.html>. Otra iniciativa relacionada con el *Tree of life* e igualmente originada como resultado del considerable aumento en el número y robustez de las filogenias publicadas en los últimos años es la del *PhyloCode* (<http://www.ohiou.edu/phylocode>). Aunque su base teórica fue desarrollada hace más de 10 años (DE QUEIROZ & GAUTHIER, 1990), la preparación del *PhyloCode* no nació como iniciativa hasta agosto de 1998, a raíz de un congreso celebrado en Harvard, USA. Como su nombre indica, el *PhyloCode* es un sistema de nomenclatura basado en las relaciones filogenéticas de los organismos. Su objetivo principal es sustituir el sistema de nomenclatura propuesto por Lineo en 1758 y actualmente regido por los códigos internacionales de nomenclatura zoológica (ICZN), botánica (ICBN), etc. por un nuevo sistema en el cual los diferentes grupos se nombrarán únicamente en base a sus relaciones filogenéticas. Por el momento, las normas del *PhyloCode* tan solo afectan a los clados (grupos monofiléticos), pero está previsto que dentro de poco también se publiquen las directrices para la nomenclatura a nivel de especie (CANTINO *et al.*, 1999). Aunque se desconoce el grado de aceptación que tendrá entre la comunidad científica este nuevo sistema de nomenclatura, esta iniciativa, al igual que la del *Tree of life*, son un reflejo del incremento de la conciencia filogenética ocurrida en sistemática durante los últimos años. Así pues, la sistemática ha pasado de ser una ciencia básicamente descriptiva e independiente de la filogenia desde Lineo hasta mediados del siglo XX (con algunas excepciones), a adoptar el conocimiento de las relaciones filogenéticas como principio y base fundamental de la clasificación de los organismos.

2. La revolución molecular

Aproximadamente durante la misma época que se estaba produciendo la revolución metodológica que propició el desarrollo de los principios de la cladística y de las nuevas metodologías para el análisis filogenético, otra revolución de igual magnitud se estaba gestando en el campo de la biología molecular. A principios de los años sesenta algunos investigadores empezaron a utilizar la información derivada del análisis cromosómico (citogenética), de proteínas (inmunología y enzimas) y posteriormente, del ADN (ácido desoxirribonucleico) para resolver problemas taxonómicos, evolutivos y biogeográficos, entre otros.

2.1. Aplicaciones de la citogenética en sistemática molecular

La citogenética tiene sus orígenes en los años treinta y cuarenta, cuando se empezaron a publicar los primeros cariotipos de organismos y diversos libros que sentaron sus bases iniciales (DARLINGTON, 1932; WHITE, 1945). La

citogenética comprende diversas áreas dirigidas al estudio de la estructura, función y evolución de los cromosomas y su posible aplicación en los campos de la genética clínica, biología comparada y sistemática, entre otros. La importancia de la citogenética en sistemática reside en las observaciones que se hicieron durante los años setenta sobre el enorme efecto que tenían las reorganizaciones cromosómicas, impidiendo o reduciendo la fertilidad en el caso de cruzamientos entre individuos con cariotipos diferentes, creando una barrera al intercambio genético y, por tanto, resultando en la diferenciación de dichos individuos (poblaciones) en especies diferentes (JACKSON, 1971). La importancia del descubrimiento de la relación existente entre cariología y especiación influyó en gran medida a que la mayor parte de las aplicaciones de la citogenética en sistemática se centrasen principalmente en intentar establecer el estatus taxonómico de una determinada población, especie o grupo de especies en base a su organización cromosómica (lo que podría denominarse citotaxonomía). En el campo de la herpetología, los primeros trabajos fueron dirigidos a la obtención y caracterización de cariotipos de diversos grupos de reptiles y anfibios, como por ejemplo los realizados en cocodrilos (COHEN y GANS, 1970), quelonios (MEDRANO *et al.*, 1987), escamosos (BECAK *et al.*, 1972; KING, 1981; BECAK y BECAK, 1969), urodelos (MORESCALCHI *et al.*, 1979) y anuros (MORESCALCHI, 1981).

De todos modos, enseguida se vio que la citogenética tenía problemas fundamentales: 1) en determinadas situaciones era bastante difícil identificar los diferentes cromosomas; 2) únicamente el número cromosómico no era un buen indicador de las relaciones filogenéticas entre organismos, ya que el aumento o reducción en el número de cromosomas podía originarse por múltiples vías. Es decir, para poder establecer las homologías (reconocimiento de las diferentes parejas de cromosomas hermanos en organismos diploides) y homeologías (reconocimiento de las pareja de cromosomas homólogos entre organismos diferentes) válidas para el análisis filogenético, era necesario primero identificar los cromosomas implicados en los diferentes procesos citogenéticos; y 3) se tenía muy poco conocimiento sobre las bases moleculares de la estructura y función de los cromosomas y la función de los diferentes mecanismos citogenéticos (transposición, retrotransposición, conversión génica, inversiones, translocaciones, etc.), implicados en su evolución. Esto propició que, aparte de la aproximación morfológica al reconocimiento de los distintos cromosomas de un cariotipo (básicamente tratamiento hipotónico de las metafases y determinación del tamaño del cromosoma y posición del centrómero), se desarrollasen otros métodos más sofisticados de tipo químico, enzimático y molecular dirigidos a facilitar los análisis citogenéticos como por ejemplo: 1) determinación de la distribución de la heterocromatina mediante tinción con Feulgen y otros reactivos clásicos; 2) determinación de la posición de los organizadores nucleolares (NOR) mediante tinción con nitrato de plata (HOWELL y BLACK, 1980); 3) observación de patrones de bandas -Q, -G, -R y -C utilizando métodos de tinción específicos (BICKMORE y SUMNER, 1989; COMINGS, 1978; SUMNER, 1990); 4) utilización de enzimas de restricción (por ej. *AluI*) para producir más patrones de bandas que facilitasen el reconocimiento de los cromosomas (MILLER *et al.*, 1984); y 5) utilización de técnicas moleculares como la hibridación *in situ* (ISH) (MACGREGOR, 1993) e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (THERMAN y SUSMAN, 1993), para identificar de una forma más precisa los diversos cromosomas y regiones cromosómicas. Gracias a su precisión, esta última técnica se utilizó satisfactoriamente en sistemática para verificar las homologías y homeologías hipotetizadas previamente en base a la morfología cromosómica y técnicas de bandeo (STEINEMANN *et al.*, 1984).

La herpetología, al igual que muchos otros campos de la biología y medicina, se benefició en gran medida de todos estos avances técnicos y metodológicos que, entre otras cosas, facilitaron el establecimiento de homeologías y permitieron el desarrollo de nuevos caracteres con aplicación taxonómica (por ej. la posición del NOR). La citogenética tuvo una especial repercusión en el estudio de la sistemática de los anfibios, representando una alternativa muy útil a la falta de caracteres morfológicos válidos para la inferencia filogenética. Parte de este conocimiento quedó reflejado en dos libros publicados en 1990 *Cytogenetics of amphibians and reptiles* (OLMO, 1990) y 1991 *Amphibian cytogenetics and evolution* (GREEN y SESSIONS, 1991), donde se recopilaron numerosas contribuciones de diverso contenido y que incluyen desde estudios citotaxonómicos de grupos de reptiles y anfibios al estudio de la organización del genoma eucariótico, regulación génica y la función y evolución de ciertos fragmentos de ADN. De todos modos, a pesar del auge de esta técnica durante los años ochenta, a partir de los años noventa cayó en desuso debido básicamente a la existencia desde hacía tiempo de técnicas de análisis proteico y al reciente perfeccionamiento de las técnicas de amplificación y análisis de ADN. Por este y otros motivos, la contribución de la citogenética a la sistemática de los reptiles y anfibios (especialmente de los reptiles) fue decreciendo, centrándose los trabajos principalmente en definir los límites entre poblaciones, subespecies y especies (CAPUTO *et al.*, 1993; ODIERNA *et al.*, 1996). Una posible explicación de este hecho reside en la dificultad de establecer homeologías por encima del nivel de especie y a la dificultad de codificar los caracteres de una manera satisfactoria y razonable para su posterior análisis filogenético. Para una discusión sobre la aplicabilidad de la citotaxonomía en filogenia véase KLUGE (1994).

2.2. Aplicaciones de los análisis de proteínas en sistemática molecular

Si la citogenética fue uno de los primeros métodos que permitió observar y obtener información sobre el genoma celular, los análisis de proteínas desarrollados paralelamente abrirían una ventana en dicho genoma para poder obtener información sobre las secuencias genéticas. En 1955, SANGER y colaboradores determinaron la secuencia aminoacídica de la proteína insulina del cerdo, la oveja y la vaca y las compararon para tratar de averiguar como estas especies habían divergido a nivel molecular. A partir de este trabajo sin precedentes, la determinación de la secuencia de aminoácidos de una proteína pasó a ser, pese a las limitaciones obvias de la redundancia del código genético, la forma más directa que existía en aquellos momentos de obtener información sobre las secuencias de ADN. En los años siguientes, otros grupos científicos se dedicaron a secuenciar más proteínas (hemoglobina, albúmina, mioglobinas y el citocromo C) de diferentes organismos y a utilizar su información para inferir relaciones filogenéticas. De todos modos, su secuenciación continuaba siendo un trabajo muy costoso que requería grandes cantidades de proteína purificada de partida y meses de trabajo para obtener unos pocos residuos aminoacídicos. Este hecho permitió y promovió que se desarrollasen nuevas técnicas más asequibles (aunque fuesen indirectas) dirigidas a aprovechar la información que proporcionaban las proteínas sobre el material hereditario (ADN). Entre las más utilizadas para solventar numerosos aspectos de la sistemática de los reptiles y anfibios (y otros organismos) se encuentran las derivadas de ensayos inmunológicos y las basadas en la electroforesis de proteínas.

2.2.1. Los ensayos inmunológicos

Los ensayos inmunológicos ocupan un lugar privilegiado en la historia por haber sido la primera técnica molecular empleada específicamente para resolver un problema taxonómico en animales (NUTTALL, 1904). Pese al trabajo pionero de Nuttall, la inmunotaxonomía progresó muy poco en las décadas siguientes y no fue hasta bien entrados los años sesenta y setenta, inicio de la “revolución molecular”, que la inmunología volvió a jugar un papel relevante en la sistemática. De hecho, la inmunología saltó de nuevo al primer plano de la escena científica cuando en 1967, Sarich y Wilson, utilizando una versión actualizada del método inmunológico empleado por Nuttall en 1904, consiguieron calibrar la tasa de evolución de la albúmina sérica y demostraron que, en contra de lo propuesto por los análisis morfológicos, los humanos, chimpancés y gorilas formaban un grupo monofilético y que la separación entre ellos había ocurrido hacía tan solo 5 millones de años. A partir de ese momento, y debido a estudios posteriores que corroboraron que la albúmina evolucionaba aproximadamente de acuerdo a un supuesto “reloj molecular” (MAXSON & MAXSON, 1986; WILSON *et al.*, 1977), los análisis inmunológicos ganaron importancia en estudios en los que por diversas razones era necesario conocer las edades aproximadas de las separaciones entre los diferentes taxones objeto de estudio para testar las hipótesis planteadas (HEDGES *et al.*, 1992).

El principio de las técnicas inmunológicas (básicamente la reacción de la precipitina, inmunoelectroforesis, fijación del microcomplemento (MCF) y utilización de anticuerpos monoclonales) es bastante sencillo y se basa en la asunción de que el nivel de reacción entre antígeno y anticuerpo proporciona una medida del grado de similitud genética entre las diversas proteínas antigénicas comparadas. Desde un punto de vista taxonómico, cuanto más divergentes sean dos organismos mayor será el número de sustituciones aminoacídicas existentes entre proteínas homólogas y por tanto menor el número de determinantes antigénicos comunes. De ese modo, la distancia inmunológica representa una medida de la proporción de determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos obtenidos a partir de la inmunización con antígenos de un organismo (reacción homóloga), que son reconocidos por los mismos anticuerpos en una muestra de antígenos de otros organismos (reacción heteróloga). Por tanto, la capacidad de esta técnica de proporcionar distancias entre taxones que sean útiles para la inferencia filogenética reside justamente en cómo de estrecha y cierta sea la relación entre cantidad de anticuerpo unido y las diferencias en la secuencia aminoacídica entre los antígenos homólogos y heterólogos.

Una crítica que a menudo reciben las técnicas inmunológicas es que, en general, los resultados son en forma de matrices de distancias. Es decir, las técnicas inmunológicas proporcionan casi siempre datos cuantitativos, y por tanto en la mayoría de casos son inaplicables para resolver cuestiones biológicas para las que se necesitan datos cualitativos, como por ejemplo en análisis de paternidad, estimaciones de flujo genético entre poblaciones, identificación de híbridos, identificación forense y análisis filogenéticos utilizando métodos de parsimonia y máxima verosimilitud. Aparte de las características del tipo de datos que proporciona, la inmunotaxonomía tiene otras limitaciones de tipo logístico y de cantidad de tiempo requerido para realizar los experimentos. Pese a las limitaciones analíticas y experimentales, las diversas técnicas inmunológicas siguieron siendo el método más aceptado para datar los diferentes eventos cladogenéticos de un árbol filogenético y por tanto, muy utilizadas hasta principios de los noventa

para resolver tanto aspectos sistemáticos como biogeográficos en herpetología (BAVERSTOCK *et al.*, 1993; HEDGES *et al.*, 1992; JOGER 1984). La inmunología se dejó de aplicar casi por completo en sistemática y biogeografía en el momento en el que se perfeccionaron las técnicas de amplificación y secuenciación de ADN hacia mediados de los noventa, desarrollándose nuevos métodos más precisos para la inferencia filogenética y la calibración de relojes moleculares a partir del ADN.

2.2.2. La electroforesis de proteínas

De todas las técnicas moleculares desarrolladas hasta los noventa, la electroforesis de proteínas ha sido sin duda alguna la que más veces y con más éxito se ha aplicado a resolver diversos aspectos de la sistemática, biogeografía y evolución de los reptiles y anfibios. Su simplicidad, bajo coste, tipo de datos que proporciona (tanto cualitativos como cuantitativos), elevado poder de resolución y aplicabilidad a un nivel taxonómico bajo (en general a nivel de subespecies, especies y géneros cercanos), son las principales características que permitieron que esta técnica fuese una de las únicas que durante varios años pudiese competir con la incipiente tecnología de la amplificación y secuenciación de ADN, que cambiaría completamente el panorama de la sistemática molecular a principios de los noventa (HILLIS *et al.*, 1996). Las proteínas son uno de los componentes estructurales y reguladores más importantes de las células, siendo su secuencia y estructura un reflejo de la información genética contenida en los genes. La electroforesis de proteínas se basa en la propiedad que tienen las proteínas de presentar una carga eléctrica (positiva, negativa o neutra dependiendo del pH), tamaño y forma determinados. La relación existente entre pH y carga neta de las proteínas reside en el hecho que de los 20 aminoácidos existentes (la combinación de los cuales da las cadenas polipeptídicas lineales que al adquirir estructura secundaria y terciaria se denominan proteínas), tres presentan carga positiva a pH bajos (arginina, lisina y histidina) y dos presentan carga negativa a pH altos (ácido aspártico y ácido glutámico). Por tanto, la carga neta de una proteína depende del número y carga de cada uno de estos aminoácidos y, en última instancia, del pH de la muestra. Cambios en la secuencia de ADN (mutaciones) pueden resultar en cambios en la composición aminoacídica de las proteínas (no siempre una mutación en el ADN resulta en un cambio de aminoácido; ver más abajo) y en última instancia pueden afectar su carga eléctrica neta, forma y peso molecular. Mediante la electroforesis, las proteínas se separan en base a su diferente movilidad a través de una matriz (almidón, acetato de celulosa, poliacrilamida o agarosa) situada en un campo eléctrico, lo que significa que, en definitiva, se separan de acuerdo a su carga eléctrica neta, peso molecular o ambos según el tipo de matriz y condiciones utilizadas. En una electroforesis se pueden detectar muchos tipos de proteínas, muchas de ellas no aptas para su uso como marcadores moleculares. Las proteínas más comúnmente utilizadas en sistemática son las enzimas (proteínas con actividad catalítica). Para visualizarlas independientemente del resto de las proteínas de la muestra se utiliza el método denominado de tinción histoquímica (HUNTER y MARKERT, 1957). Este método se basa en detectar selectivamente determinadas enzimas mediante la adición de los substratos de la reacción bioquímica que catalizan y posterior tinción de los productos resultantes. Aunque pocas veces se analizan más de 15-50 loci diferentes (posiciones dentro del genoma ocupadas por genes diferentes), actualmente el número total de loci que pueden visualizarse utilizando técnicas de tinción histoquímicas supera los 200 (MANCHENKO, 1994). Generalmente, estos incluyen enzimas muy conservadas que realizan funciones básicas a nivel celular y que por tanto, acostumbran a encontrarse en la mayoría de organismos a un nivel detectable. Este hecho permite la utilización de los mismos reactivos y técnicas de revelado entre organismos muy separados filogenéticamente. Al patrón de bandas teñidas de una enzima se le denomina zimograma. Las enzimas se diferencian en dos clases y ambas proporcionan información aplicable en sistemática molecular, aloenzimas e isoenzimas. Las aloenzimas son variaciones polipeptídicas que representan diferentes alternativas alélicas del mismo locus génico (variantes de un gen en una posición determinada dentro del genoma), mientras que las isoenzimas comprenden todas las formas enzimáticas con función similar producidas por diferentes loci génicos (enzimas con función similar codificadas en diferentes partes del genoma).

