

1993

Morfología y moléculas: bases complementarias de la sistemática moderna

Rafael O. de Sá

University of Richmond, rdesa@richmond.edu

David M. Hillis

Follow this and additional works at: <http://scholarship.richmond.edu/biology-faculty-publications>Part of the [Biology Commons](#), [Molecular Biology Commons](#), and the [Structural Biology Commons](#)

Recommended Citation

de Sá, Rafael O., and David M. Hillis. "Morfología y moléculas: bases complementarias de la sistemática moderna." *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* 8 (1993): 19-29.

This Article is brought to you for free and open access by the Biology at UR Scholarship Repository. It has been accepted for inclusion in Biology Faculty Publications by an authorized administrator of UR Scholarship Repository. For more information, please contact scholarshiprepository@richmond.edu.

CONFERENCIA

MORFOLOGIA Y MOLECULAS: BASES COMPLEMENTARIAS DE LA SISTEMATICA MODERNA

Rafael O. de Sá* y David M. Hillis*

RESUMEN

El auge de las técnicas moleculares en las últimas dos décadas ha traído nuevos enfoques en los estudios sistemáticos. Aquí presentaremos una revisión del uso, las aplicaciones, y los problemas de las principales metodologías de trabajo. Cada una de estas técnicas es aplicable a algunos problemas e inapropiada para otros, y es importante entender las suposiciones y limitaciones de cada técnica. Concluimos que el uso combinado de los enfoques morfológicos y moleculares otorga mejor resolución a los problemas sistemáticos.

ABSTRACT

The development of molecular techniques during the last two decades has brought new approaches to the analysis of systematic problems. Here we present a review of the uses, applications, and problems of each of the major different methodologies. Each technique is useful for some problems but inappropriate for others, and it is important to realize the assumptions and limitations of each technique. We argue that a combined approach of morphological and molecular techniques provides the best resolution of systematic problems.

INTRODUCCION

La ciencia de la clasificación despertó interés desde los tiempos de Aristóteles. Esta ciencia no ha permanecido estática sino que ha renovado y reevaluado sus bases filosóficas creando una metodología de trabajo estricta.

Los estudios morfológicos, embriológicos y de anatomía comparada, han sido pioneros y fundamentales en la búsqueda de las relaciones evolutivas de los organismos. La sistemática de este siglo se caracteriza por el desarrollo de clasificaciones basadas en las relaciones genealógicas de los organismos (excepto la escuela fenética que agrupa organismos en base a semejanza estrictamente fenotípica). En las últimas dos décadas dos cambios principales han modificado la ciencia de la clasificación: 1.- el desarrollo de la sistemática filogenética, y 2.- la aplicación de técnicas moleculares en sistemática. Sobre el primero hay abundante literatura (Hennig, 1968; Eldredge y Cracraft, 1980; Mayr, 1974; Wiley, 1981, 1986; Farris, 1983; y trabajos allí citados). En este trabajo nos referiremos al segundo de estos cambios.

Como sistemáticos que trabajamos diariamente con datos morfológicos y moleculares, consideramos ambos enfoques complementarios y creemos erróneo el común debate sobre la superioridad de uno u otro método. Ambos ofrecen ventajas y desventajas, pero los mejores resultados se obtienen al utilizarlos en combinación (Colles, 1980; Hillis, 1987; Hillis y de Sá, 1988; Goodman et al., 1987; Mickevich y Johnson, 1978; Miyamoto, 1981). Comenzaremos por definir en que consiste el trabajo del sistemático. Algunos colegas científicos poseen la impresión que trabajar en sistemática consiste en encontrar y describir nuevos taxa, sin realizar ningún otro aporte al campo de la biología. La descripción de nuevos taxa es casi exclusiva en el trabajo del sistemático pero su aporte no finaliza allí. La teoría evolutiva unificó las ciencias biológicas basándose en que todos los

* Department of Zoology, The University of Texas at Austin, Austin Texas, 78712-1084, USA.

organismos están relacionados por ancestros comunes. Las clasificaciones biológicas deben, en el contexto darwiniano, reflejar la historia de estos ancestros comunes. Aclaremos este punto con un ejemplo. Una persona sin formación científica diría que un cocodrilo es más parecido a un lagarto que a una gallina. Justamente en mostrar que verdaderamente, que filogenéticamente, el cocodrilo es más similar (es más cercano evolutivamente) a la gallina que al lagarto es donde radica la función del sistemático (Gauthier et al., 1988).

