

Análisis filogenético

Desarrollo de un trabajo final en
base a secuencias de ADN para un
curso de pregrado



Presentación

Este módulo es una guía de trabajo destinada a profesores universitarios interesados en que sus estudiantes desarrollen proyectos de análisis filogenético orientados a entender cómo pueden aplicarse al estudio de problemas evolutivos. Los materiales podrían adaptarse para ser usados en otros contextos, pero están en principio pensados para estudiantes de licenciatura. Estos materiales han sido desarrollados como parte de un Curso de Evolución de carácter general, cuyos materiales de los cursos teóricos y prácticos se encuentran en evolucion.fcien.edu.uy.

¿Qué contiene este módulo?

- Una breve presentación de conceptos básicos sobre filogenias, con énfasis en cómo se visualizan e interpretan las filogenias.
- La presentación de un problema filogenético, pensado para que los estudiantes lo aborden en pequeños grupos (sugerimos tres estudiantes por grupo) a lo largo de un curso sobre evolución de organismos, u otro que incluya y aplique conceptos generales de análisis filogenéticos y sus aplicaciones. Al final del curso, los estudiantes presentan sus esfuerzos en un trabajo final, cuyas características se describen en este librito.
- Un ejemplo de problema desarrollado a efectos de ilustrar cómo debe abordarse el problema filogenético principal.
- Un ejercicio de análisis filogenético pensado para introducir a los estudiantes a las herramientas principales de análisis e interpretación.
- Un glosario con algunos términos y conceptos adicionales.
- Un anexo con una pequeña colección de problemas filogenéticos que hemos usado en nuestros cursos y que pueden usarse en lugar del presentado en el cuerpo del librito.

¿Qué no buscar en este módulo?

- Una descripción formal de los objetivos, conceptos, y métodos de análisis filogenético. Existen excelentes presentaciones de estos temas en los libros de texto de biología general y de evolución. Nuestra presentación no sustituye dichos materiales, sino que resume en forma gráfica algunos conceptos para que profesores y estudiantes puedan asegurarse que los conceptos esenciales son conocidos por todos.
- Una confrontación con las distintas metodologías de análisis filogenéticos, sus ventajas y limitaciones. En general, nuestro curso teórico presenta en cierto detalle los métodos de parsimonia a modo de introducción a los conceptos fundamentales del análisis filogenético, y ofrece solamente un panorama general de las restantes metodologías.

Introducción

Como se señala en la Presentación, este módulo es producto de nuestra experiencia (y la de varias generaciones de ayudantes de práctico) en la enseñanza de la evolución a nivel de licenciatura. La idea general es contribuir a que los estudiantes desarrollen la capacidad de “pensar sobre árboles” (tree-thinking), algo cada vez más importante en la biología. En nuestro curso de evolución, el módulo sobre análisis filogenético es el primero luego de la introducción general al curso y su presentación de la historia de las ideas evolutivas. Pensar sobre árboles es esencial al considerar la diversidad de los organismos, la evolución de genes y familias génicas, el mapeo de caracteres y la reconstrucción de caracteres ancestrales, la biogeografía, la evolución de patógenos y enfermedades emergentes, etc. Recomendamos a Hillis (2010) para una presentación a la vez amena y técnicamente sólida de las múltiples aplicaciones del análisis filogenético.

Conviene tener en cuenta que, si bien entendemos que el material presentado en este librito puede ser usado de manera independiente del curso del cual forma parte, dicho curso les ofrece abundante material de apoyo y múltiples oportunidades para apreciar la interpretación de árboles filogenéticos en diversos contextos biológicos. Es importante que el docente que vaya a utilizar estos materiales se pregunte en qué contexto, y con qué información suplementaria, contará el estudiante para llevar adelante estas experiencias. De modo análogo, debe haber docentes y ayudantes de práctico preparados para ofrecer apoyo a los estudiantes durante el desarrollo de su trabajo. Finalmente, se requiere acceso a internet y a las bases de datos y programas identificados en el librito. Esto es cada vez menos una limitante, y todo el material necesario para desarrollar estas tareas es de libre acceso. Pero sin la capacidad de realizar búsquedas de genes en Genbank, por ejemplo, el problema es inabordable. Si el acceso remoto a estas bases de datos es un problema, es recomendable instalar una base de datos local (que puede limitarse a los taxones de interés) y pensar de qué modo se podrá acceder a la información.

Características de los problemas seleccionados

Aunque las oportunidades para abordar problemas con herramientas filogenéticas son múltiples (véase Hillis, 2010), hemos optado por problemas con ciertas características particulares:

- Representan problemas biológicos que pueden abordarse filogenéticamente.
- Involucran casos atractivos de diversidad organizmática y/o historia biogeográfica. Se han seleccionado grupos de organismos familiares para los estudiantes, y se provee una clasificación de los mismos para facilitar el abordaje del problema.
- Han sido motivo de controversias históricas (o actuales), o la visión de estos problemas ha cambiado como resultado de estudios filogenéticos.
- Pueden abordarse con secuencias de ADN existentes y disponibles en las bases de datos.
- Se trata de problemas por encima del nivel de las especies. Muchos problemas de variación intraespecífica comúnmente requieren un bagaje mayor de análisis genético-poblacionales, y rara vez pueden abordarse correctamente usando las filogenias como herramienta principal.

Ninguna de estas características es esencial, pero recomendamos considerar seriamente las dificultades que puede acarrear el cambiarlas. Así, el uso de datos morfológicos es perfectamente factible, pero generará varias dificultades adicionales (e.g. la naturaleza de los datos, disponer de datos abundantes como para poder llevar adelante los esfuerzos de muestreo que las grandes bases de datos de secuencias permiten con naturalidad). Por lo general, los estudiantes van a identificar rápidamente (si no lo han hecho para ellos los docentes) varios trabajos importantes que han generado y usado datos de secuencias de ADN para abordar los problemas que se les presentan. Sin embargo, se verá que el énfasis del ejercicio no reside en “encontrar la respuesta correcta”, sino en realizar un diseño de muestreo (de taxones, y luego de genes), justificarlo, realizar los análisis (alineamientos, análisis filogenéticos) e interpretarlos. Dicha interpretación normalmente incluye la discusión de incertidumbres y la comparación con varios resultados publicados, explicando por qué los resultados pueden ser iguales o diferir. Se trata, en este sentido, de problemas abiertos, para los cuales hay mucho más datos de los que se puede analizar. El valor del ejercicio reside en el proceso que va desde su diseño a la discusión.

Aunque hemos intentado guiar el proceso de los estudiantes, la selección y manejo de datos siempre requiere esfuerzos importantes y genera un grado de frustración que hay que estar preparados para superar. En general, los estudiantes terminan eligiendo secuencias de varios genes y los analizan de manera individual o concatenada. Confiamos en que el aprendizaje y la satisfacción por ser capaces de abordar el problema biológico planteado compensen ampliamente estas dificultades.

Oportunidades para el uso de materiales de colección y otras fuentes de información

Los problemas presentados en este librito no requieren del acceso a colecciones biológicas ni se basan de manera directa en ejemplares (aunque pueden usarse los problemas y los datos seleccionados para los estudiantes para discutir su relación con ejemplares de museo y las ventajas y oportunidades que ofrecen). Los problemas plantean problemas de agrupamiento y de distribución geográfica examinados a través de los árboles. El acceso a una colección permite enriquecer los análisis y plantearse otros (de evolución de caracteres morfológicos que pueden estudiarse en los ejemplares, por ejemplo), pero estas posibilidades no están desarrolladas en esta guía.

El acceso a una colección permite también, potencialmente, otro tipo de problemas que no hemos desarrollado aquí. Por ejemplo, los estudiantes pueden observar la variación en un grupo de organismos a través de ejemplares de colección, plantearse hipótesis sobre su evolución, y buscar secuencias de ADN como para ponerlas a prueba. Estos **problemas abiertos** son, naturalmente, muy dependientes del material disponible para los estudiantes y requieren de una guía considerable de los docentes para asegurar su viabilidad. Nuestros problemas han sido seleccionados a priori y, si bien no están exentos de dificultades, son más fáciles de administrar.

Bibliografía citada

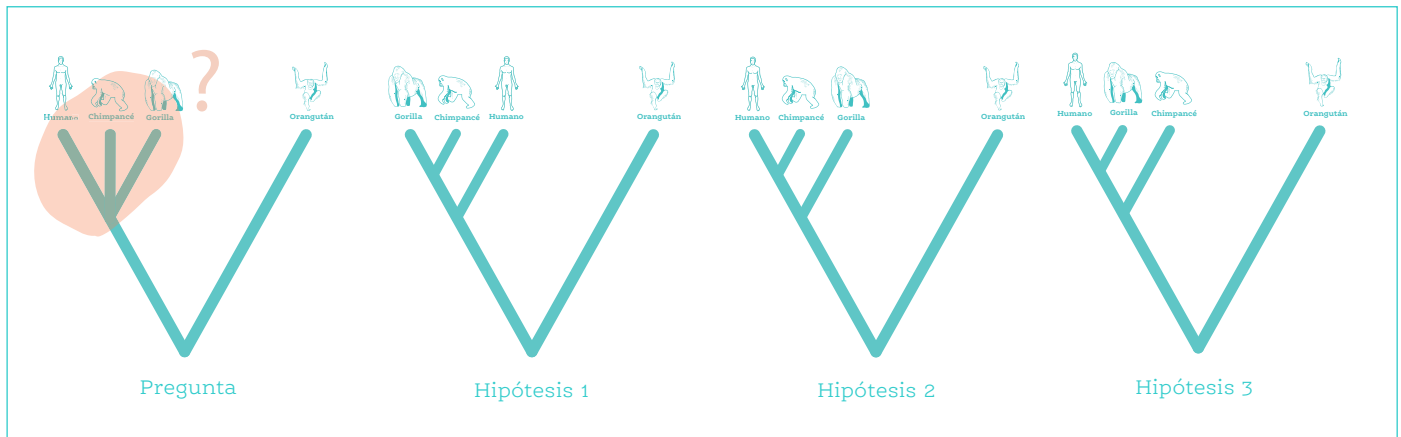
Hillis, D. M. 2010. Phylogenetic progress and applications of the tree of life. In *Evolution Since Darwin: The First 150 Years* (M. A. Bell, W. F. Eanes, and D. J. Futuyma, eds.), Sinauer Associates, Sunderland, MA.