La electroforesis de alo e isoenzimas ha repercutido mucho en la sistemática de la mayoría de grupos biológicos (incluyendo los reptiles y anfibios) y en muchas áreas de la biología, como por ejemplo la genética de poblaciones y la taxonomía. Quizás uno de los aspectos que hizo de la electroforesis de proteínas una de las técnicas más utilizadas durante la era pre-DNA fue la facilidad y bajo costo con el que se podían analizar cientos de genotipos (normalmente referida a la composición génica de un organismo en un locus determinado) en unos días, permitiendo obtener en pocos años gran cantidad de datos sobre polimorfismos de proteínas en poblaciones naturales de anfibios y reptiles, aplicables para inferir su estructura genética y, en caso necesario, sus relaciones filogenéticas. Por citar algunos ejemplos, la electroforesis de enzimas se ha aplicado con éxito en herpetología para analizar los límites entre

poblaciones, subespecies y especies (ARNTZEN y GARCÍA-PARÍS, 1995; CAPULA, 1996), fenómenos de hibridación entre especies (GOOD, 1989), deducir eventos históricos como por ejemplo efectos fundadores ocurridos en especies introducidas (ESTEAL, 1986), inferir patrones biogeográficos (ARANO *et al.*, 1998; MATEO *et al.*, 1996), así como en estudios de paternidad (HARRY y BRISCOE, 1988).

Quizás una de las ventajas más importantes de la electroforesis de proteínas respecto a otros métodos aplicados en sistemática molecular (incluyendo la secuenciación de ADN), es que normalmente se obtienen datos de múltiples loci genéticos independientes con localizaciones genómicas diferentes, disminuyendo así el riesgo de artefactos derivados del análisis de uno o pocos loci (NICHOLS, 2001). Los tipos de datos que proporciona la electroforesis de aloenzimas son analizados e interpretados de forma diferente según el nivel taxonómico. Por ejemplo, en estudios de genética de poblaciones, la habilidad de la electroforesis de proteínas de identificar frecuencias génicas nos permite calcular diversos parámetros importantes para determinar si dos poblaciones constituyen una única unidad genética o si contrariamente están aisladas genéticamente y, por tanto, deberían ser consideradas diferentes desde el punto de vista taxonómico. A otro nivel, los datos aloenzimáticos pueden utilizarse para inferir relaciones filogenéticas entre poblaciones/subespecies, especies y, ocasionalmente, entre géneros diferentes. Básicamente existen dos métodos de inferencia filogenética a partir de datos aloenzimáticos, los basados en matrices de distancias genéticas (cuantitativos) y los basados en caracteres discretos (cualitativos). En el primer caso, los datos enzimáticos representados por el zimograma se convierten en distancias genéticas utilizando diferentes medidas como por ejemplo, la distancia genética de NEI (1972, 1978), o el índice de similitud de ROGERS (1972). Posteriormente, estas medidas se utilizan para inferir árboles filogenéticos utilizando métodos de análisis basados en matrices de distancias, como por ejemplo *neighbor-joining* (SAITOU y NEI, 1987) y mínima evolución (RZHETSKY y NEI, 1992). En el segundo caso, los datos aloenzimáticos se codifican para poderse utilizar en reconstrucciones filogenéticas utilizando la metodología cladística y el criterio de parsimonia (SWOFFORD y BERLOCHER, 1987). Fundamentalmente existen dos métodos de codificación de caracteres: 1) el que registra la presencia-ausencia de alelos (criticado por la falta de independencia entre alelos y la posibilidad de que ningún alelo pueda ser reconstruido para el nodo ancestral, (SWOFFORD y OLSEN, 1990)); y 2) el que considera cada combinación de alelos diferentes de un locus en particular como un estado de carácter discreto (BUTH, 1984), pudiéndose en el caso que se crea oportuno, utilizar matrices de costos para conectar los diferentes estados de carácter (MABEE y HUMPHRIES, 1993).

Aunque la electroforesis de proteínas ha jugado un papel importantísimo en la sistemática molecular de reptiles y anfibios, diversos problemas de tipo técnico, metodológico y de aplicabilidad han hecho que, como en el caso de la citogenética y la inmunología, esta técnica haya sido sustituida casi por completo por otros métodos derivados del análisis de ADN. En general, se ha visto que para estudios a un nivel taxonómico muy bajo (por ej. de estructura de poblaciones), los análisis aloenzimáticos proporcionan menos información que otros basados en el análisis de ADN (secuenciación, análisis de enzimas de restricción y especialmente microsatélites) (HUGHES y QUELLER, 1993). Lo mismo ocurre a niveles taxonómicos elevados (por encima de género), donde la elevada divergencia genética provoca que las especies comparadas compartan muy pocos o casi ningún alelo, con el peligro añadido de que las pocas posiciones compartidas sean homoplásicas (SITES *et al.*, 1984). Debido a esto, se considera que la electroforesis de enzimas no es aplicable para inferir relaciones filogenéticas entre organismos que hayan divergido hace más de 50 millones de años (AVISE, 1994). En general, se ha observado que en vertebrados el rango ideal de aplicación de la electroforesis de enzimas va del nivel intraespecífico hasta el intergenérico (dependiendo del grupo) (AVISE, 1994; NEI, 1987). Otro aspecto importante a considerar cuando se utiliza la electroforesis de proteínas en estudios de sistemática molecular, es que la información resultante es de tipo indirecto. Es decir, el investigador tiene que interpretar correctamente los patrones de bandas (en algunos casos puede ser complicado) y asumir que los cambios en la movilidad de las proteínas reflejan cambios reales en el ADN que las codifica y viceversa, y esto no siempre se cumple. Por ejemplo, HERNÁNDEZ-JUVIEL *et al.* (1992) demostraron que la movilidad del enzima glutamato deshidrogenasa (GTDH) de extractos de hígado de serpiente de cascabel variaba al incrementar el factor de dilución de la muestra y FLOWERDEW y CRISP (1976) observaron que la variación enzimática del crustáceo cirrípido *Balanus balanoides* dependía de la estación del año, la edad y la ecología de estos organismos. Del mismo modo, se ha observado que en algunas situaciones, la electroforesis de enzimas puede subestimar la variabilidad genética real de la muestra debido a la existencia de alelos a nivel del ADN con la misma movilidad electroforética (electromorfos) (MURPHY *et al.*, 1996). Afortunadamente, estos problemas pueden generalmente resolverse alterando alguna de las variables de la electroforesis, como por ejemplo la composición del tampón, el pH del tampón, la concentración del gel de electroforesis o el método de electroforesis. Por último, existe también el problema de la compartimentación de los enzimas

en diferentes tejidos y organelas. Por ejemplo, el hígado, el corazón o el cerebro pueden presentar diferentes enzimas y actividades enzimáticas (MURPHY y MATSON, 1986).

2.3. Técnicas de análisis de ADN en sistemática molecular

2.3.1. Acontecimientos más relevantes

En los años ochenta la genética molecular empezó a jugar un papel importante en la mayoría de áreas de la biología, incluyendo la sistemática. A partir de los años noventa, y gracias a importantísimos avances tecnológicos y metodológicos, el interés y la aplicación de la biología molecular en la mayoría de campos de la ciencia empezó a crecer de forma exponencial, culminando con la secuenciación del genoma humano por dos grupos científicos independientemente tan sólo 10 años más tarde (LANDER *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2001). Entre los principales avances tecnológicos y metodológicos destacan el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*). Inicialmente puesta a punto para la amplificación de fragmentos de ADN *in vitro* (MULLIS y FALOONA, 1987), enseguida se utilizó para la amplificación de marcadores moleculares tanto nucleares como mitocondriales y de otras organelas, permitiendo el acceso directo a toda la información filogenética contenida en sus genomas. La capacidad de esta técnica de amplificar segmentos concretos de ADN a partir de cantidades ínfimas de tejido fresco, conservado en diversas sustancias (alcohol, DMSO, etc.), seco, congelado e incluso a partir de material subfósil, ha contribuido en gran medida a que esta técnica sea ampliamente utilizada en sistemática molecular y en muchos otros campos de la biología (PALUMBI, 1996).

Paralelamente al auge de la técnica de la PCR, también se realizaron avances importantes en otras áreas muy relacionadas como son el diseño y síntesis de cebadores (*primers*) universales tanto para genes nucleares (HILLIS y DIXON, 1991) como mitocondriales (KOCHER *et al.*, 1989) y en las técnicas de secuenciación de ADN (SCHARF *et al.*, 1986). Si el descubrimiento y desarrollo de la técnica de la PCR (galardonado con el premio Nobel) marcó un hito en la biología molecular, el desarrollo de los primeros secuenciadores automáticos a principios de los noventa facilitaron y aceleraron enormemente la obtención de datos moleculares. Los modelos actuales de secuenciadores automáticos permiten la secuenciación de más de 250.000 pares de bases (pb) en 24 horas; el equivalente a aproximadamente 15 genomas mitocondriales humanos al día. Así pues, en los últimos años, los aspectos técnicos han dejado de ser los limitantes de la sistemática molecular, siendo hoy en día prioritario desarrollar programas informáticos capaces de obtener la máxima información posible de la enorme cantidad de datos moleculares que se están generando (bioinformática). La sofisticación de los métodos de análisis filogenético ha ido incrementándose con el paso del tiempo, maximizándose su eficiencia, consistencia, robustez y falseabilidad; propiedades todas ellas inherentes a cada uno de los diferentes métodos filogenéticos y contrastables en base a simulaciones, filogenias conocidas, análisis estadísticos y estudios de congruencia (HILLIS, 1995; HUELSENBECK, 1995). Aparte de la inferencia filogenética también se han producido avances en el desarrollo de métodos y programas específicos para contrastar hipótesis biogeográficas, ecológicas, de comportamiento, fisiológicas y epidemiológicas entre otras a partir de filogenias existentes (HARVEY *et al.*, 1996).

2.3.2. El ADN como base de la sistemática molecular moderna. Tipos de marcadores moleculares utilizados en herpetología y bases fundamentales

Una de las partes más importantes de cualquier proyecto de sistemática molecular es la elección de los marcadores moleculares adecuados. Dicha elección se basa principalmente en el tipo de datos necesarios para el estudio (cuantitativos o cualitativos), tipo de herencia y tasa de evolución del marcador. En cuanto al tipo de datos, actualmente en herpetología se utilizan las secuencias de ADN como método predilecto para inferir relaciones filogenéticas a todos los niveles taxonómicos, y los análisis de microsátélites (SCHLOTTERER & TAUTZ, 1992) y minisátélites (*DNA fingerprinting*) (JEFFREYS *et al.*, 1985) para estudios más precisos sobre la estructura de poblaciones naturales, de determinación de parentesco, selección sexual, comportamiento reproductor y ecología de poblaciones. Los distintos marcadores moleculares se pueden diferenciar según su origen (nuclear o mitocondrial) y según si codifican proteínas o no.

2.3.2.1. Características del ADN mitocondrial como marcador molecular en sistemática

El ADN mitocondrial se encuentra en las mitocondrias (organelas que se encuentran en el citoplasma de la célula eucariota) y está organizado en forma de una doble hélice circular, que en vertebrados tiene un tamaño aproxima-

do de 16.000 pares de bases. El ADN mitocondrial codifica para diversas proteínas implicadas en el transporte de electrones (citocromo *b*, citocromo oxidasa I, etc.), más de 20 RNAs de transferencia (tRNAs) y dos RNAs ribosómicos (12S rRNA y 16S rRNA). Su replicación es controlada por una zona de aproximadamente 1 kb denominada región controladora (*control region*) o *D-loop*. A diferencia del genoma nuclear, la mayor parte del genoma mitocondrial tiene alguna función, y por tanto los genes mitocondriales no presentan intrones y son muy pocos los ejemplos de presencia de espaciadores, secuencias repetitivas y pseudogenes mitocondriales.

El ADN mitocondrial presenta toda una serie de características que han influido en gran medida a que sea uno de los marcadores moleculares más utilizados en sistemática molecular de reptiles y anfibios a diferentes niveles taxonómicos (GARCÍA-PARÍS y JOCKUSCH, 1999; HARRIS, *et al.*, 1998; ZARDOYA y MEYER, 2001). Generalmente el ADN mitocondrial de vertebrados evoluciona a una tasa bastante elevada. Se ha comprobado que en el caso de algunos mamíferos esta tasa de evolución puede ser entre 5 y 10 veces más rápida que la de genes nucleares de copia única, por lo que el ADN mitocondrial es muy útil para inferir relaciones filogenéticas a nivel de especie e incluso de población. Las mitocondrias suelen encontrarse en el citoplasma en gran número y excepto en casos muy concretos presentan exactamente la misma secuencia en todos los tejidos. Por tanto, en una célula animal existen múltiples genomas mitocondriales todos ellos iguales, por lo que es muy fácil obtener ADN a partir de cantidades muy pequeñas de tejido conservado en alcohol durante muchos años (CARRANZA *et al.*, 2001; CARRANZA *et al.*, 1999) e incluso a partir de material subfósil (AUSTIN y ARNOLD, 2001). Por último, una de las características más importantes del ADN mitocondrial como marcador molecular es que en general se hereda de forma uniparental a través de la línea materna y por tanto es haploide. Es decir, en el momento de la fecundación las únicas mitocondrias que pasaran a formar parte del cigoto son las provenientes del óvulo (DAWID & BLACKLER, 1972). Tanto el tipo de herencia como las características genéticas del genoma mitocondrial son los responsables de la amplia aplicación del ADN mitocondrial como marcador molecular en sistemática. Entre las principales ventajas que esto supone destacan: 1) las diferencias encontradas entre individuos se deben única y exclusivamente a fenómenos de mutación y no son el resultado de recombinación; 2) en una población donde machos y hembras se encuentran en igual proporción el número efectivo de genes mitocondriales estará reducido por cuatro, incrementando el efecto de la deriva génica y la tasa de renovación genética dentro de las poblaciones (AVISE, 1994); 3) este último factor, junto con una elevada tasa de mutación, incrementan el nivel de variabilidad entre poblaciones, eliminando más rápido que los genes nucleares los polimorfismos (alelos) ancestrales existentes a nivel inter e intraespecífico; y 4) la comparación de marcadores genéticos uniparentales (mitocondriales) *versus* biparentales (nucleares) podrá utilizarse para identificar casos de hibridación entre organismos y detectar diferencias en el comportamiento entre los dos sexos.

2.3.2.2. Características del ADN nuclear: marcadores moleculares del tipo microsatélite y minisatélite

En comparación al genoma mitocondrial, el genoma nuclear de las células eucariotas tienen el ADN empaquetado en cromosomas. El genoma nuclear eucariota contiene una cantidad enorme de ADN con valores comprendidos entre los mil y diez mil millones de pares de bases. Una buena proporción del ADN nuclear es del tipo no codificante y por tanto no tiene una función determinada clara. A diferencia de las mitocondrias, las células eucariotas acostumbran a ser diploides (es decir, tienen dos conjuntos de genes, uno proveniente del padre y otro de la madre) y en general, cada progenitor contribuye con aproximadamente la misma cantidad de ADN en la descendencia. En vertebrados, la tasa de evolución de las secuencias nucleares no codificantes es en general más elevada que las codificantes.