ENFOQUE MORFOLÓGICO

Los caracteres morfológicos representan un subconjunto del total de caracteres presentes en un individuo. Haciendo uso de fósiles y ejemplares conservados en museos, los estudios morfológicos utilizan la información acumulada por cientos de años (Arratia, 1987; Cannatella, 1985; Gaffney, 1975, 1979; Gauthier et al., 1988; Kemp, 1982) y proveen información ontogenética, necesaria en muchos casos para comprender la evolución o polaridad de los caracteres con que se trabaja (De Queiroz, 1985; Fink, 1982; Kluge, 1985, 1988). Los datos morfológicos son codificables en estados discretos de carácter, ej. presente o ausente, y estructuras con forma X o Y, es decir estados de carácter no continuos. Actualmente, la obtención de sinapomorfias (caracteres derivados y compartidos) de datos continuos es problemática. Los caracteres morfológicos ofrecen un claro concepto de homología, refiriéndose a caracteres derivados de un ancestro común. Esto facilita el reconocimiento de sinapomorfias las cuales son elementos básicos de las clasificaciones filogenéticas.

Por último, pero no por ello de menor importancia (especialmente para biólogos y estudiantes latinoamericanos con limitados presupuestos asignados a investigación) otras tres características de los estudios morfológicos son: 1.- utilización de equipo mínimo, 2.- las técnicas de trabajo son relativamente económicas, y 3.- los datos son de obtención rápida.

ENFOQUE MOLECULAR

Primero analizaremos en forma global las ventajas y problemas del enfoque molecular, seguidamente presentaremos cada una de las técnicas desarrolladas en los últimos años. Las secuencias de ADN proveen el mayor número de caracteres independientes aplicables en análisis filogenéticos en un gran espectro de tiempo, en teoría desde el origen mismo de la vida. En algunas especies esta cifra alcanza los 400 trillones de caracteres (Hillis, 1987) y sólo una pequeña fracción ha sido utilizada. Actualmente se halla a disposición (Gen Bank, versión 55) la información de aproximadamente 20 millones de pares de bases, cifra que se duplica cada año. Las técnicas moleculares requieren de tejidos frescos o congelados, eliminando la posibilidad de utilizar ejemplares conservados en museos o fósiles. La polarización de los caracteres no se puede realizar a través de comparaciones ontogenéticas ya que en general los datos moleculares carecen de información ontogenética. Además, estas técnicas presentan problemas aún no resueltos en las bases filosóficas y de metodología de análisis, y requieren un alto costo económico además de una mayor intensidad de trabajo.

La sistemática molecular engloba varias técnicas de trabajo apropiadas para algunos problemas pero incorrectas para otros. Queremos recordar que nuestro interés se limita a las aplicaciones moleculares en sistemática y filogenia, y que el siguiente análisis puede ser inapropiado si no se mantiene en dicho contexto.

Electroforesis de proteínas:

Esta técnica fue una de las primeras metodologías desarrolladas y es útil para problemas que van desde análisis a nivel poblacional (Avise, 1974; Buth, 1984; Selander y Whittam, 1983) hasta

la reconstrucción de filogenias de taxa cercanos (Avice et al., 1980; Fisher y Whitt, 1979; Simon, 1979). Por ejemplo, Echelle et al. (1983), realizaron un estudio en el género *Menidia* con el objeto de clarificar el status de dos especies (*beryllina* y *peninsularis*). Los datos electroforéticos indicaron la existencia de una nueva especie unisexual, *M. clarkhubbsi*, y su origen híbrido a partir de *M. beryllina* y un ancestro similar a *M. peninsularis*. Finalmente se elaboró una hipótesis de la filogenia del género. La electroforesis de proteínas se destaca por ser la técnica más económica, fácil de aprender, y por producir datos discretos al utilizar cada locus como un carácter y sus alelos como los estados del carácter (Buth, 1984). Algunos autores han utilizado los alelos como caracteres (Mickey y Johnson, 1976), pero en general los alelos representan formas de expresión de un mismo locus y no pueden considerarse caracteres independientes en los análisis filogenéticos.

Sin embargo, esta técnica subestima la diversidad molecular al ser aplicable a un limitado número de genes y los datos provenientes de diferentes laboratorios son de difícil comparación por su susceptibilidad a variaciones en las condiciones de trabajo. Aquadro y Avice (1982) al variar las condiciones electroforéticas (ej. variación de pH, en los geles, en los buffers, en la temperatura, uso de diferentes medios, etc.) obtuvieron diferente número de electromorfos (en dicho estudio se pasó de sólo reconocer 8 electromorfos a identificar 35). Esto se conoce como "variación oculta" (=hidden variation).

Al analizar los datos electroforéticos se puede optar por uno de dos caminos: se pueden incorporar datos de frecuencias genéticas en medidas de distancias genéticas, o se usan los datos directamente en estados discretos (ej. presente/ausente). Algunos autores consideran que los datos de frecuencia no llenan información filogenética (Farris, 1985) y sugieren su eliminación de los estudios filogenéticos. Las frecuencias génicas se utilizan para estimar varias medidas de distancia genética, la más usada en sistemática es la distancia genética de Nei (Nei, 1972). La Tabla I ilustra los problemas planteados al utilizar la distancia genética de Nei.