Conceptos básicos

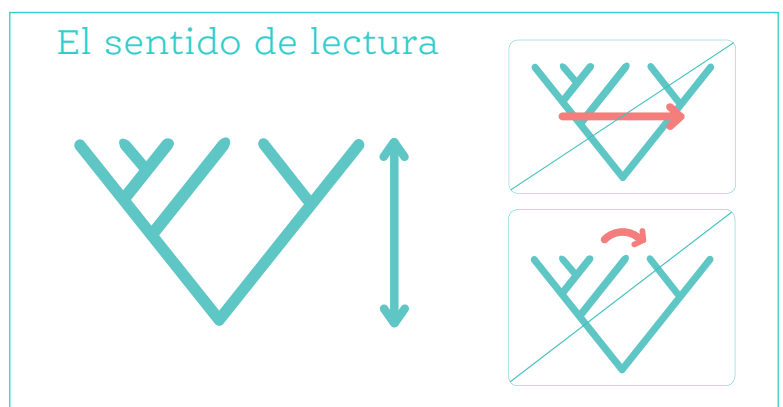
¿Qué es una filogenia ?

Una filogenia es una historia de un grupo de especies determinado. Es un ordenamiento de relaciones anidadas y jerárquicas. Estas relaciones evolutivas son ilustradas mediante un árbol filogenético, una representación gráfica de dicha historia. El árbol puede ilustrar la verdadera historia evolutiva o una hipótesis sobre dicha historia.



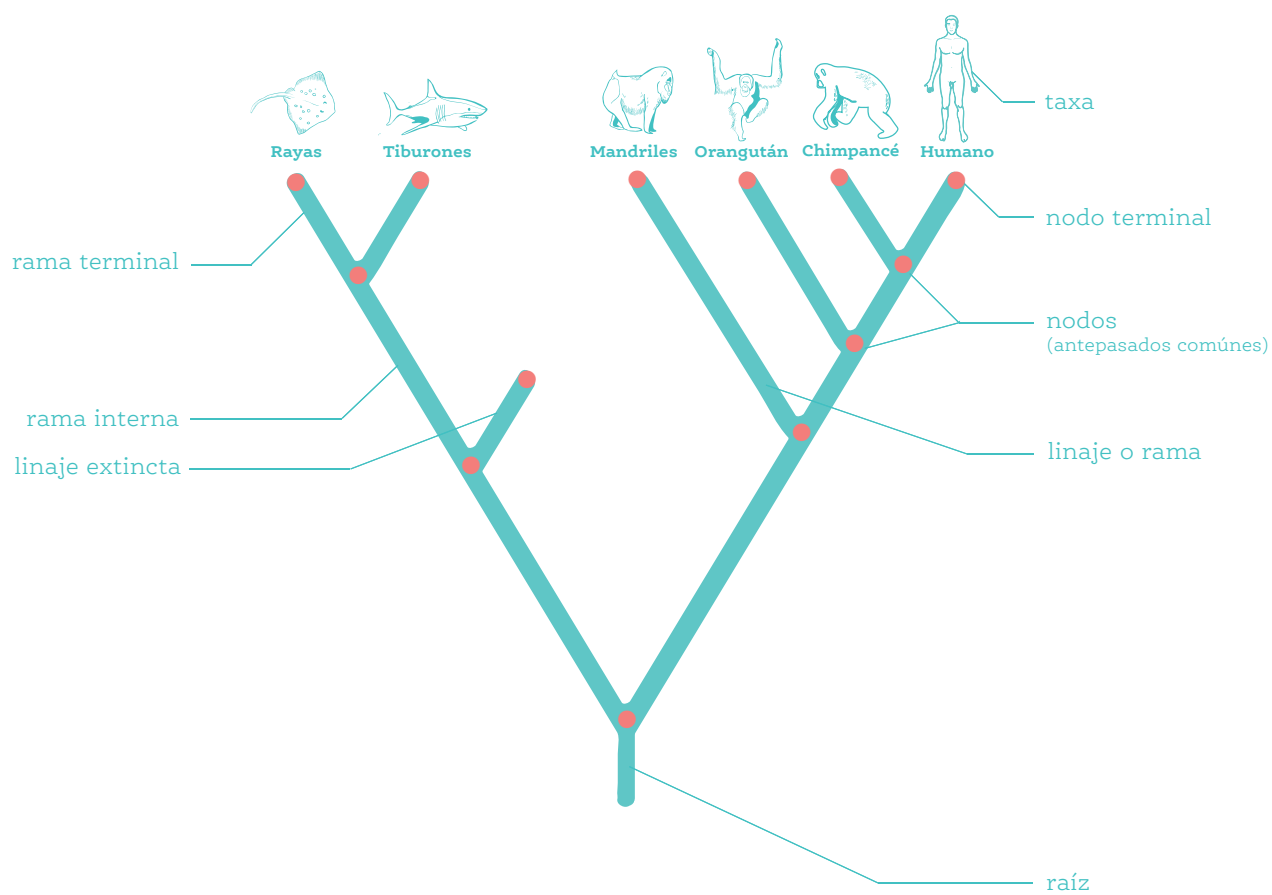
En la figura se ilustra una **pregunta** sobre las relaciones entre la especie humana, el chimpancé y el gorila: ¿cuál es el par de especies más cercanas entre estas tres, partiendo de que el orangután es el pariente más lejano? La pregunta tiene tres respuestas posibles, que son todas ellas hipótesis filogenéticas. En este caso, la evidencia genómica acumulada sugiere que la hipótesis 2 (humano y chimpancé más ceranamente emparentados entre sí que cualquiera de ellos con el gorila) tiene un muy fuerte apoyo, a diferencia de las otras dos hipótesis.

¿Cómo se lee una filogenia ?

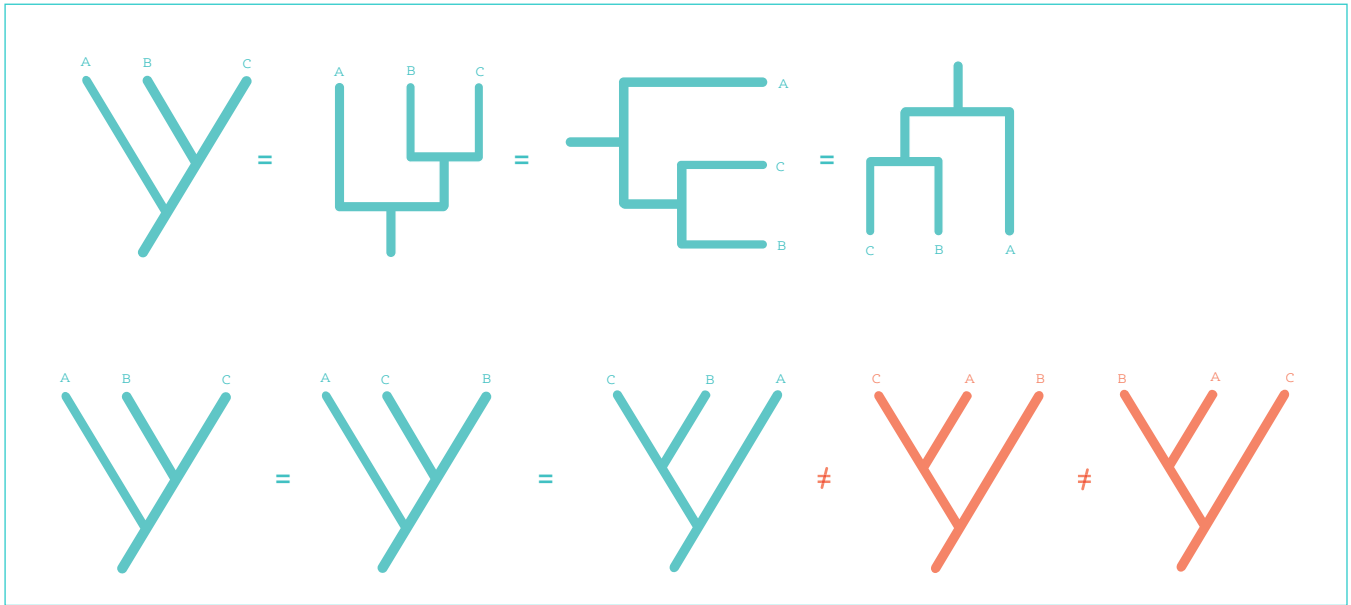


Una filogenia se lee de la **raíz** hacia cada **nodo terminal**, a lo largo de las ramas. Es también posible examinar el árbol desde los nodos terminales hacia la raíz, o examinar solamente partes del árbol. Pero la lectura se hace siempre **a lo largo de las ramas**.