Como ejemplo de marcadores nucleares muy utilizados en sistemática molecular de reptiles y anfibios a un bajo nivel taxonómico están los microsatélites y los minisatélites. Los microsatélites representan una alternativa a la electroforesis de enzimas y poco a poco han ido ocupando su lugar como herramienta básica para el estudio de la estructura de poblaciones (BRUFORD y WAYNE, 1993).

Los microsatélites forman parte del ADN repetitivo no codificante y en principio son fragmentos de ADN compuestos por secuencias nucleotídicas cortas (2-5 pb) repetidas en tándem. Un ejemplo de microsatélite muy común es una repetición del dinucleótido CA un número determinado de veces (por ejemplo, cuatro veces: CACACACA). Los diferentes alelos de los microsatélites se diferencian en el número de repeticiones que contienen, las cuales aumentan o disminuyen variando en tamaño entre las 2 y las 50 repeticiones por locus mediante fenómenos moleculares como la mutación y el entrecruzamiento desigual, entre otros. Varias características han hecho de los microsatélites uno de los marcadores favoritos en el estudio de las poblaciones naturales: 1) la posibilidad de amplificarlos utilizando la técnica de la PCR, permitiendo la obtención de información a partir de

cantidades muy pequeñas de ADN e incluso a partir de restos de animales extinguidos (GROOMBRIDGE *et al.*, 2000); 2) la facilidad y precisión con la que se detectan los diferentes alelos utilizando cebadores fluorescentes combinados con técnicas específicas de secuenciación automática (*Genscan*); 3) una elevada tasa de mutación (entre 10^{-2} y 10^{-5} por gameto y por generación), que permite detectar variabilidad incluso en organismos en los cuales no se detectan polimorfismos a nivel aloenzimático (HUGHES y QUELLER, 1993); y 4) su herencia de tipo mendeliana simple, evolución de tipo neutral, y codominancia facilitan enormemente la interpretación de los datos. Algunos ejemplos de la utilización de microsatélites en herpetología incluyen CIOFI y BRUFORD (1998), NEWMAN y SQUIRE (2001).

Los minisatélites representan otro tipo de ADN repetitivo no codificante del genoma nuclear, más conocido bajo las siglas VNTR (*variable number of tandem repeats*) o por su utilización en las técnicas de *DNA-fingerprinting* (SINGH, 1995). Se cree que los minisatélites se originan de la misma manera que los microsatélites pero difieren de estos en que la secuencia básica (*core*) es más larga (hasta 200 pb en vez de 2-5 pb) y en que estas unidades pueden repetirse a lo largo del cromosoma alcanzando longitudes de 30.000 pb. Debido a su elevada tasa de mutación (0,01–0,02 por gameto y por generación) se observan grandes cantidades de alelos, diferenciando organismos incluso dentro de una población. Es justamente esta elevada tasa de mutación ligada a un patrón simple de herencia mendeliana que ha hecho de los minisatélites una herramienta muy importante, aplicada en herpetología básicamente para resolver problemas de paternidad y para analizar la estructura de poblaciones naturales (FINCH y LAMBERT, 1996; GALBRAITH *et al.*, 1995). De todos modos, debido al perfeccionamiento de las técnicas de caracterización y análisis y a la posibilidad de la aplicación de la técnica de la PCR, los microsatélites están substituyendo a los minisatélites en estudios de genética de poblaciones.

2.3.2.3. Genes codificantes de proteínas como marcadores moleculares

Tanto en el núcleo de la célula eucariota como en las mitocondrias, el ADN está organizado en una doble hélice formada por dos cadenas resultado de la combinación de 4 nucleótidos (adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G)) en una secuencia concreta, estabilizada mediante enlaces puente de hidrógeno entre las bases A-T y C-G. El ADN puede tener función codificante (codifica para una proteína) o puede no tener una función determinada o claramente definida (ADN no codificante que comprende los intrones, espaciadores, pseudogenes, etc.). A los fragmentos de ADN codificantes se les conoce con el nombre de genes codificantes de proteínas y están compuestos por una secuencia determinada de nucleótidos que contiene toda la información necesaria para formar una proteína. (primero se transcriben a ARN [ácido ribonucleico] y seguidamente se traducen a proteínas). Aparte de los genes codificantes de proteínas existen otros tipos de genes, como por ejemplo los especificadores de ARN, que sólo se transcriben pero no se traducen (ver más adelante). Todo gen codificante tiene un inicio y un final. En la mayoría de genes codificantes de los eucaritoos, el primer aminoácido acostumbra a ser una metionina y viene codificado en el ADN por la secuencia ATG. A la metionina le siguen una cantidad indeterminada de nucleótidos siempre en múltiplos de 3. Cada grupo de 3 nucleótidos, denominado triplete o codón, determina cada uno de los aminoácidos que forman la proteína codificada. Por ejemplo, si la secuencia de ADN de un gen nuclear de un vertebrado es: ATG CTT CAT CAC CGT; la proteína correspondiente estará formada por la cadena de aminoácidos: Metionina + Leucina + Histidina + Histidina + Arginina (ver <http://psyche.uthct.edu/shaun/SBlack/geneticd.html>). Debido a que un determinado aminoácido puede estar codificado por distintos tripletes, a partir de la secuencia de una proteína será imposible averiguar con certeza la secuencia de ADN. En total existen 64 tripletes posibles que se pueden formar a partir de la combinación de los cuatro tipos de nucleótidos (A, T, C y G). Según el código genético universal, 61 de dichos tripletes codifican para aminoácidos y tres de ellos lo hacen para codones de terminación. Debido a que existen 61 tripletes posibles y tan solo 20 aminoácidos primarios en las proteínas, muchos aminoácidos son codificados por más de un codón. Por esta razón, se considera que el código genético es degenerado. La degeneración del código genético es básica para entender el patrón de evolución de las secuencias codificantes. Los primeros, segundos y terceros nucleótidos de cada triplete se conocen con el nombre de primeras, segundas y terceras posiciones. En general, cambios en las primeras y segundas posiciones génicas casi siempre resultan en un cambio de aminoácido (96% y 100% de los casos respectivamente), mientras que cambios en las terceras posiciones no acostumbran a producir una sustitución aminoacídica (70% de los casos). Dado que los aminoácidos son la estructura básica de las proteínas, un cambio en un aminoácido puede producir un cambio en la carga, peso molecular y estructura de la proteína y por tanto, una pérdida o alteración de su función. Aunque la mutación es el mecanismo principal de la evolución, la mayoría de mutaciones son perjudiciales y por tanto se eliminarán antes de pasar a la siguiente generación (el orga-

nismo portador muere sin dejar descendencia). De ese modo, en genes codificantes se detectan muy pocas mutaciones en las primeras y segundas posiciones de los tripletes, acumulándose la mayor parte de ellas en las terceras posiciones (ver Fig. 2D, E). A los cambios de ADN que se traducen en un cambio de aminoácido se les denomina cambios no sinónimos. A los cambios en el ADN que no producen un cambio de aminoácido se les denomina cambios sinónimos o silenciosos.

2.3.2.4. Genes especificadores de ARN como marcadores moleculares

Las secuencias no codificantes no contienen información para sintetizar proteínas. En sistemática molecular de reptiles y anfibios, de todos los tipos de secuencias no codificantes existentes (intrones, espaciadores, pseudogenes, genes ribosomales, genes de ARN de transferencia, etc.), los genes ribosomales (especialmente los mitocondriales) son los más utilizados para inferir relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos (AUSTIN, 1998; MARS-HALL, 1992; GIRIBET *et al.*, 2001; STEVEN, 1996; VIDAL *et al.*, 2000; ZAJC y ARNTZEN, 1999). Estos comprenden los genes 18S rDNA, 5.8S rDNA y 28S rDNA de origen nuclear y el 12S rDNA, 5S rDNA y 16S rDNA de origen mitocondrial. Los genes ribosomales se transcriben a partir de cadenas de ADN en cadenas de ARN, las cuales pasan posteriormente a formar parte de la estructura de los ribosomas (moléculas formadas por ARN y proteínas que juegan un papel básico en la traducción de ARNs provenientes de genes codificantes de proteínas). Algunas partes de la cadena de ADN de los genes ribosomales pueden variar libremente sin que esto afecte a la función de la molécula, mientras que otras regiones tienen una función crucial y por tanto se mantienen muy similares incluso entre organismos pertenecientes a diferentes órdenes, clases e incluso reinos. En general, las partes de la cadena de ADN que están implicadas en el mantenimiento de la estructura secundaria (*stems*) están mucho más conservadas genéticamente (varían menos) que las partes que no lo están (*loops*). Los *stems* y *loops* están distribuidos de forma diferente en cada uno de los genes ribosomales, por lo que no existe un patrón universal de distribución de *stems* y *loops* a lo largo de la secuencia de ADN, y de hecho sólo se pueden identificar cuando se conoce la estructura secundaria de la molécula. Como se verá más adelante, la información sobre la posición de *stems* y *loops* en un ADN ribosomal es muy útil para establecer homologías entre secuencias de organismos diferentes (alineación de secuencias).

2.3.3. Tipos de cambios nucleotídicos y saturación de las secuencias de ADN

Debido a que sólo existen 4 tipos de nucleótidos, las posibilidades de cambio genético (mutación) son muy reducidas. Es decir, dado un nucleótido determinado como por ejemplo A, éste sólo puede cambiar a T, C ó G (o también puede desaparecer). Los cambios entre nucleótidos de similar naturaleza química, es decir, entre purinas (A y G) o pirimidinas (C y T) reciben el nombre de transiciones, mientras que los cambios entre nucleótidos de diferente naturaleza química (entre purinas y pirimidinas) reciben el nombre de transversiones (Fig. 3). Aunque en general uno esperaría observar el doble de transversiones que de transiciones, estas últimas suelen ser mucho más frecuentes, especialmente en el ADN mitocondrial cuando se realizan comparaciones a bajo nivel taxonómico. Distinguir entre transiciones y transversiones es importante, ya que debido a su elevada tasa de cambio las transiciones de las terceras posiciones de los genes mitocondriales codificantes acostumbran a saturarse bastante rápido. La saturación es un fenómeno que afecta a las secuencias de ADN y que es debida al limitado número de estados posibles de los caracteres moleculares (A, T, C, G). Esta se produce cuando una misma posición nucleotídica ha cambiado más de una vez desde que las dos secuencias se separaron de su ancestro común. Habitualmente, para poder detectar la existencia de saturación en un tipo de sustitución en particular se compara la progresión de dichos cambios en relación a las distancias genéticas entre taxones cada vez más alejados genéticamente. En el ejemplo de la Fig. 2L, M se puede observar claramente como a partir de cierta distancia genética ya no se detectan más sustituciones debido a que los cambios ocurren en posiciones que ya habían cambiado anteriormente y que por tanto ya habían sido contabilizados.

2.3.4. Características y aplicaciones de diversos marcadores nucleares y mitocondriales codificantes y no codificantes en la sistemática de los reptiles y anfibios. Un ejemplo utilizando secuencias de ADN y los lacértidos del género *Gallotia*

Uno de los aspectos más importantes cuando se diseña un estudio de sistemática molecular es la elección de los marcadores moleculares más apropiados. Para ilustrar mejor las diferentes características de alguno de los marcadores descritos anteriormente, se ha utilizado una matriz de datos compuesta por 72 individuos de *Gallotia* incluyen-

do representantes de casi todas las especies y subespecies (con la única excepción de *G. gomerana*), un individuo de *Lacerta lepida* y uno de *Psammodromus hispanicus*, para los que se secuenció un total de 2.381 pb procedentes de 2 genes mitocondriales codificantes (786 pb del citocromo *b* (*Cytb*) y 501 pb de la citocromo oxidasa I (*COI*)), 2 genes mitocondriales no codificantes (392 pb del 12S rRNA y 349 pb del 16S rRNA) y un gen nuclear (353 pb del *c-mos*)

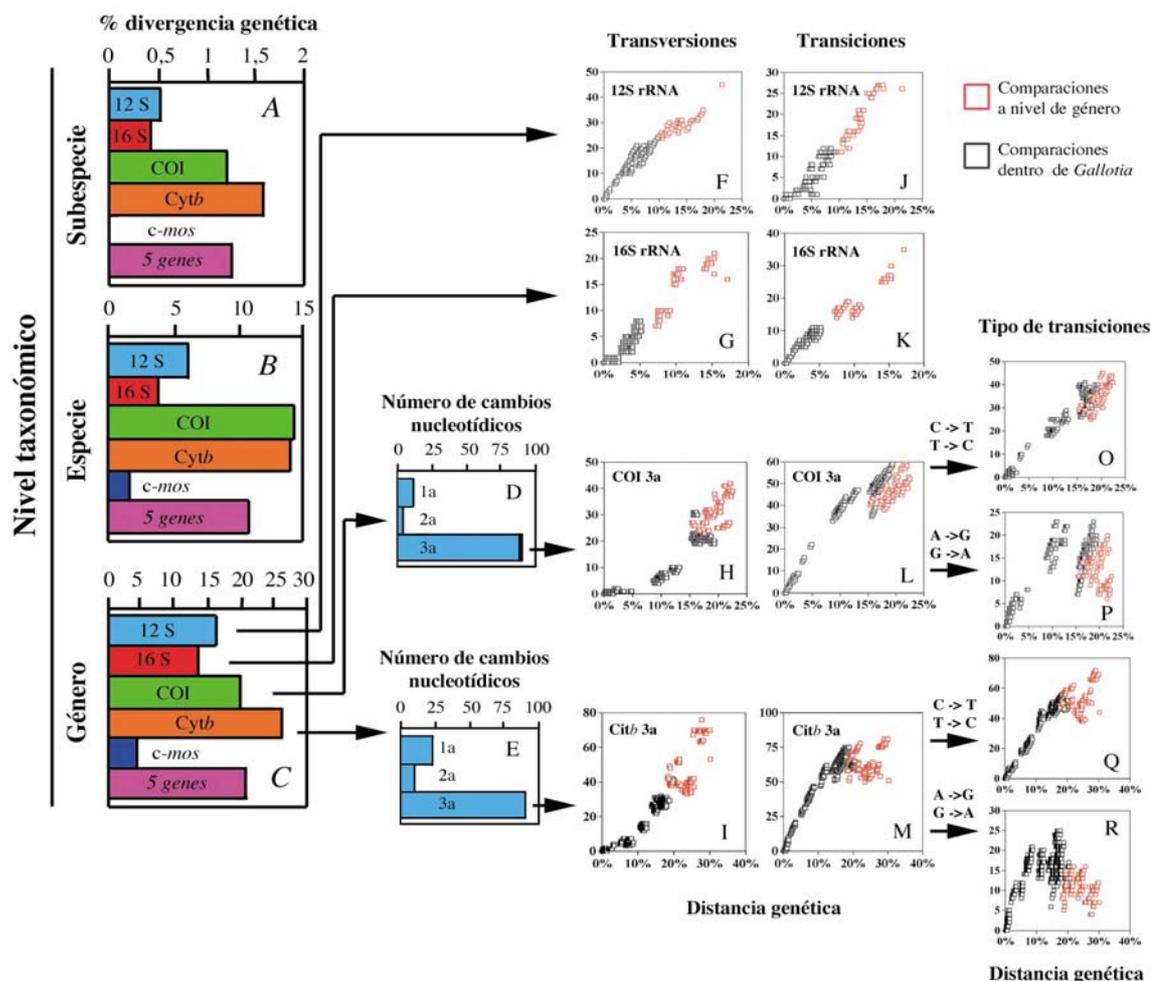


Figura 11. 2. Divergencia genética media de los genes 12S rRNA, 16S rRNA, COI, Cytb y *c-mos* a diferentes niveles taxonómicos: A) comparaciones entre las subespecies de Gallotia; B) comparaciones entre las especies de Gallotia; C) comparaciones entre los géneros *Psammodromus*, *Gallotia* y *Lacerta*. En las comparaciones a nivel de género utilizando los genes mitocondriales codificantes COI y Cytb, se puede observar que la mayor parte de los cambios se acumulan en las terceras posiciones de los codones: D) número de cambios en las primeras (1a), segundas (2a) y terceras (3a) posiciones del COI; E) número de cambios en las primeras (1a), segundas (2a) y terceras (3a) posiciones del Cytb. Del mismo modo, es interesante observar el patrón de acumulación de transiciones y transversiones a medida que aumenta la distancia genética para ver si existe signo de saturación: F) transversiones del 12s rRNA; G) transversiones del 16S rRNA; H) transversiones de las terceras posiciones del COI; I) transversiones de las terceras posiciones del Cytb; J) transiciones del 12S rRNA; K) transiciones del 16S rRNA; L) transiciones de las terceras posiciones del COI (presenta un poco de saturación a partir de distancias genéticas superiores al 15%); M) transiciones de las terceras posiciones del Cytb (presenta saturación a partir de distancias genéticas superiores al 15%). Si se analizan los tipos de transiciones ocurridos en las terceras posiciones tanto del COI como del Cytb se puede observar que son principalmente los cambios del tipo A -> G; G -> A los que están saturados, mientras las transiciones del tipo C -> T/T ->C presentan poca saturación incluso a distancias genéticas superiores al 20%: O) transiciones del tipo C -> T; T ->C en las terceras posiciones del COI; P) transiciones del tipo A -> G; G -> A en las terceras posiciones del COI; Q) transiciones del tipo C -> T; T ->C en las terceras posiciones del Cytb; R) transiciones del tipo A -> G; G -> A en las terceras posiciones del Cytb. En todos los gráficos de saturación el cuadrado rojo indica las comparaciones entre los tres géneros de lacértidos (*Psammodromus*, *Gallotia* y *Lacerta*), mientras que los cuadrados negros representan las comparaciones dentro de *Gallotia*.