Tabla I. Medidas de distancia genética aplicando Nei. L = locus, A = alelo

Ejemplo A					Ejemplo B							
L	A	Caso 1		Caso 2		L	A	Caso 1		Caso 2		
		X	Y	W	Z			X	Y	W	Z	
1	a	1.0	1.0	0.5	0.5	1	a	1.0	1.0	1.0	---	
	b	---	---	0.5	0.5		b	---	---	---	---	1.0
2	a	0.5	---	1.0	---	2	a	0.5	---	0.5	0.5	
	b	0.5	---	---	---		b	0.5	---	0.5	0.5	
	c	---	0.5	---	---		c	---	0.5	---	---	---
	d	---	0.5	---	1.0		d	---	0.5	---	---	---
						3	a	0.5	---	0.5	0.5	
					b		0.5	---	0.5	0.5		
					c		---	0.5	---	---	---	
					d		---	0.5	---	---	---	
Caso 1. Nei D = 0.41					Caso 1. Nei D = 0.693							
Caso 2. Nei D = 1.10					Caso 2. Nei D = 0.693							

En el ejemplo A dos pares de especies (X-Y, W-Z) con dos loci cada una son idénticas en un locus y diferentes en el otro. Diríamos que la distancia genética entre las especies en ambos casos es la misma, pero aplicando la fórmula de Nei obtenemos valores diferentes. En el ejemplo B ocurre

lo contrario. En el caso 1, las dos especies son idénticas en 1 locus y diferentes en los otros dos loci, mientras que en el caso 2 las dos especies difieren en sólo un locus. En el caso 1 la divergencia genética entre las especies es de $2/3$ y en el caso 2 de $1/3$ de los loci, pero aplicando Nei obtenemos valores idénticos de 0.693. Los valores de Nei de estos ejemplos nos llevarían a conclusiones equivocadas sobre la distancia genética entre las especies. Una posible solución a este problema fue propuesta por Hillis, (1984).

Técnicas cuantitativas.-

Entre las técnicas cuantitativas se destacan la comparación de proteínas usando métodos inmunológicos (Champion et al., 1974; Friday, 1980) y la comparación de ácidos nucleicos a través de hibridación (Brownell, 1983; Houde, 1987; Sibley y Ahlquist, 1983, 1987; Templeton, 1985).

La fijación por micro-complementación (FMC), desarrollada en los años 60, es la técnica inmunológica más usada (Cadle y Gorman, 1961; Maxson y Maxson, 1966; Maxson y Szymura, 1984). Esta estima la divergencia entre dos taxa en unidades de distancia inmunológica (D.I.) a través de la cantidad de complemento utilizado (fijado) en las reacciones de reconocimiento específico entre antígenos y anticuerpos. La FMC presenta 3 problemas principales. Primero, los valores de D.I. asumen una constancia en la evolución molecular (reloj molecular biológico) que es muy debatida en el presente. Además, el tiempo de divergencia entre las especies se estima indirectamente, utilizando como indicador el registro fósil o intervalos de confianza de baja precisión (Fig. 1). Los otros dos problemas se refieren a la replicabilidad y reciprocidad de los experimentos. Se ha cuestionado la replicabilidad de las condiciones de trabajo de estos experimentos. La reciprocidad se refiere a que al obtener un valor de divergencia de 10 D.I. entre el antígeno de la especie A y el anticuerpo de la especie B se debe obtener un valor idéntico al realizar el experimento recíproco (anticuerpo de A - antígeno de B). Esta reciprocidad a veces no se cumple y en algunos estudios no se realizan los experimentos recíprocos.

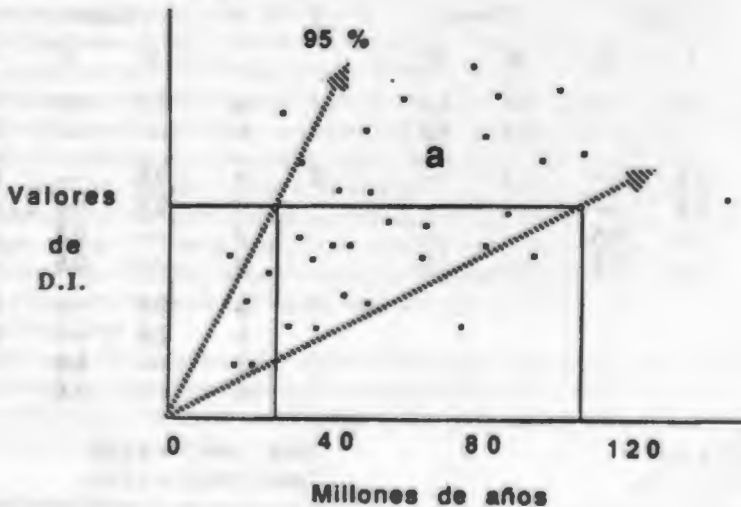


Fig. 1.- En este ejemplo hipotético, la estimación del tiempo para el punto a utilizando intervalos de confianza de 95% resulta ser entre 20 y 100 millones de años.