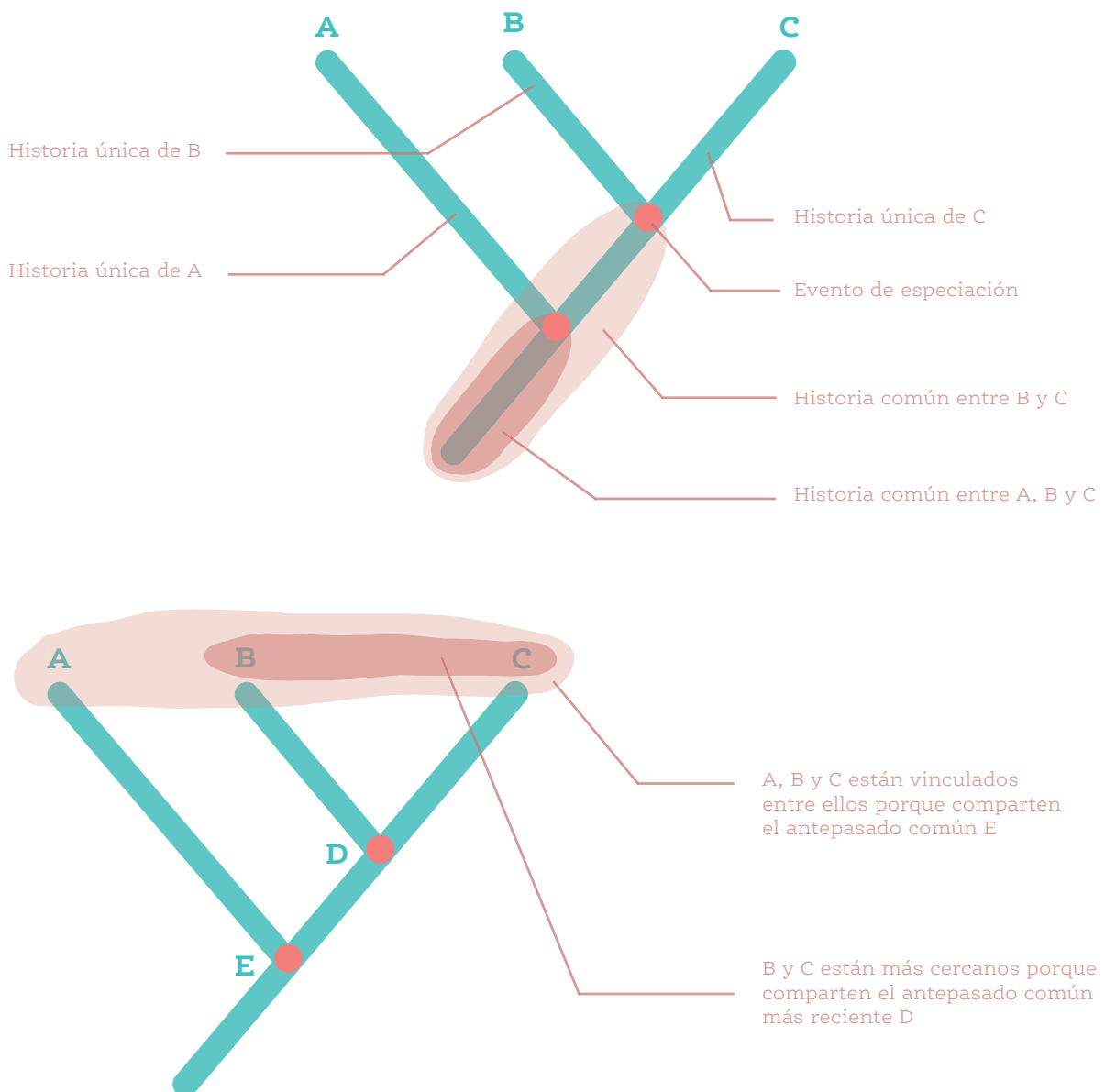
Terminología



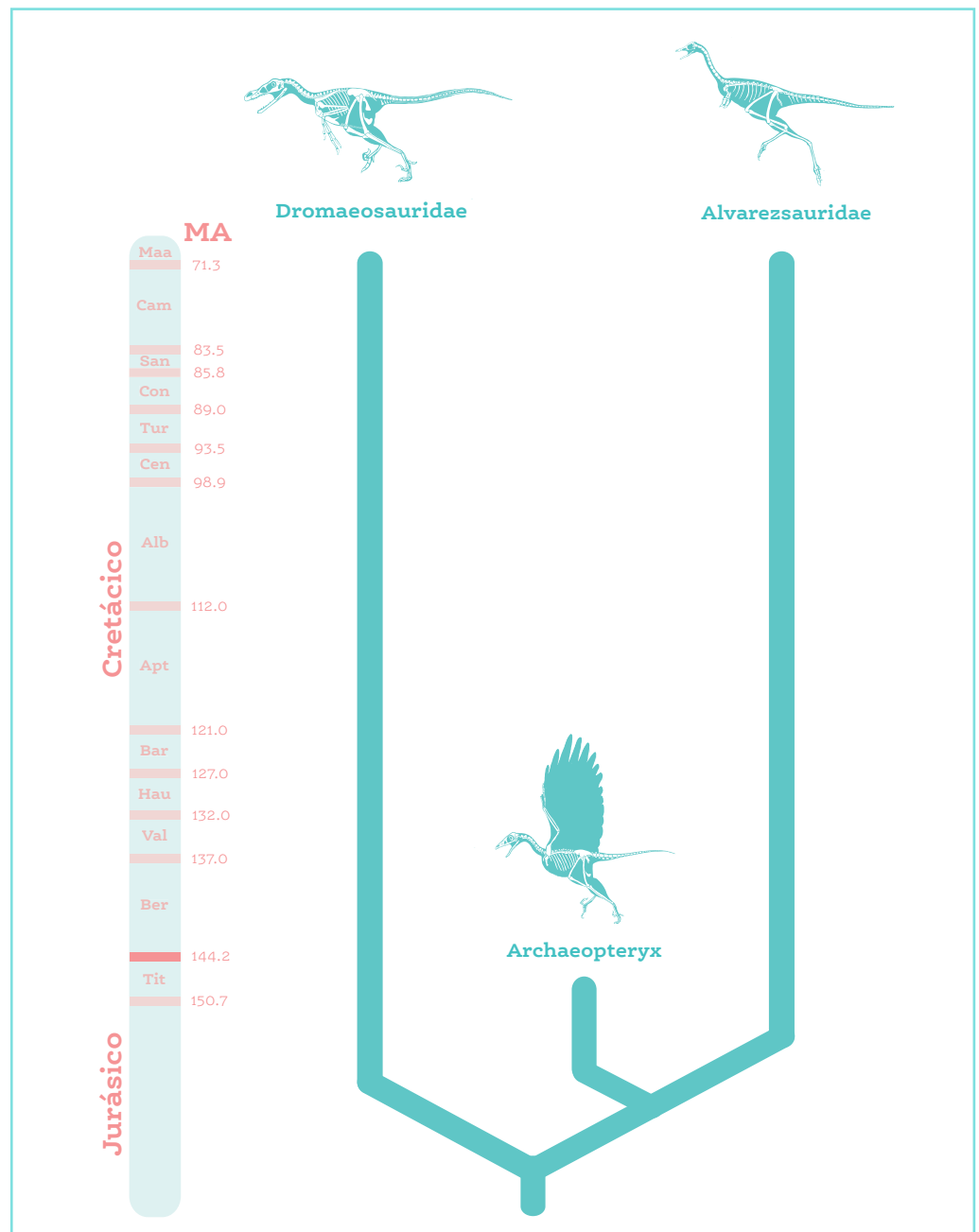
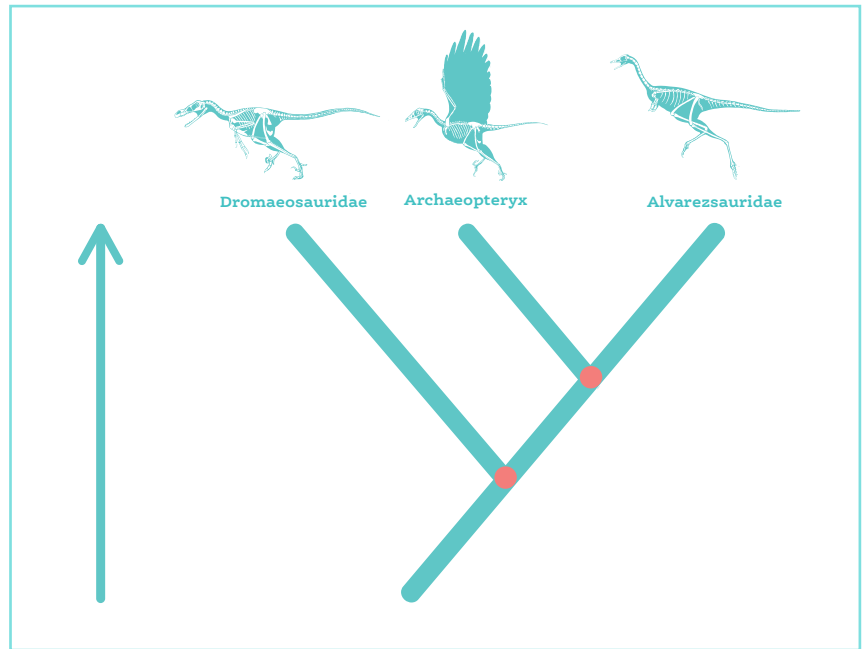
Topología



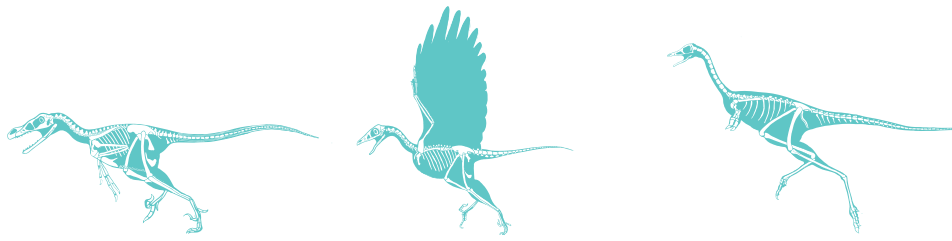
Lectura de un cladograma



Escala temporal



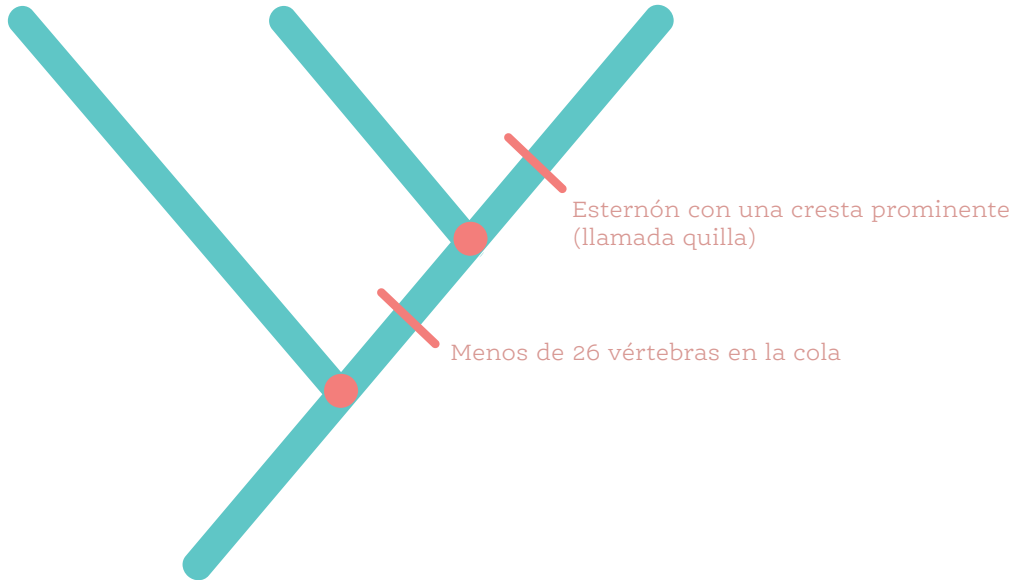
Los cambios



Dromaeosauridae

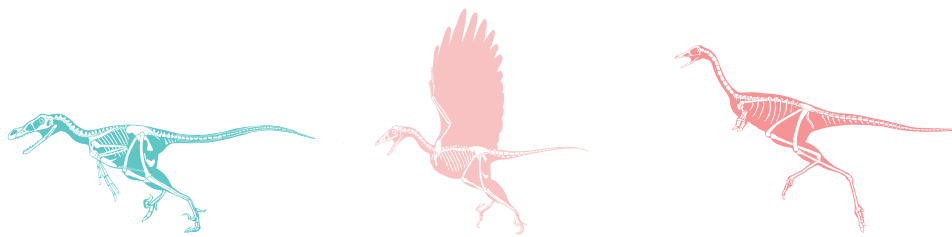
Archaeopteryx

Alvarezsauridae



Esternón con una cresta prominente (llamada quilla)