[Saint *et al.*, 1998]). Como se ha visto en las secciones anteriores, los diferentes genes mitocondriales y nucleares, codificantes y no codificantes presentan tasas y patrones evolutivos muy diferentes que acotarán su rango de aplicabilidad para resolver problemas en sistemática, biogeografía, ecología, etc. En la Fig. 2A-C se presentan una serie de análisis en los cuales se ha comparado la media de la divergencia genética que presenta cada uno de los marcadores utilizados (12S rRNA, 16S rRNA, COI, *Citb* y *c-mos*) a medida que incrementa el nivel taxonómico del estudio. Como se puede observar, a todos los niveles taxonómicos los 4 genes mitocondriales presentan una mayor divergencia genética media que el gen nuclear codificante (*c-mos*). Un dato interesante es que a nivel de subespecie el *c-mos* presenta una variabilidad del 0%, es decir, si se secuencian y se compara el marcador nuclear *c-mos* de dos individuos pertenecientes a dos subespecies diferentes de la misma especie de *Gallotia*, probablemente estos no se diferenciarán en ninguna de las 353 posiciones nucleotídicas secuenciadas. Este resultado demuestra que el *c-mos* no es un marcador válido a nivel de subespecie en lacértidos. De hecho, incluso a nivel de especie se puede ver que el *c-mos* sigue presentando una variabilidad genética muy baja (1.3%), en comparación con otros marcadores moleculares como el *Citb* (14%), el COI (14.2%), el 12S rRNA (5.8%) y el 16S rRNA (3.47%) (Fig. 2A-C). Dentro de los marcadores mitocondriales, también se pueden observar diferencias considerables entre la variabilidad a nivel subespecífico y específico de *Gallotia* que presentan los genes codificantes respecto a los ribosomales. En ambos casos, los genes codificantes (*Citb* y COI) presentan una variabilidad aproximadamente tres veces superior que la de los genes ribosomales 12S rRNA y 16S rRNA (3.11 a nivel de subespecies y 3.06 a nivel de especies), y por tanto serán mucho más informativos en estudios de sistemática molecular a bajos niveles taxonómicos. Dentro de los genes ribosomales y los genes codificantes mitocondriales también se observan variaciones en el nivel de variabilidad genética según el nivel taxonómico. Es decir, a nivel de subespecie, el 12S rRNA y el 16S rRNA presentan una variabilidad genética muy similar (0.5% respecto a 0.4%), mientras que a nivel de especie el 12S rRNA es 1.6 veces más variable que el 16S rRNA. En el caso de los genes codificantes, se puede observar que mientras el *Citb* presenta una mayor variabilidad que el COI a nivel de subespecie, a nivel de especie los dos se comportan de manera muy similar.

Quizás el cambio más importante se produce cuando se calcula la variabilidad genética entre los tres géneros de lacértidos del estudio (*Lacerta*, *Psammodromus* y *Gallotia*). El resultado (Fig. 2C) indica claramente que incluso a este nivel taxonómico, el gen nuclear *c-mos* presenta una divergencia genética media mucho menor que el resto de genes mitocondriales (4.8 veces menor de media). Un aspecto interesante de las comparaciones a nivel de género es que la diferencia entre los genes mitocondriales codificantes (*Citb* y COI) y los dos genes ribosomales (12S rRNA y 16S rRNA) no es tan elevada como la que existe a niveles específico y subespecífico (1.5 veces a nivel de género *vs* 3 veces a niveles específico y subespecífico). Esta diferencia es debida a los diferentes patrones de acumulación de sustituciones que presentan los diferentes genes mitocondriales. Como se puede ver en la Fig. 2D-E, y debido a las propiedades de los genes codificantes comentadas con anterioridad, la mayor parte de las sustituciones nucleotídicas detectadas se deben a mutaciones en las terceras posiciones de los tripletes, siendo los cambios en las primeras y especialmente las segundas posiciones mucho menos frecuentes. De todos modos, si se analiza el tipo de sustituciones ocurridas en las terceras posiciones del *Citb* y COI, dividiéndolas en transiciones y transversiones, con respecto a las distancias genéticas entre todos los organismos del estudio (Fig. 2H, I, L, M), se observa que en las terceras posiciones tanto del *Citb* como del COI, a partir de una cierta distancia genética ya no se detectan más transiciones, indicando que existe saturación (Fig. 2L-M). Es más, la mayoría de las transiciones detectadas en las comparaciones a nivel de género utilizando el *Citb* y el COI están saturadas (ver Fig. 2L-M, cuadrados rojos). Este dato contrasta con la curva que presentan los dos genes ribosomales 12S rRNA y 16S rRNA, los cuales no presentan ningún símbolo de saturación, ni tan solo en las comparaciones a nivel de género (Fig. 2J-K, cuadrados rojos). Debe destacarse que en ninguno de los casos las transversiones parecen saturadas (Fig. 2F-I), demostrando lo que ya se había comentado anteriormente que, aunque a priori la posibilidad de que se produzca una transversión es dos veces superior a la de una transición (hay dos veces más transversiones que transiciones), éstas últimas acostumbran a acumularse mucho más rápidamente, especialmente en las terceras posiciones de los genes mitocondriales codificantes a niveles taxonómicos bajos. De todos modos, es importante tener en cuenta que existen 4 tipos de transiciones (cambios A -> G, G -> A, T -> C, C -> T) (Fig. 3) y que por tanto puede ser que no todos los cambios presenten el mismo nivel de saturación. En el caso del ejemplo y como se puede ver en la Fig. 2O-R, las transiciones del tipo A -> G, G -> A presentan saturación incluso a un bajo nivel de divergencia genética, mientras que las transiciones del tipo T -> C, C -> T parecen no estar tan saturadas, ni tan solo en las comparaciones a nivel de género. Esto es probablemente debido a la baja proporción de guaninas (G) en las terceras posiciones de los genes codificantes *Citb* (5%) y COI (7.7%).

Conocer todos estos datos sobre qué moléculas se saturan más pronto y qué tipo de saturación presentan (transiciones, transversiones y sus diferentes tipos) es básico y puede servir como criterio para seleccionar entre los dife-

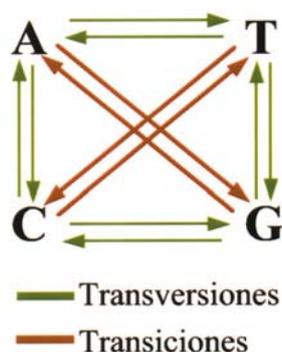


Figura 11. 3. Tipos de transiciones y transversiones posibles entre los 4 nucleótidos. Nótese que el número de transversiones posibles es el doble que el número de transiciones.

rentes modelos evolutivos al alcance del investigador; en el caso de análisis de parsimonia, a utilizar matrices de costos que asignen pesos diferentes a los cambios nucleotídicos; o simplemente eliminar del análisis las posiciones saturadas. La no presencia de saturación de los genes 12S rRNA y 16S rRNA incluso a nivel de género (Fig. 2F, G, J, K), confirma que su aplicación para la resolución de eventos filogenéticos a niveles taxonómicos más elevados es superior a la de los genes mitocondriales codificantes. En el caso del gen nuclear *c-mos*, su reducida tasa de evolución hace que éste no sea apto como marcador molecular para dilucidar las relaciones evolutivas internas del género *Gallotia*. De todos modos, el *c-mos* parece un buen marcador molecular a niveles taxonómicos más elevados en esca-mosos (HARRIS *et al.*, 1999; SAINT *et al.*, 1998).

Otra característica importante de los marcadores moleculares es su grado de utilidad para inferir relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos. En el caso del ejemplo presentado, el nivel taxonómico será intragenérico y por tanto los resultados podrán variar según el nivel taxonómico del estudio (especialmente a niveles superiores). Es decir, marcadores moleculares que funcionan muy bien a nivel de especie pueden no funcionar tan bien a nivel de género e incluso pueden no servir para inferir relaciones filogenéticas a un nivel superior al de familia u orden. En el caso de *Gallotia*, se puede comparar la capacidad que tiene cada uno de los genes de recuperar 7 clados (grupos monofiléticos) distribuidos a diferentes niveles de la filogenia de *Gallotia* muy bien soportados tanto en el presente estudio (incluyendo 72 especímenes y 2.381 pb de 5 genes; ver Fig. 6A), como en estudios anteriores (GONZÁLEZ *et al.*, 1996; Rando *et al.*, 1997). Los 7 clados considerados correctos son: 1.- *Gallotia*; 2.- *G. atlantica*; 3.- *G. galloti* + *G. caesaris* + *G. simonyi* + *G. intermedia*; 4.- *G. intermedia* + *G. simonyi*; 5.- *G. galloti* + *G. caesaris*; 6.- *G. galloti*; y 7.- *G. caesaris*. En el caso de que un clado esté soportado en el análisis filogenético (utilizando el método de la mínima evolución), se computa el valor de *bootstrap* para dicho nodo y de ese modo, sumando todos los valores de *bootstrap* para cada uno de los 7 clados y dividiendo por el número total de clados, se consigue una medida del nivel de robustez con el que cada uno de los genes recupera las relaciones filogenéticas aceptadas como reales (CUNNINGHAM, 1997a, b). Debido a que la secuencia del *Citb* es más larga que la del resto de genes, en estos análisis sólo se utilizaron los primeros 390 pb del *Citb* (los más utilizados en análisis filogenéticos en reptiles y anfibios) para que tuviese una longitud similar a todo el resto de genes. Los resultados presentados en la Tabla 11. 1 demuestran claramente que los dos genes mitocondriales codificados son los mejores para inferir las relaciones filogenéticas del género *Gallotia* y que a pesar de su bajo nivel de variabilidad, el *c-mos* recupera con bastante robustez los 7 grupos que se han asumido monofiléticos (mucho mejor que el 16S rRNA que falla en recuperar 3 del los 7 clados). Los resultados también demuestran que las mejores combinaciones de 2-3 genes para resolver la filogenia de *Gallotia* son las formadas por *Citb* + COI (98.7%), *Citb* + 12S rRNA (97%) y *Citb* + COI + 12S rRNA (99.4%), y por este motivo combinaciones de estos tres genes han sido las preferidas en otros estudios de reptiles a niveles taxonómicos similares (CARRANZA *et al.*, 2000, 2001). Para información sobre la aplicabilidad de los diferentes genes mitocondriales y nucleares para resolver filogenias a un elevado nivel taxonómico véase SPRINGER *et al.* (2001) y ZARDOYA y MEYER (1996).

2.4. Inferencia filogenética a partir de secuencias de ADN

La inferencia filogenética a partir de secuencias de ADN es una forma de inferir las relaciones evolutivas entre organismos. Otras posibilidades incluyen la utilización de datos morfológicos, y otros marcadores moleculares dife-

Tabla 11. 1. Nivel de robustez con el que los diferentes marcadores moleculares y combinaciones de ellos recuperan los 7 clados de *Gallotia* considerados correctos.

<i>Marcadores moleculares</i>	<i>Nivel de robustez (%)</i>	<i>Marcadores moleculares</i>	<i>Nivel de robustez (%)</i>
<i>Citb</i>	96.8	COI + 16S rRNA	93.1
COI	92.1	COI + 12S rRNA	94.2
12S rRNA	79.8	16S rRNA + <i>c-mos</i>	61.1
16S rRNA	44.0	12S rRNA + <i>c-mos</i>	78.0
<i>c-mos</i>	58.0	12S rRNA + 16S rRNA	77.8
<i>Citb</i> + <i>c-mos</i>	92.2	16S + COI + <i>Citb</i>	98.7
<i>Citb</i> + COI	98.7	12S + COI + <i>Citb</i>	99.4
<i>Citb</i> + 16S rRNA	90.4	12S + 16S + COI + <i>Citb</i>	99.4
<i>Citb</i> + 12S rRNA	97.0	12S + 16S + COI + <i>Citb</i> + <i>c-mos</i>	99.7
COI + <i>c-mos</i>	95.5		

rentes de las secuencias de ADN (aminoácidos, microsátelites, aloenzimas, etc.). Aunque la metodología es muy parecida, el tipo de datos y por tanto la definición y codificación de los caracteres, las asunciones y modelos utilizados son diferentes en cada caso, especialmente en morfología. Buenos ejemplos de cómo realizar un estudio filogenético utilizando datos morfológicos y la metodología cladista pueden encontrarse en ARNEDO, (1999) y KITCHING *et al.* (1998), y utilizando todo tipo de datos moleculares en HILLIS *et al.* (1996).

Dado un conjunto de secuencias de ADN, en general el proceso de análisis filogenético comprende cuatro pasos básicos que normalmente se ejecutan en el siguiente orden: 1) alineación de las secuencias, 2) determinación del modelo evolutivo, 3) inferencia del árbol filogenético, y 4) evaluación de la robustez de los diferentes grupos. Debe tenerse en cuenta por eso que recientemente se han desarrollado métodos de inferencia filogenética que permiten integrar los pasos 1-3 en un único proceso (WHEELER 1996).

2.4.1. Alineación de secuencias

La alineación de secuencias no es sólo el primer paso dentro del proceso de inferencia filogenética, sino que además es uno de los más importantes ya que implica el establecimiento de homologías entre los distintos nucleótidos. En el caso que se utilicen genes codificantes, especialmente en estudios a bajo nivel taxonómico, las secuencias acostumbra a tener la misma longitud, y por tanto las homologías entre los diferentes nucleótidos se pueden establecer de una forma inambigua. En los casos en los que se utilicen secuencias no codificantes, como por ejemplo los genes ribosomales mitocondriales 12S rRNA y 16S rRNA, las secuencias de los diferentes taxones no siguen un patrón de tripletes como en el caso de las secuencias codificantes, y por tanto el establecimiento de homologías puede ser más complicado. Tanto si tienen la misma longitud como si no, cuando se trata de secuencias no codificantes existe la posibilidad que se hayan producido fenómenos de inserción y deleción entre las distintas secuencias. En estos casos, el proceso de alineación se basará en reconocer las posiciones donde se han producido dichas mutaciones e incorporar guiones (*gaps*) con el objetivo de conservar la homología posicional. Desde un punto de vista gráfico, los *gaps* suelen representarse con el símbolo “-” en las alineaciones e indican que en dicha posición se ha producido un fenómeno *indel* (inserción o deleción).

Las alineaciones pueden llevarse a cabo de forma manual o automática. En el caso de la alineación manual, lo que se intenta es reconocer visualmente regiones conservadas dentro de las secuencias y minimizar la inserción de *gaps*. Una técnica muy utilizada cuando se realizan alineaciones manuales de genes no codificantes como por ejemplo los ARN ribosomales es la de incorporar la información proveniente de la estructura secundaria de dichas moléculas. En el caso del gen ribosomal 12S rRNA, y a partir de la estructura secundaria conocida (HICKSON *et al.*, 1996) se pueden identificar fácilmente las zonas complementarias implicadas en el mantenimiento de la estructura secundaria

(*stems*) de las regiones de cadena sencilla no implicadas en el mantenimiento de la estructura (*loops*). En general, y debido a su falta de función estructural, la mayoría de mutaciones (*indel*) se acumulan en los *loops* dificultando su alineación (Fig. 4A-B). Cuando el número de mutaciones ocurridas en un fragmento de ADN son muy elevadas, el establecimiento de homología puede resultar ambiguo y por tanto algunos autores recomiendan excluir dichas regiones hipervariables (*loops*) de los análisis filogenéticos (SWOFFORD *et al.*, 1996).