Los estudios de hibridación de ADN, se basan en la temperatura de separación y renaturalización de cadenas de ADN híbrido. La separación de las cadenas a temperaturas relativamente bajas indica una gran diferencia en el contenido de bases y un mayor grado de divergencia entre las especies. Esta técnica permite obtener datos en un tiempo relativamente breve, pero presenta los mismos problemas de las técnicas inmunológicas.

Las técnicas cuantitativas (y la sistemática molecular en general) requieren de mayor cuidado en el uso del término homología. Homologías pueden surgir vía especiación, entonces hablamos de ortología y corresponde al concepto tradicional de homología. Pero homologías también pueden surgir vía duplicación génica, llamada paralogía, o a través de invasión genética (ej. retrovirus) y se denomina xenología (Patterson, 1987). Los biólogos moleculares no sistemáticos, utilizan el término homología para indicar similitud y sea ésta el resultado de descendencia común o de convergencia.

Mapas de restricción

Estos estudios se basan en el reconocimiento de ciertas secuencias de ADN por endonucleasas específicas y producen datos discretos que son útiles para estudios desde nivel poblacional hasta reconstrucción de filogenias relativamente antiguas (Cann et al., 1987). Se puede trabajar con ADN mitocondrial (mtADN) o nuclear, siguiendo así herencia materna o mendeliana respectivamente. El mtADN es de amplia distribución en la escala zoológica, posee características comunes que facilitan su aislamiento e identificación, y no presenta mayor complejidad genética (Avisé et al., 1987; Moritz et al., 1987). Estas características, y su estricta herencia materna, hacen del mtADN un instrumento ideal para estudiar problemas de hibridación, flujo génico, biogeografía, eventos de colonización, y filogenia (Avisé et al., 1984; Brown, 1983; Carr et al., 1987; Kessler y Avisé, 1985; Spolsky y Uzzell, 1986; Wright et al., 1983).

Del ADN nuclear, el ADN ribosómico (rADN) ha sido recientemente utilizado en estudios sistemáticos (Appels y Dvorak, 1982; Hillis y Davis, 1986, 1987; Wilson et al., 1984). El rADN consiste de un conjunto de unidades repetidas, cada unidad presenta regiones conservadas que alternan con regiones de evolución más rápida (Cortada y Pavon, 1982; Tanhauser et al., 1986). Las secuencias conservadas codifican para los rRNA (18s, 5.8s, y 28s) y su evolución está limitada funcionalmente por la estructura secundaria que deben formar (Wheeler y Honeycut, 1988). Las regiones con mayor tasa de evolución corresponden a secuencias que no transcriben o secuencias que son eliminadas luego de la transcripción. Estas secuencias con diferentes tasas de evolución proveen información que abarca un gran espectro de tiempo. El rADN forma una familia de ADN altamente repetitivo (Britten y Kohne, 1968) lo que facilita su identificación, clonación y purificación, y las unidades ribosomales evolucionan en forma concertada (o sea homogeneidad intraspecifica y heterogeneidad interespecifica) (Dover, 1982; Dover y Coen, 1981). El ADN cloroplástico (cpADN) en plantas ofrece aplicaciones similares a las descritas para el rDNA (Curtis y Clegg, 1984; Palmer et al., 1983; Palmer y Zamir, 1982; Zurawski y Clegg, 1987).

Las técnicas de restricción son de costo relativamente altos y requieren una intensa dedicación por parte de los investigadores. Entre los puntos no resueltos en la metodología de análisis se destaca el problema de la ganancia versus la pérdida de sitios de restricción. Por ejemplo, una secuencia con 6 pares de bases reconocida por una endonucleasa tiene 18 posibilidades de ser pérdida (Fig. 2). Cualquier combinación que incluya la sustitución de una de estas 6 bases, ocasiona la pérdida del sitio de reconocimiento. Una vez perdido este sitio, existe una sola sustitución posible para recuperar dicha secuencia. Se deduce entonces que es mucho más común perder que ganar (18 a 1 en nuestro ejemplo) sitios de reconocimiento enzimático. Se ha sugerido utilizar el concepto de parsimonia de Dollo (DeBry y Slade, 1985; Templeton, 1983a, 1983b) que asume que la posibilidad de perder sitios es infinitamente mayor que la de ganar. Este camino sobrepasa las ganancias, lo cual puede llevar a conclusiones erróneas en reconstrucciones filogenéticas si ocurren ganancias paralelas (convergencia).