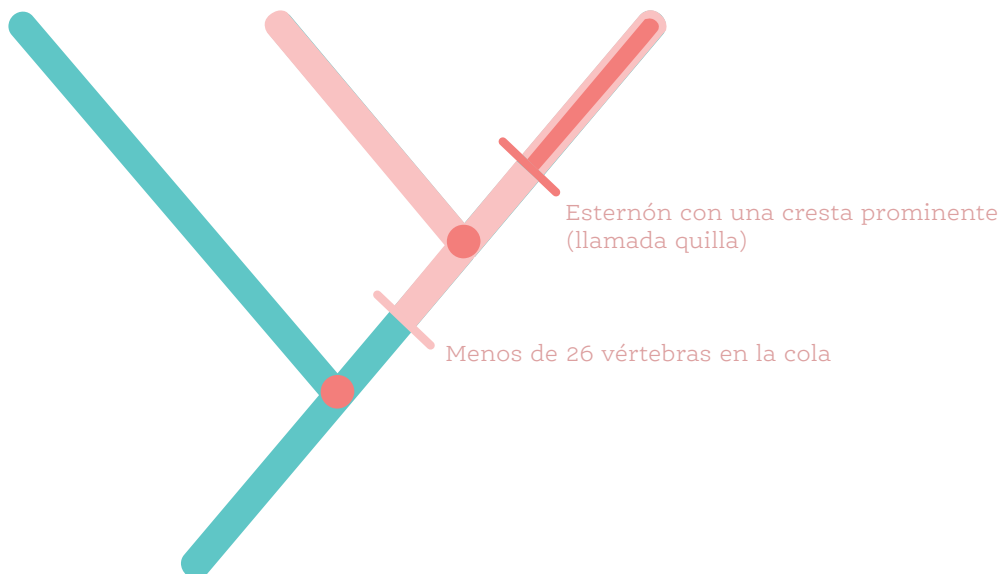
Menos de 26 vértebras en la cola



Dromaeosauridae

Archaeopteryx

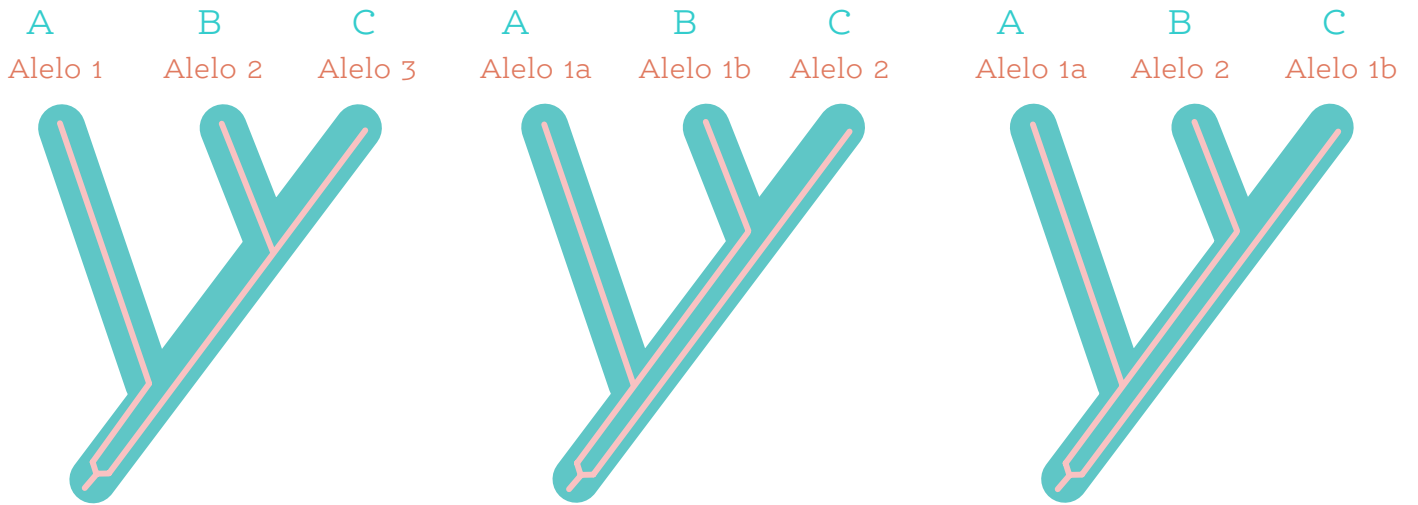
Alvarezsauridae



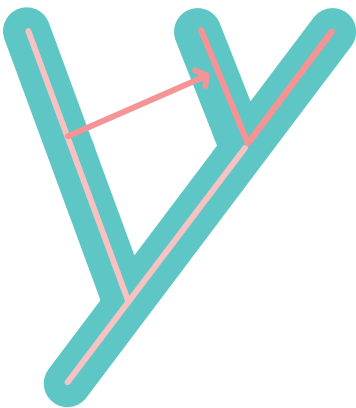
Esternón con una cresta prominente (llamada quilla)

Menos de 26 vértebras en la cola

Árboles de genes y de especies



Transferencia horizontal





Prácticos



Práctico N° 1

Lanzamiento del trabajo final

Con la realización de este ejercicio se pretende que el estudiante demuestre ser capaz de resolver un problema concreto mediante la integración de conocimientos teóricos y herramientas informáticas. Es decir, que se familiarice con todas las etapas de un estudio científico: obtención de datos (en este caso secuencias de ADN a partir de bases de datos), análisis de los mismos, interpretación de resultados y elaboración de un informe con formato de artículo científico.

El trabajo es básicamente un ejercicio filogenético. Durante la elaboración del trabajo los docentes brindarán asistencia técnica, por ejemplo para el uso de los programas, y para ello se implementarán clases de consulta.

El trabajo se realiza en **grupos de 3 personas**; los integrantes de un grupo de trabajo no tienen porqué ser del mismo grupo práctico.

Problema 1

Intercambio faunístico entre Norte y Sudamérica

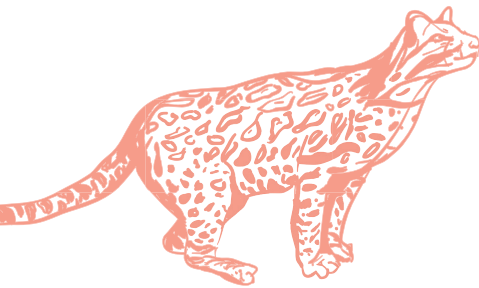
Sudamérica estuvo aislada de otros continentes durante la mayor parte del Cenozoico. Dicho aislamiento se rompió al formarse el Istmo de Panamá hace unos 3,5 millones de años. Dicho evento permitió migraciones entre Sudamérica y el continente norteamericano (incluyendo la mayor parte de Centroamérica, al norte del Istmo de Panamá), bien documentados en mamíferos.

El intercambio fue asimétrico, y resultó principalmente en un influjo de linajes desde el continente norteamericano hacia Sudamérica. Numerosos grupos de mamíferos sudamericanos autóctonos actuales tienen su origen en dicho intercambio. En particular, se han identificado familias enteras de mamíferos que tienen orígenes documentados fuera del continente sudamericano, pero que en la actualidad están presentes y comprenden varias especies en el Sudamérica.

El presente problema consiste en investigar, utilizando secuencias nucleotídicas disponibles en Genbank, dos escenarios alternativos que, en principio, pueden dar cuenta de la diversidad actual de varias de estas familias en Sudamérica:

1. El intercambio involucró varios linajes dentro de cada familia, por lo que la diversidad actual Sudamericana se produjo a partir de más de una especie ancestral.
2. La diversidad actual de cada familia representada en Sudamérica es el producto de la diversificación de un único linaje ancestral por familia.

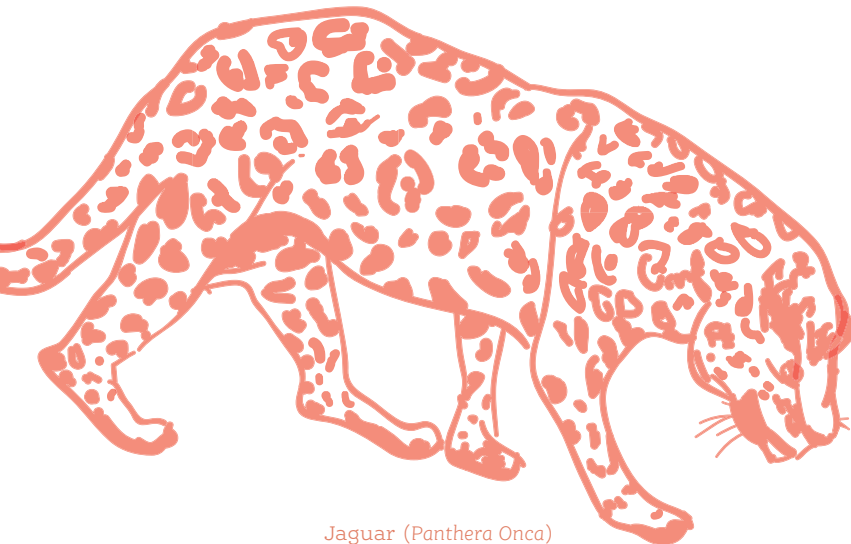
Problema: Mediante el empleo de secuencias de ADN extraídas del GenBank, se propone considerar el problema para el caso de la familia Felidae.