En las alineaciones automáticas se utilizan algoritmos matemáticos que tienen en cuenta diversos parámetros, como por ejemplo el costo de introducir un *gap*, tasas de transiciones respecto a las transversiones, etc., y se selecciona la alineación que optimice el criterio seleccionado. Algunos de estos programas de alineación múltiple alinean en base a un criterio filogenético explícito (“árbol guía”) inferido al principio del proceso (por ej. CLUSTAL, PileUp y MALIGN). En otros programas, la alineación de las secuencias forma parte del propio proceso optimizando simultáneamente la alineación y un árbol filogenético (por ej. POY). A no ser que las relaciones filogenéticas sean conocidas de antemano, no existe una forma clara de determinar qué tipo de alineación es la mejor y por tanto no hay manera de aconsejar sobre que método debería utilizarse. La alineación manual es criticada básicamente por su falta de objetividad y repetitividad, mientras que los criterios computacionales por la subjetividad en la asignación de valores a los diferentes parámetros tales como la penalización por la adición de *gaps*, coste de la sustitución entre los diferentes tipos de nucleótidos, etc.

A

Especie	Stem 45	Loop	Stem 45'
<i>Tarentola boettgeri bischoffi</i>	5' TTCTG	ACAAA	CAGAA 3'
<i>Tarentola americana</i>	5' TTCTA	CCACAA	TAGAA 3'
<i>Hemidactylus flaviviridis</i>	5' TCCTG	CTTCC	CAGGA 3'
<i>Hemidactylus karenorum</i>	5' TTCTA	CCC	TAGAA 3'
<i>Hemidactylus mabouia</i>	5' TTCTA	ACT	TAGAC 3'

B

Estructura secundaria de la zona de los
stems 45 y 45' de *T. b. bischoffi*

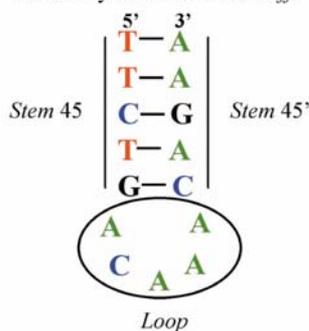


Figura 11. 4. A) Ejemplo de alineación de la secuencia del gen mitocondrial 12S rRNA de cinco especies diferentes de geos en base a su estructura secundaria (Hickson *et al.*, 1996). B) Representación de la estructura secundaria de la región de los stems 45 – 45' de *T. b. bischoffi*. Debido a la imposibilidad de alinear la región del loop, ésta no se incluiría en los análisis filogenéticos.

2.4.2. Determinación del modelo de sustitución y matrices de costos

Dado que sólo existen cuatro tipos de nucleótidos (A, T, C, G), cuando la distancia genética es lo suficientemente grande normalmente se infraestima el número de cambios que han ocurrido debido a que muchas posiciones han variado más de una vez (*multiple hits*). Los modelos de sustitución fueron desarrollados justamente para corregir las distancias observadas, estimando los cambios evolutivos que no han sido contados. Los diferentes modelos evolutivos difieren principalmente en el número de parámetros que incluyen. Entre los parámetros que acostumbran a variarse se incluyen: 1) la probabilidad de cambio entre los distintos nucleótidos. Esta tiene un único parámetro en los modelos más sencillos (*Jukes-Cantor*); dos parámetros en los modelos medianamente complejos, permitiendo acomodar diferencias entre transiciones y transversiones (por ej. *Kimura 2-parameters* y *HKY85*) y seis parámetros (uno para cada clase de cambio nucleotídico) en los modelos más complejos como el *General Reversible Time Model (REV)*; 2) la frecuencia de cada uno de los nucleótidos. La proporción de A, T, C y G variará según el gen y el organismo. Por ejemplo, en *Gallotia*, la proporción de cada uno de los nucleótidos del gen mitocondrial ribosomal 12S rRNA es: A = 33.8%, T = 22.9%, C = 23.9%, G = 19.4%; mientras que en el *citb* es: A = 28%, T = 27.1%, C = 31.6%, G = 13.3%; 3) variación en la tasa de sustitución entre las diferentes regiones de la molécula y 4) proporción de sitios invariables dentro de las moléculas.

Ante tantos modelos a nuestro alcance el dilema que se nos plantea es el siguiente: ¿Cuál es el modelo evolutivo más apropiado para analizar nuestros datos? Una manera de seleccionar el más apropiado es mediante un test de máxima verosimilitud. Es decir, dado un árbol que acostumbra a estimarse a partir de la matriz de datos utilizando un modelo sencillo (por ejemplo, *Jukes-Cantor*), se calcula la verosimilitud de dicha topología utilizando el máximo número de modelos evolutivos posibles. Al final del proceso, los valores de verosimilitud (*likelihood*) calculados a partir de cada uno de los modelos se comparan dos a dos en sentido de complejidad creciente (es decir, del menos complejo al más complejo) mediante la utilización del *likelihood ratio test (LRT)*. El LRT proporciona un criterio para decidir la complejidad del modelo y cuántos parámetros se analizan, mediante una comparación de modelos relacionados jerárquicamente. Cuando el modelo más complejo es significativamente más versátil que el menos complejo, se escoge, y se prosigue con el test hasta que la adición de complejidad o parámetros no incrementa la verosimilitud de una forma estadísticamente significativa. Modeltest v. 3.06 (POSADA y CRANDALL, 1998) es un programa informático que permite comparar entre 56 modelos diferentes y escoger el que mejor explica los datos.

En principio, los análisis de parsimonia no utiliza modelos evolutivos explícitos y por tanto, por defecto se considera que todos los cambios tienen igual probabilidad. De todos modos también permiten acomodar diferencias entre los tipos de cambios y se implementan utilizando diferentes matrices de costos o pesos implícitos. Mediante matrices de costos puede dársele diferente peso a las transiciones y las transversiones, eliminar las transiciones de los análisis (parsimonia de transversiones) e incluso asignar diferentes valores a cada uno de los 12 tipos posibles de cambios (parsimonia de 12 parámetros, 4 transiciones y 8 transversiones) (KITCHING *et al.*, 1998), lo que se denomina parsimonia de Sankoff.

2.4.3. Métodos de inferencia filogenética

Los diferentes métodos de inferencia filogenética se pueden dividir en dos grupos: los basados en matrices de distancias y los basados en caracteres. Los métodos de distancias utilizan una matriz de distancias calculada a partir de la matriz de datos (alineación) y utilizando un modelo evolutivo previamente determinado para inferir las relaciones filogenéticas. Los métodos basados en caracteres calculan los árboles filogenéticos que optimizan los patrones de distribución de cada uno de los caracteres en base a un criterio determinado.

2.4.3.1. Métodos de distancias

Los métodos de distancias utilizan el valor de la disimilaridad entre dos secuencias para derivar los árboles filogenéticos. En teoría, los métodos de distancias recuperarán el árbol filogenético real si todos los procesos de divergencia han quedado registrados de forma concisa en las secuencias (SWOFFORD *et al.*, 1996), es decir, en ausencia de homoplasia. Sin embargo, la realidad es diferente y normalmente, a partir de una distancia determinada, las secuencias se saturan y por tanto deben utilizarse modelos evolutivos (ver más arriba) para corregir las estimaciones de las distancias observadas en función de la homoplasia, existente. Una vez calculadas, las matrices de distancias se utilizan para inferir las relaciones filogenéticas las cuales pueden llevarse a cabo mediante la utilización de métodos algorítmicos o métodos de optimización. El método algorítmico más utilizado es el de *Neighbor joining* (SAITOU y NEI, 1987) y se basa en la utilización de un protocolo determinado para unir los taxones en función de sus distancias

genéticas. El método de la mínima evolución es el más utilizado de todos los que emplean un criterio de optimización para evaluar las diferentes topologías (RZHETSKY y NEI, 1992).

2.4.3.2. Métodos basados en el análisis de caracteres, parsimonia y máxima verosimilitud

Estos métodos utilizan la información proveniente de las alineaciones durante todo el proceso de inferencia filogenética, siendo los más utilizados la parsimonia (también denominada a veces máxima parsimonia (MP)) y la máxima verosimilitud (ML, del inglés *maximum likelihood*). El criterio de la parsimonia se basa en que la mejor explicación de los datos es la más simple, es decir la que requiere menos asunciones *ad hoc*, y se basa en el principio de congruencia. En términos prácticos, los métodos de parsimonia intentan seleccionar el árbol más corto o más parsimonioso, el cual a su vez será el que requiera menos pasos para explicar la matriz de datos y por tanto el menos homoplásico. La implementación del método de parsimonia es bastante sencilla ya que se basa en optimizar sobre un árbol todos y cada uno de los caracteres de la matriz de datos, reconstruyendo sus estados ancestrales y contando el número de pasos del carácter a lo largo de las diferentes ramas del árbol filogenético. Este proceso se repite para cada uno de los caracteres de la matriz de datos. La suma de los pasos de cada uno de los caracteres de la matriz representa la longitud total del árbol. Finalmente, para “todos” los posibles árboles filogenéticos (ver más abajo), se selecciona el/los que requiera/n el menor número de pasos.

El principio del método de ML se basa en obtener el árbol filogenético que presenta la verosimilitud más alta de producir los datos observados (alineación). La verosimilitud se calcula en base a la probabilidad que el patrón de variación observado en una posición determinada de la alineación haya sido producido, teniendo en cuenta un proceso de sustitución definido (modelo evolutivo) y un árbol filogenético determinado. Las verosimilitudes de cada una de las posiciones de la alineación se multiplican para obtener la verosimilitud global del árbol filogenético (la probabilidad de obtener los datos a partir de un árbol y un modelo evolutivo). Este proceso se repite para “todos” (ver más abajo) los posibles árboles y de ellos se escoge el/los que presente/n un valor de verosimilitud más elevado. Si los datos no tienen señal filogenética, esperaremos que árboles escogidos al azar tengan verosimilitudes similares. De la misma manera, el modelo evolutivo tiene que optimizarse para ajustarse lo mejor posible a los datos observados. Por ejemplo, si los datos presentan en general una proporción muy elevada de algún tipo de base nucleotídica (por ej. A y T), la verosimilitud de un árbol determinado calculada utilizando un modelo evolutivo que asuma igual frecuencia entre las cuatro bases nucleotídicas (por ej. *Jukes-Cantor* o Kimura 2-parámetros), será más bajo que uno que contemple posibles variaciones en dichas frecuencias. De ese modo, el árbol filogenético que presenta la máxima verosimilitud bajo un modelo evolutivo puede disminuir su verosimilitud si el modelo es distinto e incluso dejar de ser el de “máxima verosimilitud”. Por esta razón es básico obtener siempre el modelo evolutivo que mejor se ajuste a nuestros datos (POSADA y CRANDALL, 1998, 2001).

2.4.4. Construcción y evaluación de árboles filogenéticos

Cuando se utilizan métodos como la MP y el ML que incorporan un criterio de optimalidad (en el caso de la MP será el árbol con el menor número de pasos y en el de ML el árbol con la máxima verosimilitud), el proceso de hallar el mejor árbol comporta la construcción de los árboles y su evaluación. El número de árboles filogenéticos posibles incrementa exponencialmente con el número de taxones incluidos en el análisis, pasando de 3 posibles árboles enraizados para 3 taxones (o secuencias) a más de 34 millones para tan solo 10 taxones (FELSENSTEIN 1978). Debido a limitaciones de tipo computacional es imposible evaluar todos los árboles posibles para tan sólo unas pocas decenas de taxones y por tanto se explora solamente una fracción de ellos. La exploración de los diferentes árboles implica su construcción y su evaluación, por lo que el número máximo de árboles que podremos explorar vendrá influenciado por el número de taxones del análisis, el criterio de optimalidad aplicado, los algoritmos heurísticos implementados, la complejidad de los modelos y el poder de computación. Por ejemplo, la MP es un método mucho más rápido que el ML porque no requiere cálculos de longitud de las ramas. De la misma manera, dentro de cada uno de los criterios de optimalidad la velocidad de computación dependerá de la complejidad de los modelos de matrices de costos utilizados. Si los datos no tienen estructura filogenética o si hay mucha homoplasia, el número de árboles subóptimos que tendrán que ser evaluados será mucho mayor, incrementando el tiempo de búsqueda.

Existen varios métodos de búsqueda de árboles que se diferencian según el algoritmo que utilizan. Dos de ellos (*branch-and-bound* y exhaustivo) son los únicos que garantizan encontrar el árbol óptimo, pero en general no son aplicables a matrices de datos de más de 20 taxones/secuencias (SWOFFORD *et al.*, 1996). El método exhaustivo evalúa cada uno de los posibles árboles de acuerdo al criterio de optimalidad escogido mientras que el *branch-and-bound* utiliza un método lógico para decidir qué árboles deben evaluarse y cuáles pueden descartarse directamente.

El método de *branch-and-bound* es por tanto mucho más rápido que el exhaustivo. Sin embargo, en la mayoría de los análisis se utiliza lo que se denomina métodos heurísticos. Los algoritmos para búsquedas heurísticas se basan en dos procesos que son: 1) la construcción de un árbol inicial y 2) la modificación de dicho árbol intercambiando el orden de sus ramas con el objetivo de encontrar topologías más cortas. Los diferentes algoritmos de reordenación comúnmente aplicados (conocidos por las siglas SPR y TBR) se diferencian por el tipo de reordenaciones a partir de un árbol original que pueden ser generadas y por tanto evaluadas. De los dos métodos, el TBR (*tree bisection and reconnection*) es el más utilizado, pero debido a que las reordenaciones son las más exhaustivas de los dos, éste es también más costoso desde un punto de vista computacional.

2.4.5. Grado de soporte de las agrupaciones e hipótesis obtenidas

Existen diferentes métodos para evaluar la robustez de los clados recuperados en un análisis filogenético (*bootstrap*, *Bremer support*, *jackknife* y *parametric bootstrapping*) y entre ellos el más comúnmente utilizado es el de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). El proceso del análisis de *bootstrap* puede dividirse en tres partes: 1) generación de nuevas matrices de datos (normalmente se generan entre 100 y 1.000 matrices diferentes) por muestreo con reemplazamiento; con lo cual puede ser que algunas matrices sean iguales a la original y otras sean diferentes debido a que algunas posiciones determinadas de la alineación estén repetidas varias veces y otras ninguna.; 2) cálculo del árbol filogenético (por ej. el más parsimonioso para el método de MP, el que tenga la verosimilitud más alta en ML, o el inferido a partir de las distancias genéticas) derivado de cada una de las matrices generadas; y 3) comparación respecto al número total de matrices generadas, la proporción de veces que el grupo en el cual estamos interesados está representado. El valor de *bootstrap* se expresa normalmente en tanto por ciento.

2.4.6. Conceptos básicos sobre árboles filogenéticos

El árbol filogenético es una representación del patrón de las relaciones filogenéticas que intentamos estimar (Fig. 5A). El árbol consiste en nodos los cuales están conectados por ramas o internodos. Dentro de los nodos se distinguen dos tipos, los nodos terminales que representan las secuencias genéticas u organismos objeto de estudio y los nodos internos que representan los ancestros hipotéticos. El ancestro de todas las secuencias/organismos que componen el árbol se denomina raíz (*root*). Si el árbol carece de raíz se denomina árbol sin enraizar (*unrooted tree*), y su característica principal es la falta de direccionalidad evolutiva. Es decir, no se puede saber cuáles de los nodos son antepasados y cuáles descendientes. Para evitar confusiones, muchas veces los árboles sin enraizar se representan en forma de red. Los nodos y las ramas de un árbol pueden tener diferentes tipos de información. Por ejemplo, métodos como la MP reconstruyen para cada posición de la alineación los caracteres de cada uno de los hipotéticos nodos ancestrales. La mayoría de los métodos también pueden estimar la cantidad de evolución que ha tenido lugar en las ramas del árbol filogenético. Ésta se refleja en árboles aditivos no ultramétricos, donde las longitudes de las diferentes ramas son proporcionales a la cantidad de evolución que ha tenido lugar en dichas ramas (a diferencia de los árboles ultramétricos, donde los dos descendientes son equidistantes de su ancestro). Si de todos los nodos de un árbol filogenético sólo parten dos ramas, el árbol se dice que está totalmente resuelto. Si por el contrario, de algún nodo del árbol parten más de dos ramas entonces se considera que ese nodo representa una politomía y que por tanto el árbol está parcialmente resuelto (Fig. 5A). Las politomías pueden ser de dos tipos, duras (cuando son el resultado de varios linajes divergiendo al mismo tiempo y por tanto no hay evidencia suficiente para reconstruir el orden exacto de separación) y blandas (cuando en realidad los linajes no tienen porqué haber divergido al mismo tiempo, pero se desconoce el orden de divergencia). En principio uno esperaría resolver una politomía blanda mediante la adición de nueva evidencia, mientras que por definición una politomía dura no se puede resolver.