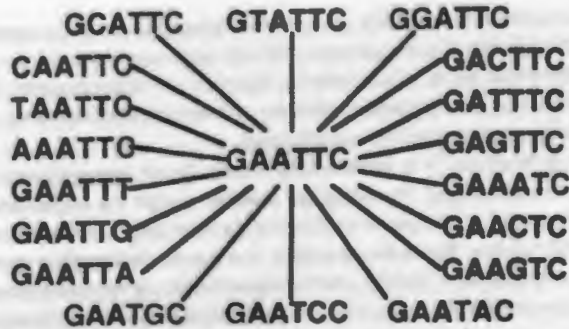


Fig. 2.- Representación de las 18 posibles cambios que pueden ocurrir como consecuencia de una sola sustitución en un sitio de reconocimiento enzimático compuesto por 6 bases. Cada uno de estos cambios llevan a la pérdida del sitio de reconocimiento.

Secuenciación

La secuenciación directa del ADN puede ser aplicada a todos los aspectos de las investigaciones sistemáticas, a pesar que se ha utilizado principalmente para reconstrucciones filogenéticas (Bremer, 1988; Field et al., 1988; Goodman et al., 1985; Miyamoto et al., 1987). Considerando cada par de bases como un carácter independiente se obtienen un gran número de datos codificables en estados discretos. La principal desventaja es el extremado costo y dedicación que requiere. Además, hay que tener cuidado con la identificación de homología no ortólogas. A pesar que cada par de bases se considera un carácter independiente, a veces no lo son. Por ejemplo, en el caso de una secuencia de ADN ribosomal que al transcribirse en ARN ribosomal forma estructuras de asas, cualquier cambio de un nucleótido a la altura de la base del asa (Fig. 3), producirá un cambio correspondiente para mantener la estructura secundaria, o sea que si estos cambios se consideran independientes serán contados doblemente.

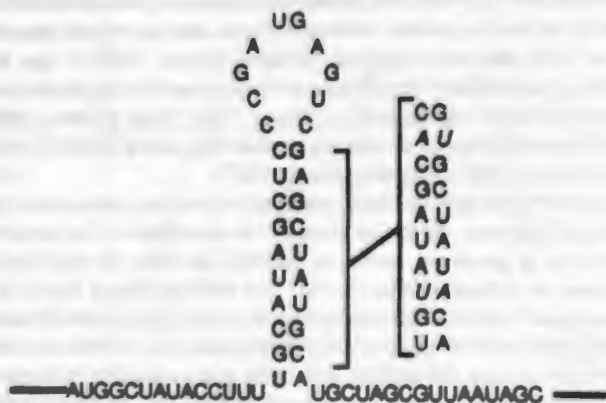


Fig. 3.- Estructura secundaria del rARN. La sustitución de un nucleótido en la secuencia de ADN que formará la base del asa del ARN será acompañada del cambio correspondiente del nucleótido opuesto para mantener esta estructura secundaria.

CONCLUSIONES

Desde el punto de vista atomista, cada individuo es el producto de una combinación de caracteres de diferente naturaleza. En los estudios sistemáticos, los mejores resultados se obtienen al utilizar el mayor número de caracteres posible. El uso de datos morfológicos y moleculares en combinación ofrece excelentes posibilidades de trabajo. Análisis integrados de datos morfológicos y moleculares han sido escasos, pero su incremento en la última década es claro y bien recibido por la comunidad científica. La larga historia de acumulación y análisis de información morfológica provee el marco de referencia necesario e indica los problemas aún no resueltos que pueden ser abordados con técnicas moleculares. La sistemática molecular surge como consecuencia del desarrollo de nuevas metodologías y tecnologías de alta precisión que caracterizan la segunda mitad de este siglo.

Ambos enfoques, el morfológico y el molecular, presentan ventajas particulares, pero también ambos plantean problemas al realizar los análisis. Los resultados obtenidos dependerán de la forma en que se colecten y analicen los datos, y no de características intrínsecas de los datos. Es decir que la carencia de una metodología de análisis rigurosa afectará a ambos datos por igual.

Sin desconocer el aporte e impacto que las técnicas moleculares han tenido en el campo sistemático, creemos que se debe continuar estimulando los estudios morfológicos debido a su total vigencia. Las técnicas moleculares son útiles para resolver problemas sistemáticos ya que se pueden aplicar a un gran espectro de tiempo (Fig. 4). Esto no significa que estas técnicas son de