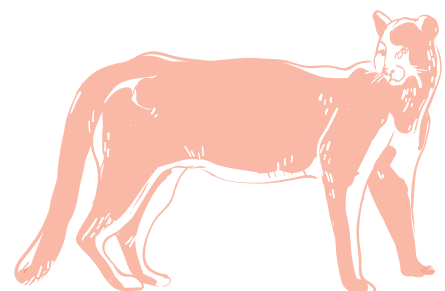
Ocelote (Leopardus Pardalis)



Margay (Leopardus Wiedii)



Jaguar (Panthera Onca)



Puma (Puma Concolor)

CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA DE LA FAMILIA FELIDAE

ORDEN: Carnivora

SUBORDEN: Feliformia

FAMILIA: Felidae

SUBFAMILIA: Felinae

GÉNERO

Acinonyx (Guepardo)



Caracal (Caracal)



Catopuma (e.g. Gato dorado de Asia)



Felis (e.g. Gato doméstico)



Leopardus (Gatos pequeños Americanos)



Leptailurus (Serval)



Lynx (Linces)



Pardofelis (Gato jaspeado)



Prionailurus (Gatos pequeños de Asia)



Profelis (Gato dorado de África)



Puma (Puma y Yaguarundí)



SUBFAMILIA: Pantherinae

GÉNERO

Neofelis (Leopardo nebuloso)



Panthera (Jaguar, Tigre, León y Leopardo)



Uncia (Leopardo de las nieves)



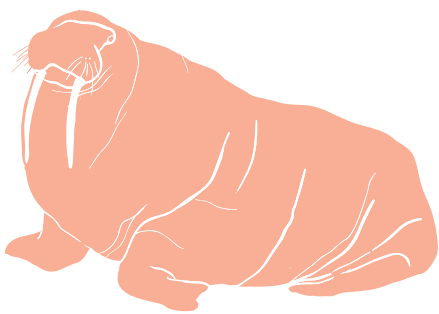
Problema 2

Evaluación de la monofilia de Pinnipedia y de las relaciones filogenéticas con el resto de Carnivora

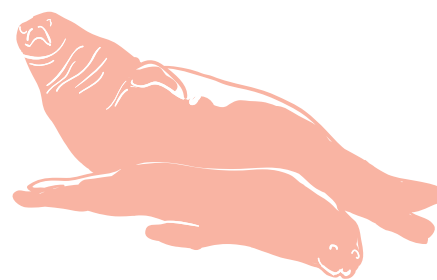
Los pinípedos, grupo formado por las focas (Phocidae), los lobos marinos (Otaridae) y las morsas (Odobenidae), fueron considerados originalmente como un grupo monofilético, clasificado como un suborden (Pinnipedia) hermano de los carnívoros terrestres (Fissipedia), dentro del Orden Carnivora. Este concepto fue cambiando gradualmente con el transcurso del tiempo, dado que la visión morfológica colocaba a las focas (Phocidae) más cercanamente emparentadas a los mustélidos (Mustelidae) y a los lobos marinos (Otaridae) con los osos (Ursidae).

A fines de la década de los 60', V. M. Sarich, basado en distancias inmunológicas, restablece a los pinnípedos como un grupo monofilético. Análisis moleculares posteriores apoyan esta última visión sobre las relaciones filogenéticas del grupo. Sin embargo, aún hoy es objeto de debate cuál familia dentro del orden Carnivora constituye el grupo hermano de los pinípedos, centrándose principalmente este dilema entre los osos y los mustélidos.

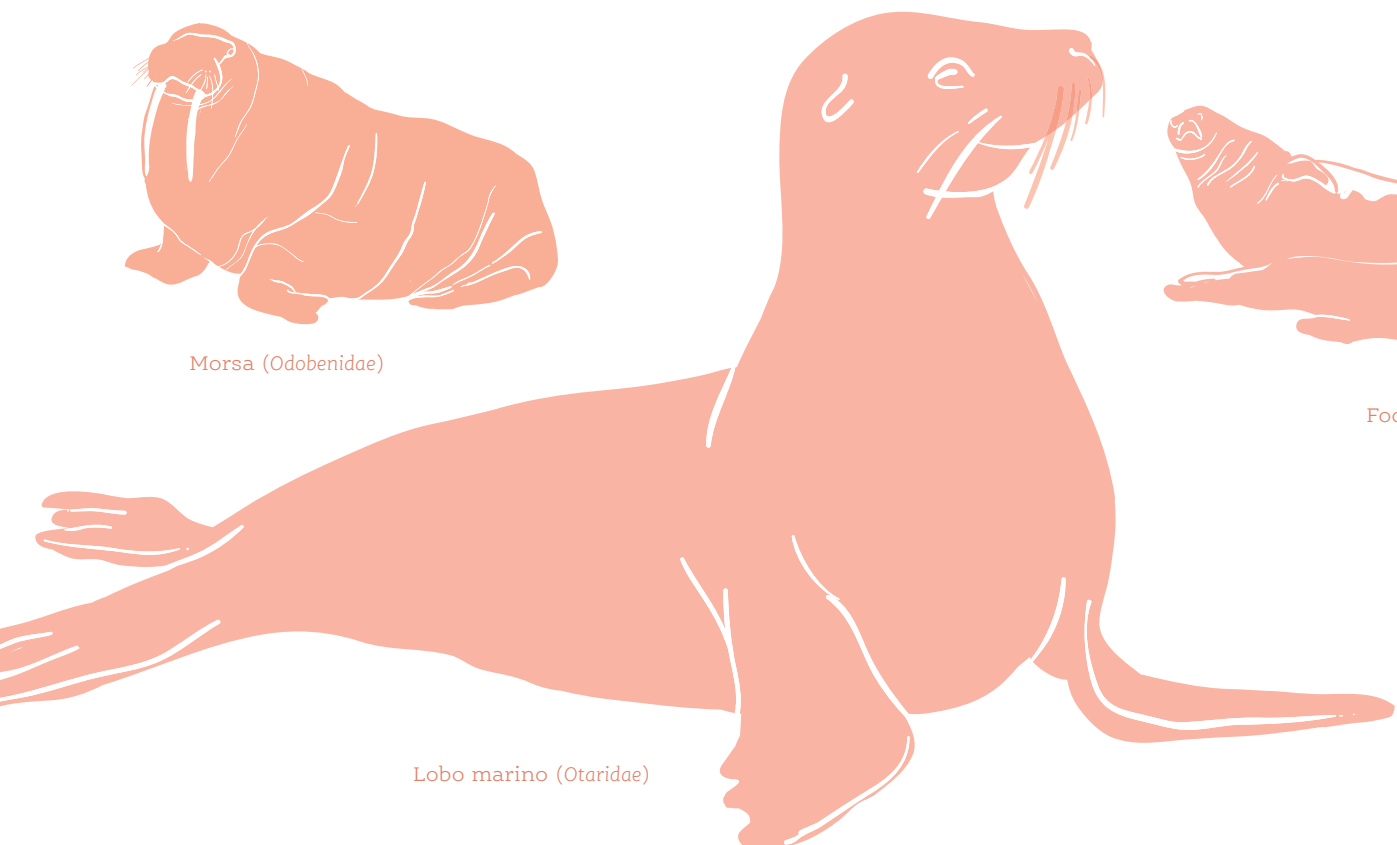
Problema: Dado estos antecedentes, el objetivo principal de este trabajo es poner a prueba la hipótesis de que los pinípedos constituyen un grupo monofilético, y evaluar cual es el grupo hermano de este taxa dentro del orden Carnivora mediante el empleo de secuencias de ADN extraídas del GenBank.



Morsa (Odobenidae)



Focas (Phocidae)



Lobo marino (Otaridae)

Guía para el trabajo final

Un ejemplo de propuesta de trabajo final se titula “Evaluación de la monofilia de Pinnipedia y de las relaciones filogenéticas con el resto de Carnívora”

A modo de introducción al problema se dice que los pinnípedos, grupo formado por las focas (Phocidae), los lobos marinos (Otaridae) y las morsas (Odobenidae), fueron considerados originalmente como un grupo monofilético, clasificado como un suborden (Pinnipedia) hermano de los carnívoros terrestres (Fissipedia), dentro del Orden Carnívora. Este concepto fue cambiando gradualmente con el transcurso del tiempo, dado que la visión morfológica colocaba a las focas (Phocidae) más cercanamente emparentadas a los mustélidos (Mustelidae) y a los lobos marinos (Otariidae) con los osos (Ursidae).

A fines de la década de los 60', V. M. Sarich, basado en distancias inmunológicas, restablece a los pinnípedos como un grupo monofilético. Análisis moleculares posteriores apoyan esta última visión sobre las relaciones filogenéticas del grupo. Sin embargo, aún hoy es objeto de debate cuál familia dentro del orden Carnívora constituye el grupo hermano de los pinnípedos, centrándose principalmente este dilema entre los osos y los mustélidos.

Dado estos antecedentes se plantea el problema, cuyo objetivo principal es poner a prueba la hipótesis de que los pinnípedos constituyen un grupo monofilético, y evaluar cual es el grupo hermano de este taxa dentro del orden Carnívora mediante el empleo de secuencias de ADN extraídas del GenBank.

Considerando este ejemplo, realizar las siguientes actividades.

Entender el problema

- Considerar la hipótesis. Dibujar el árbol esperado en caso de que los pinnípedos formen un grupo monofilético.
- Dibujar un posible árbol a obtener en caso que los pinnípedos no formen un grupo monofilético.
- Dibujar el árbol que espera obtener en caso que Ursidae sea el grupo hermano de Pinnipedia.

Diseño

- Definir los integrantes del Grupo interno o grupo de estudio. Hay un “mínimo” de diversidad filogenética que deberá ser incluida para realizar una puesta a prueba adecuada de la hipótesis. Por ejemplo, si se quiere poner a prueba la monofilia de los mamíferos placentados, debe incluirse una buena representación de la diversidad de este grupo, incluyendo preferentemente representantes de todos los órdenes, en vez de muchas especies dentro de pocos órdenes. Cumplido este requisito, se sabe que la densidad taxonómica (la inclusión de muchos taxones) es también importante para la reconstrucción filogenética.

- Definir un posible Grupo externo. Recordar que el grupo externo debe estar “por fuera” del grupo de estudio (o sea, el grupo interno no puede ser parafilético respecto al grupo externo). También es deseable que el grupo externo esté lo más cercanamente emparentado al grupo de estudio que sea posible; idealmente se utiliza como grupo externo al grupo hermano del grupo de estudio.