2.4.7. Conceptos básicos sobre caracteres y agrupaciones filogenéticas

Dado un árbol filogenético y una matriz de datos, es posible distinguir entre estados de caracteres homólogos u homologías (caracteres idénticos compartidos entre linajes y heredados a partir de una relación ancestro-descendiente) de las homoplasias (estados de caracteres idénticos adquiridos en dos linajes de forma independiente) (Fig. 5B). Dentro de las homologías se diferencian dos tipos de estados de carácter: ancestral o plesiomórfico y derivado o apomórfico. Si un representante de un clado determinado (un grupo monofilético) tiene el mismo estado de carácter (en el caso de las secuencias de ADN los diferentes estados de carácter son las cuatro bases nucleotídicas, A, T, C y G) que el ancestro del grupo, entonces se dice que dicho estado de carácter es plesiomórfico y por tanto representa una plesiomorfía. Si por el contrario, el carácter es diferente al del ancestro del grupo éste se denominará carácter apomórfico o apomorfía.

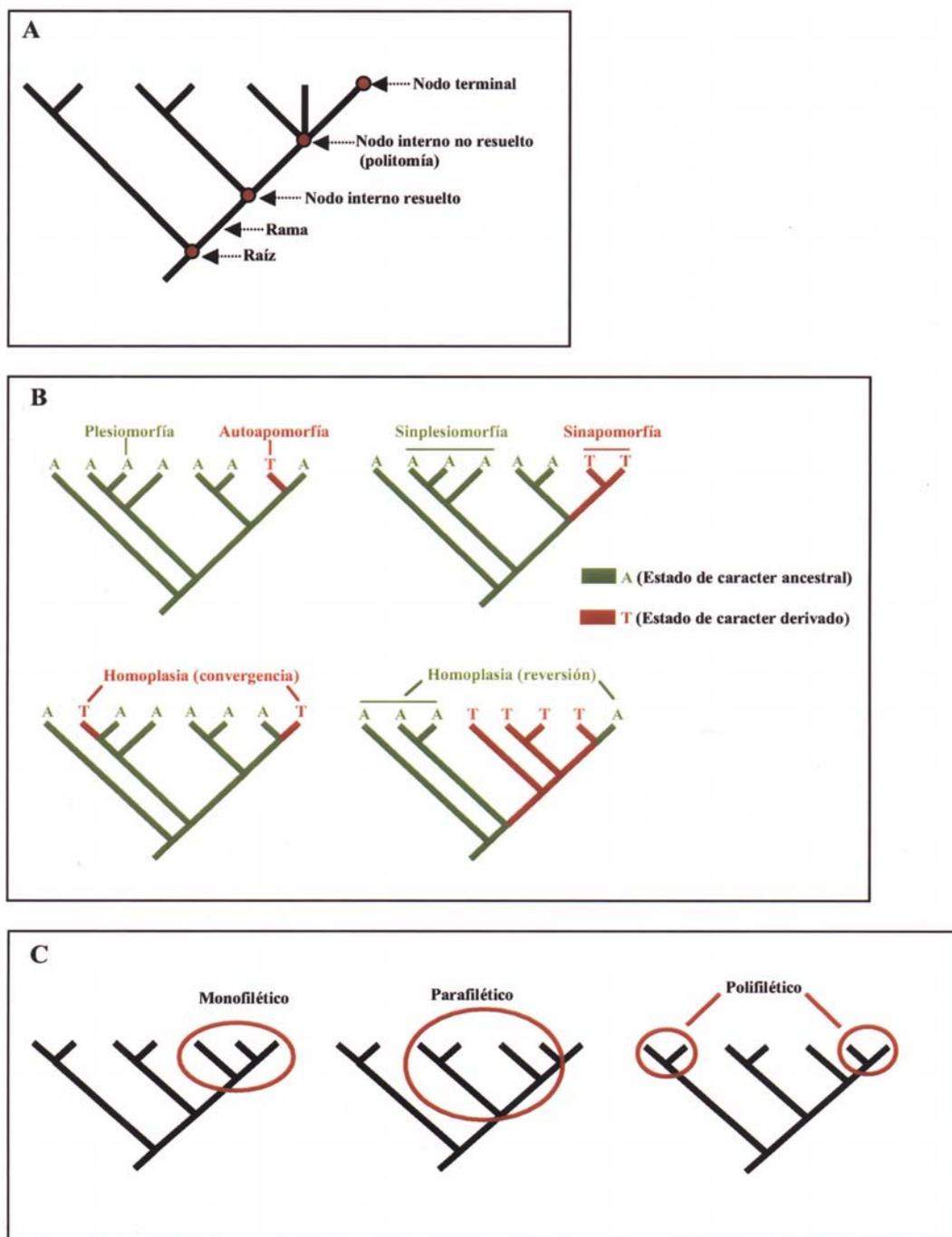


Figura 11.5. A) Diferentes partes de un árbol filogenético. B) Diferentes tipos de homologías y homoplasias en función del estado de carácter (ancestral o derivado) que presenten. En el caso del ejemplo, el carácter sería por tanto la posición del alineamiento de la secuencia de ADN y los diferentes estados de carácter los nucleótidos (A y T). Nótese que en el ejemplo, A siempre representa el estado ancestral y T el derivado. C) Interpretación de los diferentes tipos de grupos (monofilético, parafilético y polifilético) en función de la topología del árbol filogenético.

Existen dos tipos de apomorfías: las autapomorfías (estados de carácter derivados únicos) y las sinapomorfías (estados de carácter derivados compartidos). A los estados de carácter ancestrales compartidos se les denomina simplesiomorfías (Fig. 5B). Las homoplasias a su vez se diferencian en tres tipos: convergencias, paralelismos y reversiones (Fig. 5B). En el caso de las convergencias y paralelismos los dos tienen como resultado la evolución del mismo estado de carácter

en dos organismos/secuencias no relacionadas, la diferencia es que las convergencias evolucionan a partir de una condición ancestral diferente y los paralelismos evolucionan a partir de una misma condición ancestral.

Las filogenias constituyen la base de la clasificación, es decir de la asignación de nombres a los diferentes grupos taxonómicos. Según la clasificación cladista los únicos grupos válidos son los que vienen definidos en base a estados de carácter derivados compartidos (sinapomorfías). Es decir, un conjunto de taxones que comparten una apomorfía constituyen un grupo monofilético; un conjunto de taxones con una plesiomorfía común (es decir una simplesiomorfía) forma un grupo denominado parafilético; finalmente, un conjunto de taxones agrupados en base a una analogía (homoplasia o carácter homoplásico) forma lo que se denomina un grupo polifilético. A efectos prácticos, los grupos monofiléticos, parafiléticos y polifiléticos pueden reconocerse fácilmente a partir de la topología del árbol filogenético. Es decir, en base a una filogenia, un grupo monofilético es aquella agrupación de taxones que comparten un ancestro común y que incluye todos los descendientes de dicho ancestro; un grupo parafilético es aquella agrupación de taxones que comparten un ancestro común pero que no incluye todos los descendientes de dicho ancestro; por último, un grupo polifilético es aquel que no incluye el ancestro común de todos sus miembros (Fig. 5C).

3. Aplicaciones de las técnicas de biología molecular al estudio de la biogeografía de los Reptiles y Anfibios: los lacértidos del género *Gallotia* como ejemplo

En el campo de la biogeografía, la aplicación de las técnicas moleculares permitió añadir una nueva dimensión (tiempo) al eterno e irresoluble debate sobre cuál de los dos procesos, vicarianza (*vicariance biogeography*) o dispersión (*dispersal biogeography*) era el más apropiado para explicar patrones biogeográficos. Bajo el criterio de vicarianza, las relaciones filogenéticas entre los miembros de un grupo de organismos que presentan una distribución disjunta coinciden con la historia y acontecimientos geológicos de las regiones que ocupan, atribuyéndose los diferentes patrones filogenéticos observados principalmente a la formación de barreras geofísicas, como por ejemplo la formación de montañas, ríos, etc. Es decir, la vicarianza predice que el cladograma de un grupo de especies ha de coincidir con el cladograma de áreas de las regiones que ocupan. La vicarianza fue principalmente impulsada por el creciente auge de la metodología cladista a principios de los años ochenta, la cual la dotó de herramientas analíticas que le permitieron establecer un procedimiento formalizado de corroboración y refutación de hipótesis (HUMPHRIES, 1986; NELSON y PLATNICK, 1981). Hasta ese momento, la dispersión había sido considerada el principal mecanismo para explicar los patrones biogeográficos de los seres vivos (DARLINGTON, 1957, 1965). Los partidarios de la vicarianza defendieron la superioridad de su método argumentando que debido a la imposibilidad de ser contrastada, la dispersión no era una hipótesis científica válida. El debate continuó hasta que a principios de los noventa la aplicación de métodos moleculares en biogeografía (especialmente la aplicación de la teoría del reloj molecular para inferir las edades en los diferentes nodos de una filogenia molecular), proporcionó una metodología válida para contrastar los diferentes patrones biogeográficos en base a la estructura del árbol filogenético y distancias genéticas, demostrando que muchos de los patrones biogeográficos deducidos a partir de patrones de vicarianza eran incorrectos (AVISE, 1994, 2000; HEDGES *et al.*, 1992; RAXWORTHY *et al.*, 2002). En definitiva, las técnicas moleculares han servido para demostrar de una forma definitiva que los organismos pueden jugar un papel importante y activo en la determinación de su patrón biogeográfico, en algunos casos dispersando largas distancias a través de barreras geográficas considerables (CARRANZA *et al.*, 2000; HEWITT, 2000; LISTON *et al.*, 1989). El hecho de aceptar la dispersión como un proceso más e incluir una escala temporal en los análisis filogenéticos, ha permitido dar una nueva dimensión a la biogeografía combinando conceptos de vicarianza, dispersión y extinción (RONQUIST, 1997).

En la mayoría de casos, la filogenia constituye el patrón a partir del cual se infieren los diferentes procesos biogeográficos. Por tanto, si la filogenia es errónea o imprecisa en algunos puntos, los procesos que se deduzcan de la misma serán igualmente incorrectos o imprecisos. Otro aspecto importante es diferenciar entre los procesos deducidos a partir de la filogenia y los inferidos a partir de información adicional no filogenética. Para ilustrar de una manera sencilla como se puede utilizar la información filogenética en biogeografía, y la importancia de diferenciar entre la información derivada a partir del árbol filogenético de la derivada de evidencias empíricas adicionales, se ha utilizado de nuevo el ejemplo de *Gallotia* de las Islas Canarias. En la Fig. 6A se representa simplíficadamente el resultado del análisis filogenético realizado a partir de la secuenciación de 5 marcadores moleculares (*Citb*, *COI*, *12S rRNA*, *16S rRNA* y *c-mos*) de 74 individuos. El primer paso del análisis consistirá en definir las áreas biogeográficas. En el caso de este ejemplo, y para simplificar los análisis, se han definido tan sólo 4 áreas biogeográficas, el área continental (*Psammodromus*, *Lacerta*), y 3 áreas en las Islas Canarias seleccionadas en base a los 3 linajes más diver-

gentes de *Gallotia* que allá habitan: 1) islas orientales (Fuerteventura y Lanzarote; *G. atlantica*); 2) Gran Canaria (*G. stehlini*); y 3) islas occidentales (Tenerife, La Gomera, La Palma y El Hierro; *G. galloti*, *G. caesaris*, *G. simonyi*, *G. intermedia*). Es importante resaltar en este punto que las conclusiones que se deduzcan del análisis biogeográfico dependerán totalmente de las áreas definidas a priori. En el caso del ejemplo, al simplificar y definir tan sólo 3 áreas dentro de las Islas Canarias (este, centro y oeste), no se podrán resolver por ejemplo los procesos biogeográficos dentro del grupo *G. galloti* – *G. caesaris* de las islas occidentales, a pesar de que la filogenia contenga toda la información necesaria para hacerlo. De todos modos, esto siempre puede hacerse a posteriori realizando un análisis similar al aquí ilustrado. Una vez definidas las áreas biogeográficas, éstas se consideran como estados de carácter y se reconstruyen en base a la topología del árbol filogenético. Esto se puede hacer a mano o bien utilizando programas informáticos desarrollados específicamente para este propósito, como por ejemplo MacClade (MADDISON y MADDISON, 1996). En la Fig. 6B se puede ver como después de la reconstrucción de los diferentes estados de carácter (áreas biogeográficas) a partir de la filogenia de *Gallotia* se obtienen unas zonas del cladograma donde la reconstrucción del carácter es inambigua (zonas que tienen un color determinado) y otras zonas del cladograma donde la reconstrucción del carácter es equívoca (zonas ralladas). La reconstrucción de los caracteres se realiza en base al criterio de parsimonia, que en este caso concreto consiste en inferir a partir de la filogenia el proceso de colonización que implique el menor número de colonizaciones posible.

Es importante no cometer el error de suponer que a partir de una filogenia siempre se podrá reconstruir el proceso de colonización al 100%. Lo único que las filogenias nos permiten es escoger entre toda una serie de hipótesis posibles las que sean más plausibles en base a un criterio determinado (en este caso el de parsimonia). A partir de la Fig. 6A-B podemos postular que las Islas Canarias han sido colonizadas una única vez, probablemente por el ancestro común de *Psammmodromus* y *Gallotia*. Esto viene indicado por la reconstrucción inequívoca del origen continental del grupo (en el caso del ejemplo se indica con el color azul en la raíz del árbol). Ahora bien, como se puede observar las siguientes dos reconstrucciones son equívocas, lo que nos indica que sin más datos no podremos inferir cual de los tres conjuntos de islas (occidentales, centro u oeste) fueron colonizadas primero desde el continente, y cual fue el proceso de colonización posterior entre los tres conjuntos de islas. Para ilustrar mejor este punto en la Fig. 6B se presentan los 12 patrones de colonización posibles entre los 3 conjuntos de islas oceánicas, indicándose aquellos que son incompatibles con la filogenia de la Fig. 6A. Como se puede observar, 8 de los 12 patrones posible son incompatibles con la hipótesis filogenética (Fig. 6A) mientras que 4 son equiprobables. Es decir, en base a la filogenia y sin más datos, es igual de probable que primero se colonizasen las islas orientales, posteriormente a partir de éstas se colonizase Gran Canaria y a partir de Gran Canaria se colonizasen las islas occidentales, que el ancestro de *Gallotia* hubiese llegado primero a las islas occidentales y de ahí hubiese colonizado primero las islas orientales y posteriormente, en una dispersión independiente, hubiese colonizado Gran Canaria. De la misma manera, es fácil de entender como un patrón del tipo 3 -> 2 -> 1 es incompatible con la filogenia de la Fig. 6A-B, ya que este patrón implica que el último proceso de colonización ocurrido fue el de las islas orientales a partir de Gran Canaria y si esto fuese cierto en la filogenia *G. stehlini* (Gran Canaria) tendría que ser grupo hermano de *G. atlantica* (islas orientales) y esto no es así. Aunque en este ejemplo parece que la filogenia no está ayudando mucho, éste acostumbra a ser el caso en la mayoría de estudios biogeográficos y existe una tendencia a confundir entre lo que se puede deducir a partir de la filogenia y lo que deducimos utilizando información adicional de tipo no filogenético (ver más abajo). En el caso del ejemplo, para poder determinar cuál de los cuatro procesos de colonización es el más probable tendremos que utilizar información derivada de evidencias empíricas adicionales que carecen de componente histórico, como por ejemplo la edad geológica de las islas, la dirección de las corrientes y vientos, la distancia total de los procesos de colonización y la habilidad de dispersión de los organismos. Para utilizar la edad geológica lo primero que debe hacerse es datar los nodos relevantes en el árbol filogenético y compararlos con las edades de las islas para ver si es posible eliminar alguna de las hipótesis igualmente probables desde el punto de vista filogenético. Las dataciones de los diversos nodos se realizaron a partir de la calibración del reloj molecular utilizando la edad de la isla de El Hierro (0.8 – 1 millón de años) y la distancia genética entre *G. caesaris caesaris* (El Hierro) y *G. caesaris gomerae* (La Gomera). En este caso, la información geológica no nos permite invalidar ninguna de las diferentes hipótesis posibles ya que las edades de las tres áreas (islas orientales 15-23 millones de años (ma); Gran Canaria 14-16 ma; islas occidentales 1.1-16 ma) son superiores a la edad mínima del primer proceso de colonización calculado a partir de los datos filogenéticos (12.6 ma, Fig. 6B). En cuanto a la dirección de las corrientes y distancia total del proceso de colonización, éstas se han representado en la Fig. 6C independientemente para cada una de las 4 posibilidades compatibles con la filogenia. Debido a las distancias relativamente similares que existen entre las diferentes áreas y éstas con el