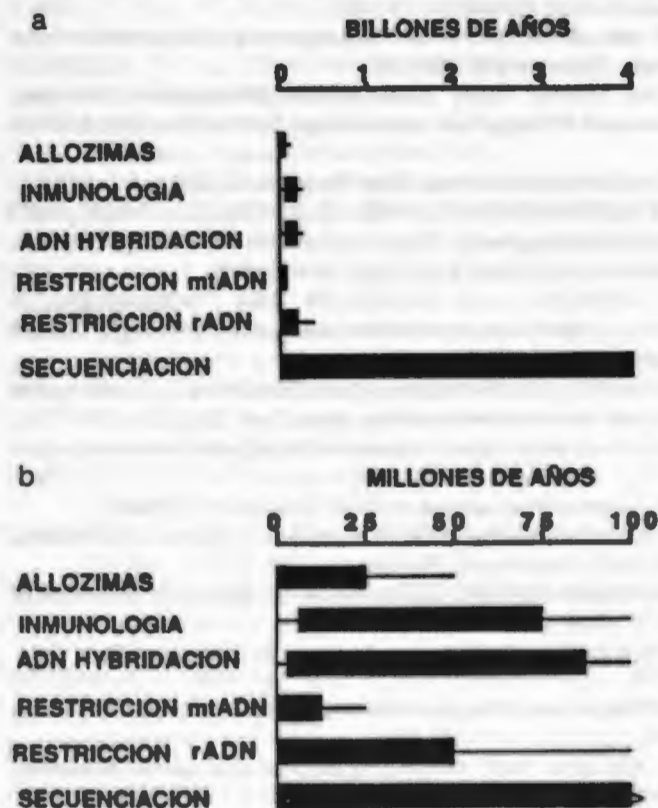


Fig. 4.- a. Gráfica del espectro de tiempo al cual se pueden aplicar las diferentes técnicas moleculares, b. la misma gráfica en un espectro de tiempo más reducido.

igual utilidad en cada problema. Si se trabaja con taxa cercanamente relacionados lo más apropiado y efectivo es utilizar electroforesis de proteínas. En caso de encontrar baja diversidad electroforética al enfrentar problemas de hibridación o flujo genético, se puede optar por utilizar ADN mitocondrial. Por el contrario si se encuentra una alta diversidad que hace imposible los análisis, se puede trabajar con técnicas cuantitativas, o buscar genes con características más conservadas y en este caso el ADN ribosómico es una macromolécula ideal. Finalmente la secuenciación directa de ADN se puede aplicar a todos los niveles de análisis, pero por sus características es más apropiado para estudios de taxa no relacionados cercanamente.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Comisión Organizadora de la V Reunión de Conservación y Zoología de Vertebrados por la invitación extendida a uno de los autores (RdS) para participar en tal evento. El presente trabajo se benefició de la lectura crítica y comentario de los Licenciados Patricia Castro, Mauricio Linares, y Ernesto Weil.

BIBLIOGRAFIA

- APPELS, R. y J. DVORAK. 1982. Relative rates of divergence of spacer and gene sequences within the rDNA region of species in the Triticeae: implications for the maintenance of homogeneity of a repeated gene family. *Theoret. Appl. Genet.* 63: 361-365.
- AQUADRO, C.F. y J.C. AVISE. 1982. An assessment of "Hidden" heterogeneity within electromorphs at three enzyme loci in deer mice. *Genetics* 102:269-284.
- ARRATIA, G. 1987. Description of the primitive family Diplomystidae (Siluriformes, Teleostei, Pisces): Morphology, Taxonomy and Phylogenetic implications. *Bonner Zool. Mon.* 24:1-123.
- AVISE, J.C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23:465-81.
- AVISE, J.C., J. ARNOLD., R.M. BALL, E. BERMINGHAM, T. LAMB, J.E. NEIGEL, C.A. RABB, y N.C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific phylogeography. The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.
- AVISE, J.C., E. BERMINGHAM, L.G. KESSLER, y N.C. SAUNDERS. 1984. Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swam between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Evolution* 38:931-41.
- AVISE, J.C., J.C. PATTON, y C.F. AQUADRO. 1980. Evolutionary genetics of birds. II. Conservative protein evolution in North American sparrow and relatives. *Syst. Zool.* 29:223-34.
- BREMER, K. 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42(4):795-803.
- BRITTEN, R.J. y D.E. KOHNE. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529-40.
- BROWN, W.M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: *Evolution of genes and proteins*, pp.82-88. M.Nei y R.K.Koehn (Eds.). Sunderland, Sianuer.
- BROWNELL, E. 1983. DNA/DNA hybridization studies in muroid rodents: symmetry and rates of molecular evolution. *Evolution* 37:1034-51.
- BUTH, D.G. 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15:501-522.
- CADLE, J.E. y G.C. GORMAN. 1981. Albumin immunological evidence and the relationships of sea snakes. *J. Herpetol.* 15:319-334.
- CANN, R.L., M. STONEKING y A.C. WILSON. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325:31-36.