Datos

- Acceder a la base de datos GenBank en página del NCBI (National Center for Biotechnology Information). www.ncbi.nlm.nih.gov

- Buscar una secuencia de nucleótidos de lobo marino *Arctocephalus australis* restringiendo la búsqueda a la base de datos de nucleótidos (cambiar la opción "All Databases" que viene por defecto).



- Los resultados de la búsqueda se pueden mostrar de distintas formas. Ver el formato Genbank e identificar el trabajo que generó esa secuencia.



- Elegir tres secuencias (haciendo clic en las cajas), enviarlas a un bloc de notas (send to clipboard) y verlas en formato FASTA (text).

Recomendaciones

- Evitar usar secuencias de genes no codificantes (ej., región de control), o que codifiquen para el ARN ribosomal; el alineamiento de éstas es, en general, bastante complicado.

- Se sugiere utilizar secuencias codificantes, independientemente de si son nucleares o mitocondriales, tanto en forma individual como una concatenación de las mismas.

- Recordar que el análisis de un mayor número de taxa requiere de mayor cantidad de caracteres para su resolución, y muchas veces se necesita probar más de una base de datos para encontrar la adecuada. La elección de la base de datos a usar lleva tiempo.

- Usar un gen cuya tasa de evolución se adecue al problema a tratar (ej. una región hipervariable no es buena para estudiar la radiación de los órdenes de mamíferos, aunque podría serlo para estudiar relaciones dentro de una especie o entre especies muy cercanas).

Análisis

El programa que se usará para el alineamiento de secuencias y la reconstrucción filogenética será MEGA, disponible en <http://www.megasoftware.net/>

Alineamiento

- Abrir el programa. Ir a la opción alignment/ query databanks. Buscar secuencias del género *Otaria*. Seleccionar las primeras 5 y adicionarlas al alineamiento (add to alignment). ¿A qué gen pertenecen y cuántos pares de bases tiene la secuencia?

- Una vez que MEGA avisa que incorporó las secuencias correctamente, mirar la ventana del explorador de alineamiento (alignment explorer). ¿Qué señalan los asteriscos? Describir el primer sitio que no está marcado con un asterisco. Guardar el alineamiento como archivo MEGA.

- Buscar nuevamente secuencias del género *Otaria*. Alinear 3 genes distintos disponibles. Observar sitios variables y conservados.

Recomendaciones

- Asegurarse que las secuencias representativas de cada taxon sean homólogas (mismo gen, misma región del gen). El algoritmo del programa le brindará un alineamiento siempre, incluso, por ejemplo, si está alineando el citocromo b de una especie con el gen de la insulina de otra especie.

- Tratar de trabajar con secuencias de la misma longitud.

- Si se está trabajando con secuencias codificantes (en estos casos lo deseable) corroborar que el alineamiento resultante no haya alterado el marco de lectura del gen. Es decir que los tripletes (codones) no se pueden ver alterados; si hay inserciones o deleciones éstas deben de ser de tres nucleótidos o en múltiplos de tres. Recordar que los exones no tienen otros tipos de “gaps”.

Reconstrucción filogenética

- Abrir el archivo MEGA (.meg) generado. Cerrar el visor de datos, ir a Phylogeny/ Construct Phylogeny/ Maximum Parsimony. Identificar largo del árbol y número de árboles obtenidos.

Recomendaciones

- Usando Máxima Parsimonia, si se realizan búsquedas heurísticas realizar un “buen” número de réplicas (con los taxones adicionados al azar) para así asegurarse una buena exploración del universo de árboles posibles. Sin embargo, recordar que el tiempo que demora el análisis dependerá, entre otras cosas, del número de réplicas. Otros factores que afectan el tiempo de la búsqueda son la cantidad de taxones y el grado de homoplasia existente en la matriz.

- Fijarse el número de árboles más parsimoniosos obtenidos. En caso de que haya más de uno, reportar la cantidad y el consenso de los mismos.

- Reportar el largo del (de los) árbol(es) más parsimonioso(s).

- En general es de interés evaluar qué “tan bueno” es el árbol más parsimonioso o el consenso de los mismos. Para esto, por ejemplo, se puede utilizar el índice de consistencia. Por otra parte, para evaluar el soporte estadístico de cada nodo de nuestro árbol, se puede utilizar el método de remuestreo de bootstrap. En este análisis use un número relativamente alto de pseudoréplicas. Aquí también recuerde que el tiempo que demorará el análisis dependerá, entre otras cosas, del número de pseudoréplicas.

Redacción del informe

El informe debe tener formato de artículo científico. Se debe usar lenguaje neutro-formal y se deben incluir las siguientes secciones:

Introducción : en esta sección se presenta el marco general del tema, se presentan los antecedentes generales y específicos, yendo de lo general a lo particular. Finalmente, se explicitan los objetivos del trabajo.

Materiales y métodos : en esta sección se hace una descripción de los procedimientos o métodos utilizados. Recuérdese que esta información debería ser lo suficientemente detallada como para que una tercera persona pueda repetir sus experimentos o análisis.

Resultados : en esta sección se presentan y describen los resultados. Las tablas, gráficos y figuras deben estar numeradas y contener leyendas explicativas (en la parte superior para las tablas y en la parte inferior para las figuras y gráficos). El texto de esta sección debe describir toda tabla, gráfico y/o figura incluida, haciendo referencia a los números. Tener en cuenta que, en general, la inclusión de figuras y/o tablas ayudan en la comprensión del trabajo.

Discusión y conclusiones : en esta sección se analizan en forma profunda los resultados, se comparan con las predicciones de la/las hipótesis a testar, y en base a ello se toma la decisión de rechazarla/s o no. Se pueden retomar elementos teóricos o antecedentes presentados en la introducción, o incluir nuevos elementos. Se espera que la discusión refleje en forma clara los resultados obtenidos y la forma en que los mismos, sumados a otros elementos (evidencia previa, por ejemplo), permiten evaluar la/las hipótesis puestas a prueba. Opcionalmente estos dos puntos pueden constituir secciones separadas, en cuyo caso, las conclusiones serán cortas, y sólo una reafirmación de los puntos principales de la discusión.

Bibliografía : en esta sección deben incluirse todos los materiales citados en el texto (y solamente esos materiales). En caso de utilizar programas, se deben incluir las citas correspondientes a los mismos. Se deben incluir las CITAS COMPLETAS, en orden alfabético en primer lugar y luego por orden de publicación. Todas deben tener el mismo formato : en este caso, al formato a seguir se detalla a continuación, dependiendo de qué material se trate.

1. Artículo de revista científica :

Autores. Año. Título del artículo. Nombre de la revista, Volumen: páginas. Ejemplo: Rogers, A.R. and H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9:552-569.

2. Capítulo de un libro (para libros en los que los diferentes capítulos tienen distintos autores) :

Autores. Año. Título del capítulo. Páginas del capítulo. Editores, Nombre del libro. Editorial. Ejemplo: Busch C., C.D. Antinuchi, J.C. del Valle, M.J. Kittlein, A.I. Malicia, A.I. Vasallo and R.R. Zenuto. 2000. Population ecology of subterranean rodents. Pp. 183-226 in E.A. Lacey, J.L. Patton and G.N. Cameron, eds. *Life Underground: the Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago, USA.

3. Libro (para el caso anterior o para libros escritos enteramente por el/los mismos autores) :

Autores. Año. Título del libro. Editorial. Número total de páginas. Ejemplo: Li, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer, Sunderland Massachusetts, USA. 487 pp.

4. **Sitios web**: incluir la referencia completa en el texto del trabajo (ej. <http://megasoftware.net/>) sin incluirlo en la bibliografía. Si los autores de la página solicitan que se los cite con otra referencia, hacerlo con el formato correspondiente (ej., MEGA sugiere la cita siguiente para el software: Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, and Kumar S (2013) **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729, que se puede adaptar al formato sugerido más arriba para artículo de revista científica).

Es importante verificar que las citas en el texto tengan su referencia completa en esta sección, y que todas las referencias en esta sección estén nombradas en el texto.

A lo largo del informe, recordar que las CITAS EN EL TEXTO van entre paréntesis, en el lugar adecuado, de la siguiente forma:

- si el trabajo tiene uno o dos autores, usar apellidos y año de publicación;

Ejemplos: La estructura del ADN fue descrita por Watson y Crick (1953). Las dos cadenas del ADN son complementarias (Watson y Crick, 1953).

- si el trabajo tiene tres o más autores, usar (apellido 1 et al., año)

Ejemplo: Se utilizó el software MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

Apéndice : Incluir los alineamientos usados en el trabajo y, si así lo desea, algunas de las salidas de los principales análisis.

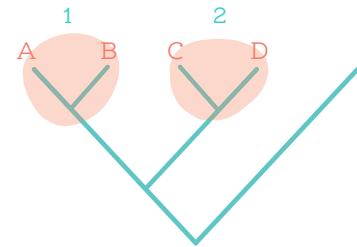
Consideraciones generales : es recomendable realizar el trabajo de a poco, tomándose tiempo para entender cada etapa. Tener en cuenta que por tratarse de una primera aproximación a las herramientas y a la interpretación de resultados puede consumir más tiempo del pensado de antemano.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Análisis filogenético: glosario de términos

Grupo extero

Grupo no incluido en el grupo de estudio y que se supone filogenéticamente fuera éste, seleccionado a fin de determinar el estado primitivo de un carácter o a la raíz de un árbol.



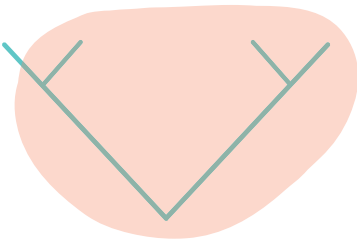
Grupo hermano

En el diagrama, A y B son grupos hermanos dentro de 1, C y D son grupos hermanos dentro de 2; a su vez, 1 y 2 son grupos hermanos.



Grupo monofilético

Grupo taxonómico compuesto por una especie ancestral y todas sus especies descendientes.