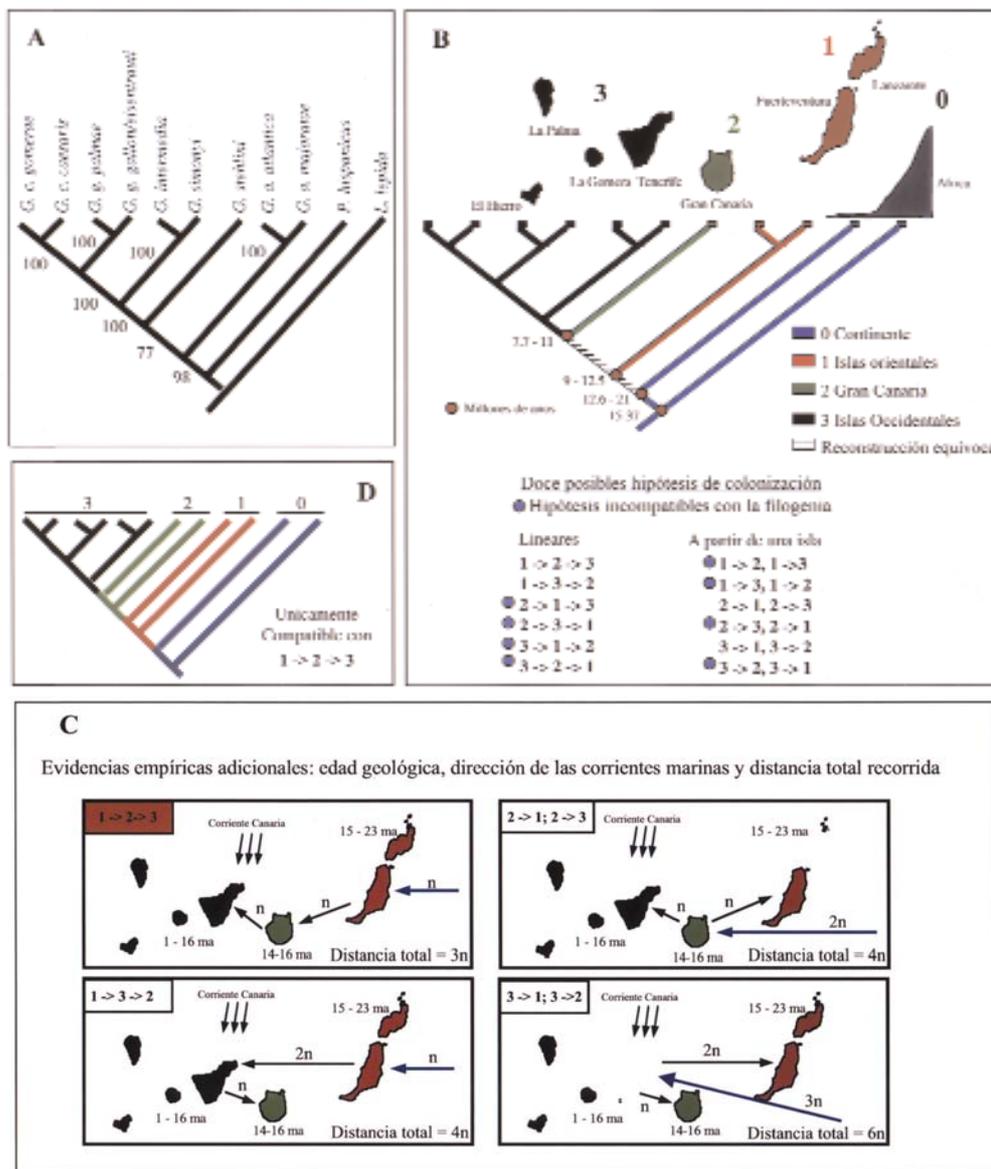


Figura 11. 6. A) Representación simplificada de las relaciones filogenéticas de Gallotia inferidas a partir de 2.381 pb. B) Diagrama de áreas dibujado a partir de la filogenia de Gallotia (A) y dividiendo las Islas Canarias en tres regiones: 1.- islas orientales; 2.- Gran Canaria; y 3.- islas occidentales. La reconstrucción de los estados de carácter (0, 1, 2, y 3) se realizó con el programa MacClade v. 4.0. De las 12 hipótesis posibles de colonización a partir de 3 islas, ocho son incompatibles con la filogenia presentada en 6A. C) Para decidir cual de las cuatro hipótesis restantes es la más probable se ha de recurrir a evidencias empíricas adicionales como por ejemplo la edad geológica, la dirección de las corrientes y la distancia total recorrida. En base a la distancia total recorrida la hipótesis más parsimoniosa es 1 -> 2 -> 3. D) Ejemplo de una topología filogenética compatible únicamente con una de las 12 posibles hipótesis de colonización existentes para 3 islas. En este caso la filogenia sería suficiente para inferir el proceso de colonización sin necesidad de utilizar evidencias adicionales.

continente se ha considerado un valor común “n” que corresponde a cualquier tipo de trayecto entre dos islas vecinas o entre las islas orientales y el continente. Como se puede observar en la Fig. 6C, es difícil deducir qué patrones de colonización pueden estar más favorecidos por la dirección de las corrientes, las cuales fluyen aproximadamente perpendiculares a las islas y por tanto en principio tendrían que tener un efecto similar sobre las rutas de colonización en sentido oriente – occidente como sobre las de sentido opuesto. En cuanto a la longitud del trayecto, ésta parece menor en el primer caso (3n) que en los tres restantes (4n - 6n). De este modo, en base a las rela-

ciones filogenéticas de *Gallotia* y a la evidencia empírica adicional de la longitud del trayecto y teniendo en cuenta la relativamente baja capacidad de dispersión de los lacértidos en comparación con otros reptiles (ARNOLD, 2000; CARRANZA *et al.* 2000), puede concluirse que lo más probable es que la colonización de las Islas Canarias por parte de *Gallotia* fuese en sentido este-oeste, colonizándose las tres áreas biogeográficas una a continuación de la otra (siguiendo un modelo tipo *stepping stone*). Aunque normalmente no se pueden deducir todos los procesos biogeográficos acontecidos tan sólo con la información filogenética, ésto no significa que sea imposible. Por ejemplo, en la Fig. 6D se muestran los conjuntos de islas 1 y 2 parafiléticos. En este caso hipotético, y aplicando el principio de parsimonia, se puede observar que de las 12 hipótesis posibles de colonización sólo la 1 -> 2 -> 3 es compatible con la filogenia inventada.

Agradecimientos

Agradezco la colaboración de T. Luque, G. Giribet, E. N. Arnold y M. A. Arnedo por toda la ayuda e información prestadas durante la elaboración de este capítulo.

Bibliografía

- ARANO, B., G. A. LLORENTE, A. MONTORÍ, D. BUCKLEY & P. HERRERO. (1998): Diversification in north-west African water frogs: molecular and morphological evidence. *Herpetol. J.* 8: 57-64.
- ARNEDO, M. A. (1999): *Cladismo: la reconstrucción filogenética basada en parsimonia*. Pag. 57-84 en *Evolución y Filogenia de Arthropoda* (A. Melic, J. J. de Haro, M. Méndez & I. Ribera, eds.). Zaragoza: Sociedad Entomológica Aragonesa.
- ARNHEIM, N. T., T. WHITE & W. E. RAINEY. (1990): Applications of PCR: organismal and populations biology. *Bioscience* 40: 174-182.
- ARNOLD, E. N. (1989a): Systematics and adaptive radiation of equatorial african lizards assigned to the genera *Adolfus*, *Bedriagaia*, *Gastropholis*, *Holaspis* and *Lacerta* (Reptilia, Lacertidae). *J. Nat. Hist.* 23: 525-555.
- ARNOLD, E. N. (1989b): Towards a phylogeny and biogeography of the Lacertidae: relationships within an Old-World family of lizards derived from morphology. *Bull. Brit. Mus.* 55: 209-257.
- ARNOLD, E. N. (1994): *Investigating the origins of performance advantage: adaptation, exaptation and lineage effects*. Pag. 123-168 in *Phylogenetics and ecology* (P. Eggleton, and R. I. Vane-Wright, eds.). Academic Press.
- ARNOLD, E. N. (1995): Identifying the effects of history on adaptation: origins of different sand-diving techniques in lizards. *J. Zool.* 235: 351-388.
- ARNOLD, E. N. (2000): Using fossils and phylogenies to understand evolution of reptile communities on islands. *Bonn. Zool. Mono.* 46: 309-323.
- ARNTZEN, J. W. & M. GARCÍA-PARÍS. (1995): Morphological and allozyme studies of midwife toads (genus *Alytes*), including the description of 2 new taxa from Spain. *Cont. Zool.* 65: 5-34.
- AUSTIN, C. C. (1998): Phylogenetic relationships of *Lipinia* (Scincidae) from New Guinea based on DNA sequence variation from the mitochondrial 12S rRNA and nuclear *c-mos* genes. *Hamadryad* 23: 93-102.
- AUSTIN, J. & E. N. ARNOLD. (2001): Ancient mitochondrial DNA and morphology elucidate an extinct island radiation of Indian Ocean giant tortoises (*Cylindraspis*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 2515-2523.
- AVISE, J. C. (1994): *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York.
- AVISE, J. C. (2000): *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- BAVERSTOCK, P. R., D. KING, M. KING, J. BIRRELL & M. KRIEG. (1993): The evolution of species of the Varanidae: microcomplement fixation analysis of serum albumins. *Australian J. Zool.* 41: 621-638.
- BECAK, M. L., W. BECAK & L. DENARO. (1972): Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. *Caryologia* 25: 313-26.
- BECAK, W. & M. L. BECAK. (1969): Cytotaxonomy and chromosomal evolution in serpents. *Cytogenetics* 8: 247-62.
- BICKMORE, W. A. & A. T. SUMNER. 1989. Mammalian chromosome banding - an expression of genome organization. *Trends Genet.* 5: 144-48.
- BOULENGER, G. A. (1920a): A monograph of the South Asian, Papuan, Melanesian and Australian frogs of the genus *Rana*. *Rec. Indian. Mus.* 20: 1-226
- BOULENGER, G. A. (1920b): *Monograph of the Lacertidae*. Johnson Reprint Corporation, London.

- BRUFORD, M. W. y R. K. WAYNE. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 939-943.
- BUSACK, S. D. (1986): Biogeographic analysis of the herpetofauna separated by the formation of the Strait of Gibraltar. *Nat. Geograph. Res.* 2: 17-36.
- BUTH, D. G. (1984): The application of electrophoretic data in systematic studies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 501-522.
- CAMP, C. L. (1971): *Camp's classification of the lizards*. Facsimile reprint by the Society for the study of amphibians and reptiles.
- CANTINO, D., N. B. HAROLD, K. DE QUEIROZ, M. J. DONOGHUE, T. ERIKSSON, D. M. HILLIS & M. S. Y. LEE. (1999): Species Names in Phylogenetic Nomenclature. *Syst. Biol.* 48: 790-807.
- CAPULA, M. (1996): Evolutionary genetics of the insular lacertid lizard *Podarcis tiliguerta*: genetic structure and population heterogeneity in a geographically fragmented species. *Heredity* 77: 518-529.
- CAPUTO, V., G. ODIERNA & G. APREA. (1993): Karyological comparison of *Sphenops sepsoides*, *Chalcides chalcides*, and *Chalcides ocellatus* (Reptilia: Scincidae): taxonomic implications. *Copeia* 4: 1.180-1.184.
- CARRANZA, S., E. N. ARNOLD, J. A. MATEO & L. F. LÓPEZ-JURADO. (2000): Long-distance colonization and radiation in gekkonid lizards, *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae), revealed by mitochondrial DNA sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 637-649.
- CARRANZA, S., E. N. ARNOLD, J. A. MATEO & L. F. LÓPEZ-JURADO. (2001): Parallel gigantism and complex colonization patterns in Cape Verde scincid lizards *Mabuya* and *Macrosцинus* (Reptilia: Scincidae) revealed by mitochondrial DNA sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 1.595-1.603.
- CARRANZA, S., E. N. ARNOLD, R. H. THOMAS, J. A. MATEO & L. F. LÓPEZ JURADO. (1999): Status of the extinct giant lacertid lizard *Gallotia simonyi simonyi* (Reptilia: Lacertidae) assessed using mtDNA sequences from museum specimens. *Herpetol. J.* 9: 83-86.
- CIOFI, C. & M. W. BRUFORD. (1998): Isolation and characterization of microsatellite loci in the Komodo dragon *Varanus komodoensis*. *Mol. Ecol.* 7: 134-136.
- COHEN, M. M. & C. GANS. (1970): The chromosomes of the order Crocodylia. *Cytogenetics* 9: 81-105.
- COMINGS, D. E. (1978): Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12: 25-46.
- CUNNINGHAM, C. W. (1997a): Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.* 14: 733-740.
- CUNNINGHAM, C. W. (1997b): Is congruence between data partitions a reliable predictor of phylogenetic accuracy? Empirically testing an iterative procedure for choosing among phylogenetic methods. *Syst. Biol.* 46: 464-478.
- DARLINGTON, C. D. (1932): *Recent advances in cytology*. J & A Churchill, London.
- DARLINGTON, P. J. J. (1957): *Zoogeography: The geological distributions of animals*. John Wiley and Sons, New York.
- DARLINGTON, P. J. J. (1965): *Biogeography of the southern end of the world*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- DARWIN, C. (1859): *On the origin of Species by means of Natural Selection*. J. Murray, London.
- DAWID, I. B. & A. W. BLACKLER. (1972): Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 29: 152-161.
- DE QUEIROZ, K. & J. GAUTHIER. (1990): Phylogeny as a central principle in taxonomy: Phylogenetic definitions of taxon names. *Syst. Zool.* 39: 307-322.
- DUELLMAN, W. E. & L. TRUEB. (1986): *The biology of amphibians*. McGraw-Hill.
- ESTEAL, S. (1986): The ecological genetics of introduced populations of the giant Toad, *Bufo marinus*. IV. Gene flow estimated from a mixture in Australian populations. *Heredity* 56: 145-156.
- ESTES, R. & G. PREGILL. (1988): *Phylogenetic relationships of the lizard families*. Stanford University Press, Stanford, California.
- ETHERIDGE, R. (1966): The systematic relationships of West Indian and South American lizards referred to the iguanid genus *Leiocephalus*. *Copeia* 1966: 79-91.
- FARRIS, J. S. (1982): *The logical basis of phylogenetic systematics*. Pag. 7-36 in *Advances in cladistics*, Volume 2. Proceedings of the second meeting of the Willi Hennig Society (N. Platnick, and R. A. Funk, eds.). Columbia University Press, New York.
- FELSENSTEIN, J. (1978): The number of evolutionary trees. *Syst. Zool.* 27: 27-33.
- 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.
- FINCH, M. O. & D. M. LAMBERT. (1996): Kinship and genetic divergence among populations of tuatara *Sphenodon punctatus* as revealed by minisatellite DNA profiling. *Mol. Ecol.* 5: 651-658.
- FLOWERDEW, M. W. & D. J. CRISP. (1976): Allelic esterase isozymes, their variation within season, position on the shore and stage of development in the cirripede *Balanus balanoides*. *Mar. Biol.* 35: 319-325.
- GALBRAITH, D. A., B. N. WHITE, R. J. BROOKS, J. H. KAUFMANN & P. T. BOAG. (1995): DNA fingerprinting of turtles. *J. Herpetol.* 29: 285-291.
- GANS, C. (editor). (1969-1998): *Biology of the Reptilia*. Diecinueve volúmenes en total. (vol. 1-13) Academic Press, London, U.K.; (Vol. 14, 15) John Wiley and Sons, New York; (Vol. 16) Liss, New York; (vol 17, 18 y 19) University of Chicago Press, Chicago.
- GARCÍA-PARÍS, M. & E. L. JOCKUSCH. (1999): A mitochondrial DNA perspective on the evolution of Iberian *Discoglossus* (Amphibia: Anura). *J. Zool.* 248: 209-218.
- GIRIBET, G., G. D. EDGECOMBE & W. C. WHEELER. (2001): Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature* 413: 157-161.
- GONZÁLEZ, P., F. PINTO, M. NOGALES, A. J. JIMENEZ, M. HERNANDEZ & V. M. CABRERA. (1996): Phylogenetic relationships of the Canary Islands endemic lizard genus *Gallotia* (Sauria: Lacertidae), inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 6: 63-71.
- GOOD, D. A. (1989): Hybridization and cryptic species in *Dicamptodon* (Caudata: Dicamptodontidae). *Evolution* 43: 728-744.
- GREEN, D. M. & S. K. SESSIONS (eds) (1991): *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- GREENE, H. W. (1986): Diet and arboreality in the emerald monitor, *Varanus prasinus*, with comments on the study of adaptation. *Fieldiana Publication* 1970: 1-12.
- GREER, A. E. (1979): A phylogenetic subdivision of Australian skinks. *Rec. Aust. Mus.* 32: 339-371.
- GROOMBRIDGE, J. J., M. W. BRUFFORD, C. JONES & R. A. NICHOLS. (2000): Conservation biology- "Ghost" alleles of the Mauritius kestrel. *Nature* 403: 616-616.
- HARRIS, D. J., E. N. ARNOLD & R. H. THOMAS. (1998): Relationships of lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 1939-1948.
- HARRIS, D. J., E. A. SINCLAIR, N. L. MERCADER, J. C. MARSHALL & K. A. CRANDALL. (1999): Squamate relationships based on *C-mos* nuclear DNA sequences. *Herpetol. J.* 9: 147-151.
- HARRY, J. L. & D. A. BRISCOE. (1988): Multiple paternity in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *J. Heredity* 79: 96-99.
- HARVEY, P. H., A. J. LEIGH BROWN, J. M. SMITH & S. NEE. (1996): *New uses for new phylogenies*. Oxford University Press, Oxford.
- HEATHWOLE, H. (editor). (1994, 1995): *Amphibian biology* (2 vol.). Surrey Beatty, Chipping Norton, NSW, Australia.
- HEDGES, S. B., C. A. HASS & L. R. MAXSON. (1992): Caribbean biogeography - molecular evidence for dispersal in west-indian terrestrial vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1.909-1.913.
- HENNIG, W. (1957): Systematik und Phylogenese. *Ber. Hundertj. dtsh. ent. Ges.* 1956: 50-71.
- HENNIG, W. (1966): *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana, Chicago, London.
- HERNANDEZ-JUVIEL, J. M., D. J. MORAFKA, I. DELGADO, G. D. SCOTT & R. W. MURPHY. (1992): Effect of enzyme dilution on the relative mobility of glutamate dehydrogenase isozymes in the prairie rattlesnake, *Crotalus viridis viridis*. *Copeia* 1992: 1117-1119.
- HEWITT, G. M. (2000): The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature* 402: 907-913.
- HICKSON, R. E., SIMON, C., COOPER, A., SPICER, G. S., SULLIVAN, J. & PENNY, D. (1996): Conserved sequence motifs, alignment and secondary structure for the third domain of animal 12S rRNA. *Mol. Biol. Evol.* 13: 150-169.
- HILLIS, D. M. (1995): Approaches for assessing phylogenetic accuracy. *Syst. Biol.* 44: 3-16.
- HILLIS, D. M. & M. T. DIXON. (1991): Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.* 66: 411-453.
- HILLIS, D. M., C. MORITZ & B. K. MABLE. (1996): *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.
- HOWELL, M. W. & D. A. BLACK. (1980): Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1.014.