- CANNATELLA, D.C. 1985. A phylogeny of primitive frogs (Archeobatrachians). Ph.D. dissertation. Univ. of Kansas. Lawrence. 404 pp.
- CARR, S.M., A.J. BROTHERS, y A.C. WILSON. 1987. Evolutionary inferences from restriction maps of mitochondrial DNA from nine taxa of *Xenopus* frogs. *Evolution* 41(1):176-188.
- CHAMPION, A.B., E.M. PRAGER, D. WACHTER, y A.C. WILSON. 1974. Microcomplement fixation. In: *Biochemical and Immunological taxonomy of animals*. pp. 397-416. C.A. Wright (Ed.). London: Academic Press.
- COLLES, D.H. 1980. Congruence between morphometrics and alloenzyme data for *Menidia* species: a reappraisal. *Syst. Zool.* 29:288-99.
- CORTADAS, J. y C. PAVON. 1982. The organization of ribosomal genes in vertebrates. *Evo. Molec. Biol. Organ.* 5:1075-1080.
- CURTIS, S.E. y M.T. CLEGG. 1984. Molecular evolution of chloroplast DNA sequence. *Molec. Biol. Evol.* 1:291-301.
- DEBRY, R.W. y N.A. SLADE. 1985. Cladistic analysis of restriction endonuclease cleavage maps within a maximum likelihood framework. *Syst. Zool.* 34:21-34.
- DE QUEIROZ, K. 1985. The ontogenetic method for determining character polarity and its relevance to phylogenetic systematics. *Syst. Zool.* 34:280-299.
- DOVER, G.A. 1982. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. *Nature* 299:111-17.
- DOVER, G.A. y E. COEN. 1981. Spring cleaning ribosomal DNA. A model for multigene evolution?. *Nature* 290:731-732.
- EHELLE, A.A., A.F. EHELLE, y C.A. CROZIER. 1983. Evolution of an all-female fish *Menidia clarkhubbsi* (Atherinidae). *Evolution* 37 (4):772-784.
- ELDREDGE, N. y J. CRACRAFT. 1980. *Phylogenetic patterns and the evolutionary process*. Columbia University Press: New York.
- FARRIS, J.S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. *Advances in cladistics*. vol. II. Columbia University Press: New York.
- FARRIS, J.S. 1985. Distance data revised. *Cladistic* 1:87-86.
- FIELD, K.G., G.J. OLSEN, D.J. LANE, S.J. GIOVANNONI, M.T. GHISELIN, E. C. RAFF, N.R. PACE, y R.A. RAFF. 1988. Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* 239:748-753.
- FINK, W.L. 1982. The conceptual relationship between ontogeny and phylogeny. *Paleobiology* 8:254-264.
- FRIDAY, A.E. 1980. The status of immunological distance data in the construction of phylogenetic classifications: a critique. In: *Chemosystematics: principles and practice*. pp. 289-304. F.A. Bisby, J.G. Vaughen, y C.A. Wright (Eds.). London: Academic Press.
- GAFFNEY, R. 1975. A phylogeny and classification of the higher categories of turtles. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 55:391-426.
- GAFFNEY, E. 1979. Tetrapods phylogeny: a phylogenetic analysis. *Bull. Carnegie Mus. Nat. Hist.* 13:92-105.
- GAUTHIER, J., A.G. KLUGE, y T. ROWE. 1988. Amniote phylogeny and the importance of fossils. *Cladistics* 4:104-209.
- GOODMAN, M., J. CZELUSNAIK, y J. E. BEEBE. 1985. Phylogeny of primates and other euterian orders, a cladistic analysis using amino acid and nucleotide sequence data. *Cladistics* 1:171-185.
- GOODMAN, M., M.M. MIYAMOTO, y J. CZELUSNAIK. 1987. Patterns and process in vertebrate phylogeny revealed by coevolution of molecules and morphologies. In: *Molecules and Morphology in Evolution: Conflict or compromise?* pp.141-176 C. Patterson (Ed.). London: Cambridge Univ. Press.
- HENNIG, W. 1968. *Elementos de una sistemática filogenética*. Ed. Universitaria de Buenos Aires, Argentina.