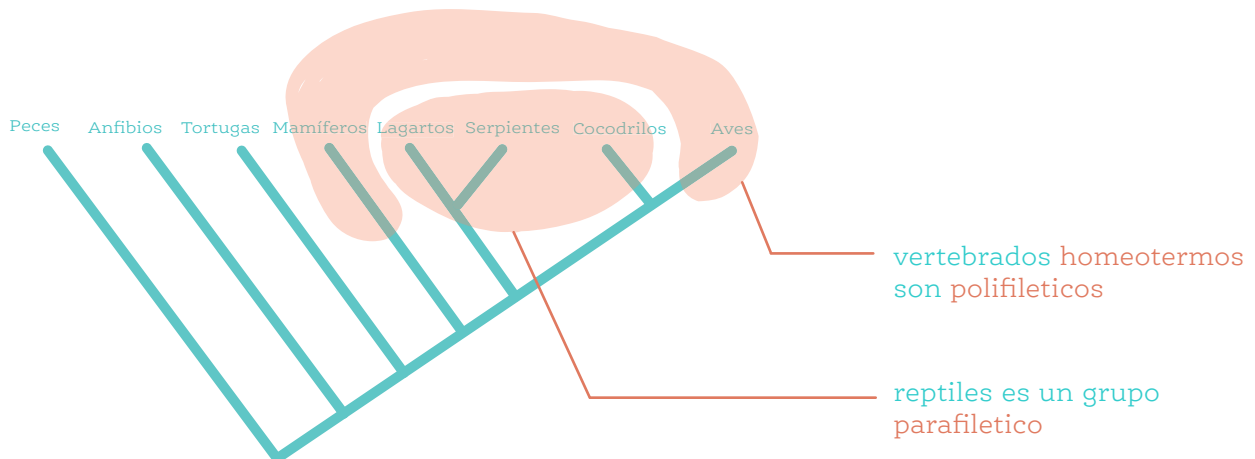
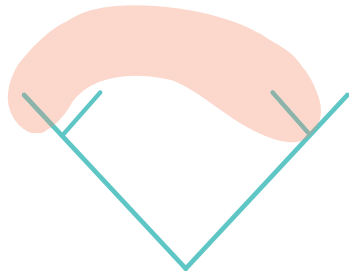


Grupo parafilético

Grupo que incluye a un ancestro y a un conjunto incompleto de descendientes.

Grupo polifilético

Grupo artificial que contiene algunos de los descendientes de un ancestro y no contiene al ancestro.



vertebrados homeotermos son polifiléticos

reptiles es un grupo parafilético

OTU (Operational Taxonomic Unit), TAXÓN

Nombre que se le asigna de manera general a las unidades de análisis.

Carácter variable

Carácter con más de un estado.

Carácter informativo

Carácter que apoya a algún/os agrupamiento/s por encima de otro/s en un análisis por parsimonia. En la práctica, un carácter informativo debe tener al menos dos estados, cada uno representado en al menos dos taxa.

Apomorfía

Estado derivado de un carácter.

Sinapomorfía

Apomorfías compartidas por varios taxones.

Plesiomorfía

Estado primitivo o ancestral de un carácter.

Simplesiomorfía

Plesiomorfías compartidas por varios taxones.

Autapomorfía

Apomorfía que sólo se encuentra en uno de los taxones terminales, por lo tanto es diagnóstica de dicho grupo.

Polaridad

Dirección de la secuencia teórica de transformaciones de estados de caracteres.

Homología

La presencia de estados de carácter compartidos por haber sido heredados de un ancestro común.

Homoplasia

Relación de semejanza entre estructuras o caracteres entre individuos o especies, presentes en cada uno de ellos, debido al surgimiento independiente de modificaciones que se resultan semejantes en su forma final, o a reversiones al estado ancestral.

	¿ informativos ?		
	si	no	no
sp1	A	A	A
sp2	A	T	T
sp3	T	T	C
sp4	T	T	C

Índice de consistencia (CI)

Es una forma de evaluar la calidad del árbol en relación a la base de datos. Se calcula como S/M , siendo S el número de pasos del árbol y M el número mínimo de pasos que esa matriz de datos requeriría sin homoplasia. S es un valor empírico, que depende de la topología a evaluar, mientras M es un valor teórico que se calcula como $M = \sum (p_i - 1)$, siendo p el número de estados para cada carácter i de la base de datos. El CI varía entre 0 y 1, siendo 1 cuando no hay homoplasia, es decir, cuando no hay conflicto entre caracteres.

Índice de homoplasia (HI)

Es el complemento del índice de consistencia ($HI = 1 - CI$) e indica el grado de homoplasia del árbol en relación a la base de datos.

Parsimonia

Criterio metodológico de decisión por el cual las especies son arregladas en la filogenia, considerando que el mejor árbol es el que requiere para su construcción, el menor número de pasos.

Trabajos finales

1. La colonización del Nuevo Mundo por los roedores caviomorfos

Los caviomorfos comprenden un diverso conjunto de roedores, principalmente sudamericanos (algunos alcanzan América del Norte y algunas islas del Caribe), incluyendo al carpincho, tucutucus, ratas espinosas, nutria, apereás, y varios otros grupos. Los caviomorfos totalizan algo más de 200 especies vivientes que se clasifican en unas 12 familias. Los caviomorfos aparecen por primera vez en el registro fósil sudamericano en el Oligoceno temprano, hace unos 31 millones de años. El origen, identidad filogenética, y relaciones de los caviomorfos con otros roedores han sido ampliamente debatidos. Entre los puntos que deben considerarse para estudiar este problema se incluyen:

a) Los caviomorfos tienen una morfología mandibular llamada histricognata (véase Reig, 1981); condición que comparten con otros roedores, a veces llamados fionorfos, del viejo mundo. La hipótesis de que todos los roedores que comparten la condición histricognata son un grupo monofilético ha sido fuertemente corroborada recientemente.

b) El ancestro de los caviomorfos fue un taxon del Viejo Mundo.

c) Algunos autores postulan que los caviomorfos se originaron a partir de una única colonización del Nuevo Mundo, mientras que otros sugieren que se han originado a partir de más de una ola invasora al Nuevo Mundo.

d) Más en general, las relaciones entre caviomorfos y las restantes familias de histricognatos son debatidas. Estas relaciones son importantes en sí mismas, y también por lo que implican respecto al número de linajes que colonizaron Sudamérica, y al origen de dichos linajes (África, Asia).

Problema: utilizando como evidencia secuencias nucleotídicas disponibles en Genbank poner a prueba las hipótesis sobre el número de linajes de caviomorfos que colonizaron el Nuevo Mundo.

Esta es una clasificación de los histricognatos, tomada de Woods (1993):

Suborden Hystricognathi
Fam. Bathyergidae ratas topo africanas
Fam. Hystricidae puercoespines del viejo mundo
Fam. Petromuridae ratas de las piedras
Fam. Thryonomidae ratas del bambú
Fam. Erethizontidae puercoespines del nuevo mundo
Fam. Chinchillidae chinchillas
Fam. Caviidae apereás, liebres patagónicas
Fam. Hydrochaeridae carpincho
Fam. Dasyproctidae agutis
Fam. Agoutidae pacas
Fam. Ctenomyidae tucu-tucus
Fam. Octodontidae degu, coruro, ratas vizcachas
Fam. Abrocomidae "chinchillas"
Fam. Echimyidae ratas espinosas
Fam. Capromyidae hutias
Fam. Heptaxodontidae hutias

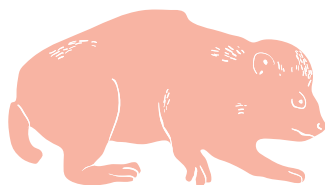
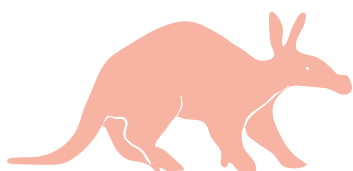
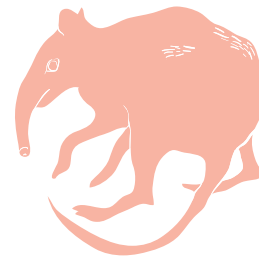
Reig, O. A. (1981). Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur. *Monographiae Naturae* 1, 1–182.

Woods, C.A. (1993). Suborder Hystricognathi. En: Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (eds.) *Mammal Species of the World*, Second Edition. Smithsonian Institution Press, Washington and London.: 771-806.

2. La radiación de los mamíferos placentados: el clado Afrotheria

Las más de 4500 especies vivientes de mamíferos placentados se agrupan en alrededor de 20 órdenes (ej.: Carnivora, Cetartiodactyla, Chiroptera, Dermoptera, Hyracoidea, Lagomorpha, Perissodactyla, Pholidota, Primates, Proboscidea, Rodentia, Scandentia, Sirenia, Xenarthra). A lo largo de los últimos 250 años estos órdenes se han agrupado en distintos y variados superórdenes. Recientemente se ha hipotetizado la existencia de un superorden que reúne los siguientes seis órdenes: Proboscidea (elefantes), Sirenia (manatíes), Hyracoidea (damanes o procavias), Tubulidentata (cerdo hormiguero), Macroscelidea (musarañas elefantes) y Afrosoricida o Tenrecomorpha (tenrecs y topos dorados). Estos órdenes, que son primariamente africanos, se consideraban tradicionalmente como distantemente relacionados entre sí. El superorden en cuestión ha sido nominado Afrotheria. La existencia de Afrotheria implica que ciertos grupos de mamíferos reconocidos tradicionalmente no son monofiléticos. Por ejemplo, típicamente los proboscídeos, hyracoideos y tubulidentados se clasificaban en un superorden junto a los perisodáctilos y artiodáctilos. De forma similar, los topos dorados y los tenrecs se clasificaban junto a las musarañas verdaderas y los restantes topos en el orden Insectivora (o Lipotyphla). Por último, las musarañas elefantes se consideraban emparentadas a los roedores y lagomorfos. Al mismo tiempo, la hipótesis Afrotheria sugiere que alrededor de un tercio de los órdenes de mamíferos placentados habrían radiado en África, después de que este continente quedo aislado luego de la fragmentación de Gondwana. De esta forma, se ve enfatizada la importancia de la tectónica de placas en la diferenciación de los placentados.

Problema: Realizar un análisis filogenético, basado en secuencias de ADN extraídas de GenBank, para poner a prueba las hipótesis sobre la validez de Afrotheria y, más en general, evaluar las implicancias biogeográficas de la filogenia obtenida.