- HUELSENBECK, J. P. (1995): Performance of phylogenetic methods in simulations. *Syst. Biol.* 44: 17-48.
- HUGHES, C. R. & D. C. QUELLER. (1993): Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Mol. Ecol.* 2: 131-138.
- HUMPHRIES, C. J. (1986): *Cladistic biogeography*. The Clarendon Press, Oxford.
- HUNTER, R. L. & C. L. MARKERT. (1957): Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1.294-1.295.
- JACKSON, R. C. (1971): The karyotype in systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 2: 327-368.
- JEFFREYS, A. J., V. WILSON & S. L. THEIN. (1985): Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316: 76-79.
- JOGER, U. (1984): Die Radiation der Gattung Tarentola in Makaronesien (Reptilia: Sauria: Gekkonidae). *Courier Forsch. -Inst. Senckenberg.* 71: 91-111.
- KING, M. (1981): *Chromosome change and speciation in lizards*. Pag. 262-286 en *Evolution and speciation* (W. R. Atchley & D. S. Woodruff, eds.). Essays in honor of M.J.D. White. Cambridge University Press, Cambridge, London etc.
- KITCHING, I. J., P. L. FOREY, C. J. HUMPHRIES & D. M. WILLIAMS. (1998): *Cladistics*. Oxford University Press, Oxford.
- KLUGE, A. G. (1968): Phylogenetic relationships of the gekkonid lizard genera *Lepidodactylus fitzingeri*, *Hemiphylodactylus bleekeri*, and *Pseudogekko taylori*. *The Philippine J. Sci.* 95: 331-352.
- KLUGE, A. G. (1969): Quantitative phylogenetics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* 18: 1-32.
- KLUGE, A. G. (1983): Cladistic relationships among gekkonid lizards. *Copeia*: 465-475.
- KLUGE, A. G. (1988): Parsimony in vicariance biogeography: a quantitative method and a Greater Antillean example. *Syst. Zool.* 37: 315-328.
- KLUGE, A. G. (1994): Principles of phylogenetic systematics and the informativeness of the karyotype in documenting gekkotan lizard relationships. *Herpetologica* 50: 210-221.
- KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PAABO, F. X. VILLABLANCA & A. C. WILSON. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6.196-6.200.
- LANDER, E. S., et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- LISTON, A., L. H. RIESEBERG & T. S. ELIAS. (1989): Genetic similarity is high between intercontinental disjunct species of *Senecio* (Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 76: 383-388.
- LOFTS, B. (editor). (1974): 1976. *Physiology of the Amphibia*. Vol. 2, 3. Academic Press, New York.
- MABEE, P. M. & J. HUMPHRIES. (1993): Coding polymorphic data: examples from allozymes and ontogeny. *Syst. Biol.* 42: 166-181.
- MACEY, J. R., N. B. ANANJEVA, Y. WANG & T. J. PAPPENFUSS. (2000): Phylogenetic relationships among Asian Gekkonid lizards formerly of the genus *Cyrtodactylus* based on cladistic analyses of allozymic data: monophyly of *Cyrtopodion* and *Mediodactylus*. *J. Herpetol.* 34: 258-265.
- MACGREGOR, H. C. (1993): *An introduction to animal cytogenetics*. Chapman and Hall, London.
- MADDISON, W. P. & D. R. MADDISON. (1996): *MacClade 3.06*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- MANCHENKO, G. P. 1994. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. C. R. C. Press, Ann Arbor.
- MAO, S. H., W. FRAIR, F. Y. YIN & Y. W. GUO. (1987): Relationships of some cryptodiran turtles as suggested by immunological cross-reactivity of serum albumins. *Biochem. Syst. Ecol.* 15: 621-624.
- MARSHALL, C. R. (1992): Substitution bias, weighted parsimony, and amniote phylogeny as inferred from 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 370-373.
- MATEO, J. A., J. L. F. LÓPEZ & C. P. GUILLAUME. (1996): Proteic and morphological variations in ocellated lizards (Lacertidae): a complex of species across the Strait of Gibraltar. *Comptes Rendus De L'Academie Des Sciences Serie III Sciences De La Vie* 319: 737-746.
- MAXSON, L. R. & R. D. MAXSON. (1986): Micro-complement fixation: A quantitative estimator of protein evolution. *Mol. Biol. Evol.* 3: 375-388.
- MAXSON, L. R. & R. D. MAXSON. (1990): *Proteins II: Immunological techniques*. pp. 127-155 en *Molecular systematics* (D. M. Hillis y C. Moritz, eds.). Sinauer Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- MEDRANO, L., M. DORIZZI, F. RIMBLOT & C. PIEAU. (1987): Karyotype of the sea-turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). *Amphibia Reptilia* 8: 171-178.

- MILLER, D. A., J. R. GOSDEN, N. D. HASTIE & H. J. EVANS. (1984): Mechanism of endonuclease banding of chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 15: 294-98.
- MOORE, J. A. (editor) (1964): *Physiology of the Amphibia*. Vol. 1. Academic Press, New York.
- MORESCALCHI, A. (1981): Karyology of the main groups of African frogs. *Mon. Zool. Ital. Sup.* 15: 41-53.
- MORESCALCHI, A., G. ODIERNA & E. OLMO. (1979): Karyology of the primitive salamanders, family Hynobiidae. *Experientia* 35: 1.434-1.436.
- MULLIS, K. B. & F. FALOONA, A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.
- MURPHY, R. W. & R. H. MATSON. (1986): Gene expression in the tuatara, *Sphenodon punctatus*. *New Zeland J. Zool.* 13: 573-581.
- MURPHY, R. W., J. W. SITES, D. G. BUTH & C. H. HAUFLE. (1996): *Proteins: isozyme electrophoresis* en *Molecular Systematics* (D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable, eds.). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- NEI, M. (1972): Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* 106: 283-292.
- NEI, M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEI, M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- NELSON, G. J. & N. I. PLATNICK. (1981): *Systematics and biogeography*. Columbia Univ. Press., New York.
- NEWMAN, R. A. & T. SQUIRE. (2001): Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Mol. Ecol.* 10: 1.087-1.100.
- NICHOLS, R. (2001): Gene trees and species trees are not the same. *TREE* 16: 358-364.
- NUSSBAUM, R. A. & M. WILKINSON. (1989): On the classification and phylogeny of caecilians (Amphibia: Gymnophiona), a critical review. *Herpetol. Mon.* 3: 1-42.
- NUTTALL, G. H. F. (1904): *Blood immunity and blood relationships. A demonstration of certain blood relationships among animals by means of the precipitin test for blood*. Cambridge University Press, Cambridge.
- ODIERNA, G., G. APREA, O. J. ARRIBAS, T. CAPRIGLIONE, V. CAPUTO & E. OLMO. (1996): The karyology of the Iberian rock lizards. *Herpetologica* 52: 542-550.
- OLMO, E. (ed) (1990): *Cytogenetics of amphibians and reptiles*. Birkhauser Verlag, Basel.
- PALUMBI, S. R. (1996): *The Polymerase chain reaction*. pp. 205-247 en *Molecular Systematics* (D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- POSADA, D. & K. A. CRANDALL. (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- POSADA, D. & K. A. CRANDALL. (2001): Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (*HIV-1*). 18: 897-906.
- RANDO, J. C., E. HERNANDEZ, M. LÓPEZ & A. M. GONZÁLEZ. (1997): Phylogenetic relationships of the Canary Islands endemic lizard genus *Gallotia* inferred from mitochondrial DNA sequences: Incorporation of a new subspecies. *Mol. Phyl. Evol.* 8: 114-116.
- RAXWORTHY, C. J., M. R. J. FORSTNER & R. A. NUSSBAUM. (2002): Chameleon radiation by oceanic dispersal. *Nature* 415: 784-787.
- ROGERS, J. S. (1972): *Measures of genetic similarity and genetic distance*. Univ. Texas Publs. 7213: 145-153.
- RONQUIST, F. (1997): Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Syst. Biol.* 46: 195-203.
- RZHETSKY, A. & M. NEI. (1992): A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* 9: 945-967.
- SAINT, K. M., C. C. AUSTIN, S. C. DONNELLAN & M. N. HUTCHINSON. (1998): *C-mos*, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Mol. Phyl. Evol.* 10: 259-263.
- SAITOU, N. y M. NEI. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- SCHARE, S. J., G. T. HORN & H. A. ERLICH. (1986): Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 233: 1.076-1.078.
- SCHLOTTERER, C. & D. TAUTZ. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl. Acids Res.* 20: 211-215.
- SINGH, L. 1995. Biological significance of minisatellites. *Electrophoresis* 16: 1.586-1.595.
- SITES, J. W., JR., J. W. BICKHAM, B. A. PYTEL, I. F. GREENBAUM & B. A. BATES. (1984): Biochemical characters and the reconstruction of turtle phylogenies: relationships among batagurine genera. *Syst. Zool.* 33: 137-158.

- SNELL, H. L., H. M. SNELL & C. R. TRACY. (1984): Variation among populations of Galapagos land iguanas (*Conolophus*): contrasts of phylogeny and ecology. *Biol. J. Linnean Soc.* 21: 185-207.
- SPRINGER, M. S., R. W. DEBRY, C. DOUADY, H. M. AMRINE, O. MADSEN, W. W. JONG & M. J. STANHOPE. (2001): Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. *Mol. Biol. Evol.* 18: 132-143.
- STEINEMANN, M., W. PINSKER & D. SPERLICH. (1984): Chromosome homologies within the *Drosophila obscura* group probed by in-situ hybridization. *Chromosoma* 91: 46-53.
- STEVEN, P. (1996): Data set incongruence and the phylogeny of crocodylians. *Syst. Biol.* 45: 393-414.
- SUMNER, A. T. (1990): *Chromosome banding*. Unwin Hyman, London.
- SWOFFORD, D. L. & S. H. BERLOCHER. (1987): Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. *Syst. Zool.* 36: 293-325.
- SWOFFORD, D. L. & G. J. OLSEN. (1990): *Phylogeny reconstruction*. pp. 411-501 en *Molecular Systematics* (D. M. Hillis y C. Moritz, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- SWOFFORD, D. L., G. J. OLSEN, P. J. WADDELL & D. M. HILLIS. (1996): *Phylogenetic inference*. pp. 407-514 en *Molecular Systematics* (D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- THERMAN, E. & M. SUSMAN. (1993): *Human chromosome, structure, behavior, and effects*. Springer-Verlag, New York.
- UNDERWOOD, G. (1954): On the classification and evolution of geckos. *Proc. Zool. Soc. London* 124: 469-492.
- VENTER, J. C., *et al.* (2001): The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-51.
- VIDAL, N., S. G. KINDL, A. WONG & S. B. HEDGES. (2000): Phylogenetic relationships of xenodontine snakes inferred from 12S and 16S ribosomal RNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 14: 389-402.
- WATSON, G. F. & M. J. LITTLEJOHN. (1985): *Patterns of distribution, speciation and vicariance biogeography of southeastern Australian amphibians*. Grigg, G., Shine, R. y Ehmann, H. [Eds]. *Biology of Australian frogs and reptiles*. Surrey Beatty & Sons Pty & the Royal Zoological Society of New South Wales, Chipping Norton.
- WHEELER, W. C. (1996): Optimization alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics* 12, 1-9.
- WHEELER, W. & D. S. GLADSTEIN. (2000): *POY: The optimization of alignment characters*. American Museum of Natural History, New York. Program and documentation available at: <ftp://ftp.amnh.org/pub/molecular/poy/>.
- WHITE, M. J. D. (1945): *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- WILSON, A. C., S. S. CARLSON & T. J. WHITE. (1977): *Biochemical evolution*. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 473-639.
- WRIGHT, D. A., C. M. RICHARDS, J. S. FROST, A. M. CAMOZZI & B. J. KIUNZ. (1983): *Genetic mapping in amphibians* en *Isozymes: current topics in biological and medical research*, vol. 7. molecular structure and regulation (J. Ratazzi, G. Scandalios y G. S. Whitt, eds.). A. R. Liss, New York.
- ZAJC, I. & J. W. ARNTZEN. (1999): Phylogenetic relationships of the European newts (genus *Triturus*) tested with mitochondrial DNA sequence data. *Contributions to Zool.* 68: 73-81.
- ZARDOYA, R. & A. MEYER. (1996): Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* 13: 933-942.
- ZARDOYA, R. & A. MEYER. (2001): On the origin of and phylogenetic relationships among ling amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7.380-7.383.