- HILLIS, D.M. 1984. Misuse and modification of Nei's genetic distance. *Syst. Zool.* 33(2): 238-240.
- HILLIS, D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:23-47.
- HILLIS, D.M., y S.K. DAVIS. 1986. Evolution of ribosomal DNA: fifty million years of recorded history in the frog genus *Rana*. *Evolution* 40:1275-88.
- HILLIS, D.M., y S.K. DAVIS. 1987. Evolution of the 28s. rRNA. gene in anurans: regions of and their phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* 4:117-25.
- HILLIS, D.M., y R.O. de SÁ. 1988. Phylogeny and taxonomy of the *Rana palmipes* group (Salientia: Ranidae). *Herpetological Monographs* 2:1-26.
- HOUDE, P. 1987. Critical evaluation of DNA hybridization studies in avian systematics. *The Auk* 104:17-32.
- JANSEN, R.K. y J.D. PALMER. 1987. A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 24:5818-5822.
- KEMP, T.S. 1982. Mammal like reptiles and the origin of mammals. London: Academic Press.
- KESSLER, L.G. y J.C. AVISE. 1985. A comparative description of mitochondrial DNA differentiation in selected avian and other vertebrate genera. *Mol. Biol. Evol.* 2:109-25.
- KLUGE, A.G. 1985. Ontogeny and phylogenetic systematics. *Cladistics* 1:13-27.
- KLUGE, A.G. 1988. The characterization of ontogeny. In: *Ontogeny and systematics* pp. 57-81. C.J. Humphries (Ed.). New York: Columbia Press.
- MAXSON, L.R. y J.M. SZYMURA. (1984). Relationships among Discoglossid frogs: An albumin perspective. *Amp.- Rep.* 5:245-252.
- MAXSON, R.D. y L.R. MAXSON. 1986. Micro-complement fixation: A quantitative estimator of protein evolution. *Mol. Biol. Evol.* 3(5): 245-252.
- MAYR, E. 1974. Cladistic analysis or cladistic classifications? *Zeitsch. Zool. Systemat. Evolut - Forsch* 12:94-128.
- MICKEVICH, M.F. y M.S. JOHNSON. 1976. Congruence between morphological and allozyme data in evolutionary inference and character evolution. *Syst. Zool.* 25:260-70.
- MIYAMOTO, M.M. 1981. Congruence among character sets in phylogenetic studies of the frog genus *Leptodactylus*. *Syst. Zool.* 30:281-290.
- MIYAMOTO, M.M., J.L. SLIGHTON, y M. GOODMAN. 1987. Phylogenetic relations of human and african apes from DNA sequences in the globin region. *Science* 238:369-373.
- MORITZ, C., T.E. DOWLING, y W.M. BROWN. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Eco. Syst.* 18:289-92.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292.
- PALMER, J.D. y D. ZAMIR. 1982. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79:5008-5010.
- PALMER, J.D., C.R. SHIELDS, D.B. COHEN, y T.J. ORTON. 1983. Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid *Brassica* species. *Theoret. Appl. Genet* 65:181-189.
- PATTERSON, C. 1987. Introduction. In: *Molecules and Morphology in Evolution: Conflict or compromise?* pp. 1-23. C. Patterson (Ed.). London: Cambridge Univ. Press.
- SELANDER, R.K. y T.S. WHITTMAN. 1983. Protein polymorphism and the genetic structure of populations. In: *Evolution of gene and proteins.* pp. 89-114. M. Nei y R.K. Koehn (Eds.). Sunderland, Massachusetts.
- SIBLEY, C.G. y J.E. AHLQUIST. 1983. Phylogeny and classification of birds based on the data of DNA/DNA hybridization. In: *Current Ornithology.* vol. I. pp. 245-92. R. Jhonston (Ed.). New York. Plenum Press.
- SIBLEY, C.G. y J.E. AHLQUIST. 1987. Avian phylogeny reconstructed from comparison of the genetic material, DNA. In: *Molecules and Morphology in Evolution: Conflict or compromise?* pp. 95-121. C. Patterson (Ed.). London: Cambridge Univ. Press.

- SIMON, C.M. 1979. Evolution of periodical cicadas: phylogenetic inferences based on allozymic data. *Syst. Zool.* 28:22-39.
- SPOLSKY, C. y T. UZZELL. 1986. Evolutionary history of the hybridogenetic frog *Rana esculenta* as deduced from mtDNA analysis. *Mol. Biol. Evol.* 3:44-56.
- TANHAUSER, S.M., W.W. HAUSWORTH, y P.J. LAIPIS. 1986. Conserved restriction sites within the rRNA genes of vertebrates. *Bloch. et Biophys. Acta* 866:19-25.
- TEMPLETON, A.R. 1983a. Phylogenetic inferences from restriction endonucleases cleavage sites maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution* 37:221-244.
- TEMPLETON, A.R. 1983b. Convergent evolution and nonparametric inferences from restriction data and DNA sequences. In: *Statistical analysis of DNA sequence data*, pp. 151-179. B.S. Weir (Ed.). Dekter. New York.
- TEMPLETON, A.R. 1985. The phylogeny of the hominoid primates: a statistical analysis of DNA-DNA hybridization data. *J. Mol. Biol. Evol.* 2:420-433.
- WHEELER, W.C. y R.L. HONEYCUTT. 1988. Paired sequence difference in ribosomal RNA: evolutionary and phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* 5(1):90-96.
- WILEY, E. 1981. *Phylogenetics. The theory and practice of phylogenetic systematics*. Wiley-Interscience, New York.
- WILEY, E. 1986. La sistemática en la revolución darwiniana. *An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso, Chile* 17:25-31.
- WILSON, G.N., M. KNOLLER, L.L. SZURA, y R.D. SCHMICKEL. 1984. Individual and evolutionary variation of primate ribosomal DNA transcription initiation regions. *Mol. Biol. Evol.* 1:221-237.
- WRIGHT, J.C., C. SPOLSKY, y W.M. BROWN. 1983. The origin of the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus laredoensis* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Herpetologica* 349:410-16.
- ZURAWSKI, G. y M.T. CLEGG. 1987. Evolution of higher plants chloroplast DNA encoded genes implications for structural function and phylogenetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 38:391-418.