3. El origen de los cetáceos

Uno de los grupos más diversos de mamíferos lo constituyen los cetáceos, que tradicionalmente se dividen en Mysticeti (ballenas propiamente dichas) y Odontoceti (cetáceos con dientes). Debido a lo dramático de las transformaciones que implica la transición hacia una vida en el agua, el origen de los cetáceos ha concitado gran atracción de los biólogos (incluyendo a los paleontólogos). Al mismo tiempo, el origen de este grupo ha sido, y es, centro de gran controversia*. Tradicionalmente se ha considerado que los cetáceos están cercanamente emparentados con los Artiodactyla; el debate sobre el origen del grupo gira en torno a la naturaleza de esta relación. La visión tradicional sugiere que los cetáceos se habrían originado a partir de los Mesonychidae, un grupo ya extinto de artiodáctilos carnívoros; es así que bajo esta teoría los cetáceos formarían un grupo monofilético, el cual es hermano de los artiodáctilos vivientes. Sin embargo, una nueva teoría sugiere que los cetáceos, que forman un grupo monofilético, serían hermanos de los hipopótamos, un grupo particular de Artiodáctilos. Es decir que, desde el punto de vista filogenético, los artiodáctilos serían parafiléticos con respecto a los cetáceos; a este clado se lo llama Cetartiodactyla.

Problema: Realizar un análisis filogenético, basado en secuencias de ADN extraídas de GenBank, para poner a prueba las hipótesis sobre las relaciones filogenéticas entre cetáceos y artiodáctilos.

Clasificación tradicional

Orden	Suborden	Familia	Representantes
Cetacea	Odontoceti (con dientes)	Iniidae *	Delfín del Amazonas
		Lipotidae *	Delfín de la China
		Pontoporiidae *	Franciscana
	Misticeti (sin dientes)	Delphinidae	Delphines
		Phocoenidae	Marsopas
		Monodontidae	Narvales y Beluga
		Ziphiidae	Zífidos
		Physeteridae	Cachalote
		Eschrichtidae	
		Balaenopteridae	Ballenas
		Balaenidae	
		Neobalaenidae	
		Artiodactyla	Suiformes
Tayassuide	Pecaríes		
Hippopotamidae	Hipopótamos		
Tylopoda Rummiantia	Camelidae		Llama, camello
	Tragulidae		Ciervos ratones
	Moschidae		Ciervos almizcleros
	Cervidae		Ciervos
	Giraffidae		Girafa, okapi
	Antilocapridae		Pronghorn
	Bovidae		Vaca, gacelas

* delfines de agua dulce

Información adicional en :

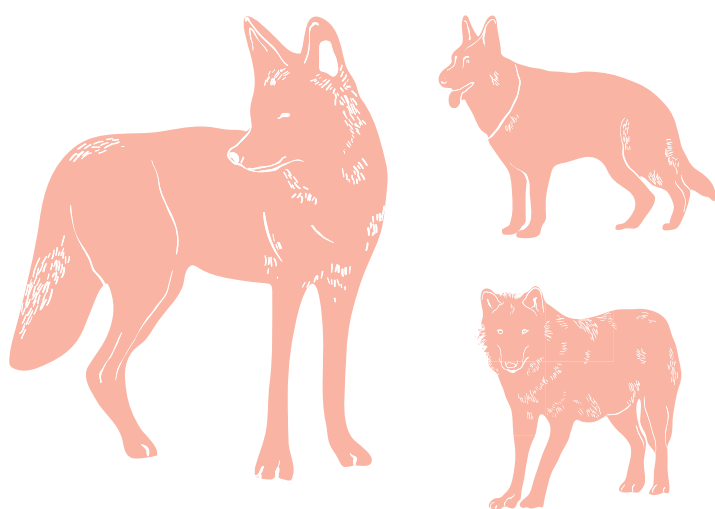
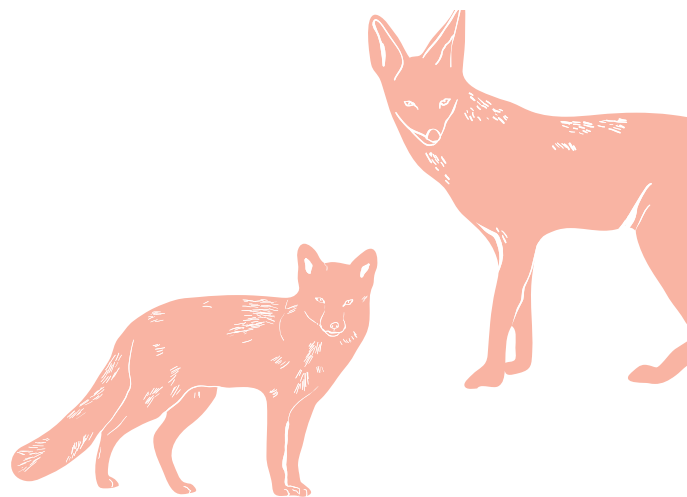
<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mammalia.html>

4. Intercambio faunístico entre Norte y Sudamérica

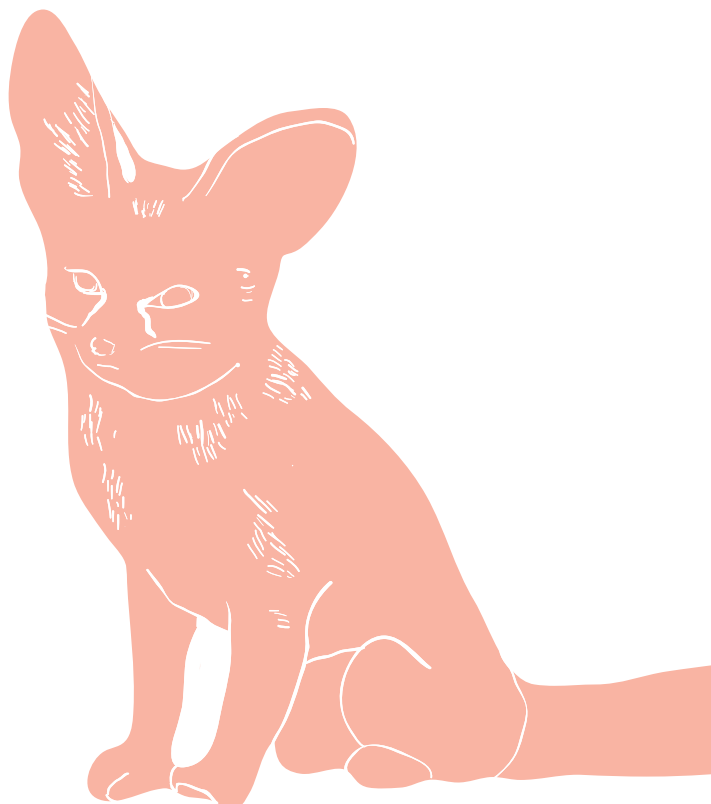
Sudamérica estuvo aislada de otros continentes durante la mayor parte del Cenozoico. Dicho aislamiento se rompió al formarse el Istmo de Panamá hace unos 3,5 millones de años. Dicho evento permitió migraciones entre Sudamérica y el continente norteamericano (incluyendo la mayor parte de Centroamérica, al norte del Istmo de Panamá), bien documentados en mamíferos. El intercambio fue asimétrico, y resultó principalmente en un influjo de linajes desde el continente norteamericano hacia Sudamérica. Numerosos grupos de mamíferos sudamericanos autóctonos actuales tienen su origen en dicho intercambio. En particular, se han identificado familias enteras de mamíferos que tienen orígenes documentados fuera del continente sudamericano, pero que en la actualidad están presentes y comprenden varias especies en el Sudamérica. El presente problema consiste en investigar, utilizando secuencias nucleotídicas disponibles en Genbank, dos escenarios alternativos que, en principio, pueden dar cuenta de la diversidad actual de varias de estas familias en Sudamérica:

1. El intercambio involucró varios linajes dentro de cada familia, por lo que la diversidad actual Sudamericana se produjo a partir de más de una especie ancestral
2. La diversidad actual de cada familia representada en Sudamérica es el producto de la diversificación de un único linaje ancestral por familia.

Se propone considerar el problema para el caso de la familia Canidae, partiendo de la base de que los parientes vivientes más cercanos a los cánidos sudamericanos se encuentran entre las especies del continente norteamericano.



Géneros actualmente incluidos dentro de la familia Canidae: *Atelocynus* (SA), *Canis* (WW, origen posible AN), *Chrysocyon* (SA), *Cuon* (AS), *Dusicyon* (SA), *Lycalopex* (SA), *Lycaon* (AF), *Nyctereutes* (AS), *Otocyon* (AF), *Speothos* (SA), *Urocyon* (AC, SA y NA) y *Culpes* (AF, EU, AS y AN). Géneros de cánidos según Wilson y Reeder (1993). Donde SA = América del Sur, AN = América del Norte, AF = África, EU = Europa, AS = Asia y WW = distribución mundial.



5. El Origen del infraorden Platyrrhini y las relaciones filogenéticas entre sus miembros

El orden primates con 233 especies es el quinto orden de placentados con mas especies, solo superado por Rodentia, Chiroptera, Insectivora y Carnivora. Los monos del nuevo mundo (MNMs) habitan exclusivamente en America Central y del Sur y se asignan al infraorden Platyrrhini (Superfamilia Ceboidea), el cual a su vez se divide en tres familias (Atelidae, Cebidae, y Pitheciidae) y 14 o 15 géneros.

1) En primer lugar se presenta un problema que consiste en investigar, dos escenarios que pueden dar cuenta de la diversidad del infraorden:

a. La diversidad actual del infraorden Platyrrhini es producto de la colonización Sudamericana de una única especie ancestral.

b. La diversidad actual del infraorden Platyrrhini es el producto de la diversificación de un único linaje ancestral por familia.

Al mismo tiempo la sistemática de los MNMs ha estado sujeta a debate durante las últimas tres décadas. Todas las propuestas se basan principalmente en estudios morfológicos y ecológicos. Muchos autores acuerdan en que en la existencia de tres clados monofiléticos: los monos grandes con cola prensil (géneros *Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix*, y *Brachyteles*), los monos comedores de semillas (géneros *Pithecia*, *Chiropotes*, y *Cacajao*) y los pequeños monos con garras (géneros *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callithrix*, y *Cebuella*), pero desacuerdan en el orden de ramificación entre estos clados. La ubicación del genero *Aotus* (monos de la noche) es otro punto en discusión.

2) Se plantea, entonces, un segundo problema relacionado, que consiste en investigar, la sistemática interna del infraorden.

Ambos problemas pueden ser abordados, utilizando secuencias nucleotídicas disponibles en Genbank.



Enrique P. Lessa
Ivanna H. Tomasco
Alejandro D'Anatro
Departamento de Ecología y Evolución
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Montevideo
Uruguay

Ilustraciones y diseño gráfico : Marianne Tricot
mariannetricot@gmail.com

