

UNIVERSIDAD DE CHILE



60 1004792309

UCH-FC  
FAS-B  
E643  
C. L

**Filogenia de Thinocoridae (Aves,  
Charadriiformes) a Partir de Secuencias  
Nucleotídicas de DNA Mitocondrial**

**Tesis**

**entregada a la**

**Universidad de Chile**

**en cumplimiento parcial de los requisitos**

**para optar al grado de**

**Magister en Ciencias Biológicas con mención en Zoología**

**Facultad de Ciencias**

**por**

**Javier Esteban González Soto**

**Noviembre de 1997**

01-0223819

Dir

**s de Tesis, Dr. Michel Sallaberry A. y Dr. Allan J. Baker**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de  
Magister presentada por el candidato

Javier Esteban González Soto

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requerimiento de tesis  
para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Zoología, en el  
Examen de Defensa de Tesis rendido el Día 9 de junio de 1997.

Directores de Tesis:

Dr. Michel Sallaberry A.

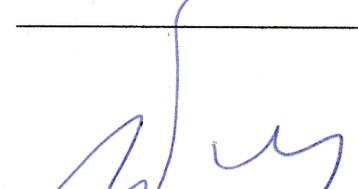
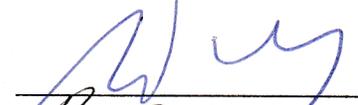
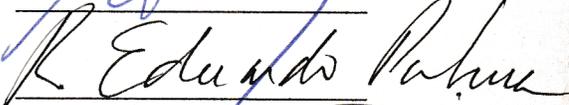
Dr. Allan J. Baker

Comisión de Evaluación de Tesis:

Dr. Alberto Veloso M.

Dr. Eduardo Palma V.

Dra. Patricia Iturra C.

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

*Dedico esta tesis a mi padre Francisco Javier, quien puso  
la naturaleza viva ante mis ojos, y a mi madre Gabriela, por su  
incondicional y constante apoyo emocional.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer el enorme apoyo que mis padres me otorgaron durante todos estos años, sin duda este trabajo habría sido casi imposible de realizar sin su incentivo permanente. Le agradezco muchísimo también a mi tutor y amigo, Michel Sallaberry Ayerza, gran compañero en terreno y poseedor de un conocimiento realmente loable en relación con la historia natural de las aves de Chile. Con él tuve la oportunidad y la suerte de conocer y recorrer innumerables parajes de este hermoso país. La observación siempre atenta de la avifauna, en el árido y caluroso desierto, en los fértiles valles y las inagotables costas de Chile central, en los escarpados contrafuertes cordilleranos, en los bosques infranqueables del sur de Chile y en los tortuosos afluentes chilotes, fue motivo de un cúmulo infinito de experiencias indispensable para el desarrollo de esta tesis, y todo mientras imperaba un trato amigable, sencillo, honesto y, sobre todo, alegre. Agradezco también a mi segundo tutor, Dr. Allan J. Baker, por sembrar la inquietud de revelar la historia de un grupo de aves curiosísimo y con un método tan particular como es el de la sistemática molecular, un hombre que me brindó también, junto a su familia, una acogida sobrecogedora, lejos de mi hogar, que terminó finalmente en una amistad indisoluble. Siempre deseando que las cosas fueran cada vez más y más alto. Agradezco a mi amigo Mark Peck por soportar mi tutela y entrenamiento en el laboratorio, necesitó de mucha paciencia dada la sorda frontera lingüística. Agradezco también a Oliver Haddrath por su colaboración y guía técnica. Agradezco a mi gran amigo Juan Tagle Talavera —Johnny— por su inapreciable ayuda en las nevadas estepas patagónicas y su voluntad extremadamente decidida para capturar las esquivas perdicillas australes. Agradezco también a los miembros de la comisión de mi tesis por sus comentarios oportunos en el afán de mejorar este manuscrito. Agradezco también a mis compañeros de licenciatura

por haberme dado mucho ánimo acompañado siempre de un muy buen humor.

Finalmente, en este nuevo párrafo, deseo expresar, y si mi escaso vocabulario me lo permite, mi enorme gratitud a una persona que fue, sin duda alguna y en el más amplio contexto, un verdadero MAESTRO. Un guía apasionado por la biología, o un biólogo de corazón, pero a la vez muy crítico y con una actitud casi monástica en relación con el desempeño del quehacer científico. Un hombre de una cultura extraordinaria, ergo, un interlocutor fascinante y motivante, un verdadero generador de intelequias inspiradoras, me refiero a Carlos Medina Labarca. Su visión global de la biología y su dialéctica aguda fueron esenciales para ordenar y hacer brotar en mí algunas excasas ideas esparcidas en este trabajo, y como si esto fuera poco, logró que vislumbrara, además, los principios más fundamentales de la biología que dieron espacio también, en su discurso, a consideraciones filosóficas de los seres vivos.

Gran parte de esta tesis fue financiada por el *Natural Sciences and Engineering Research Council* de Canadá, proyecto A0200 perteneciente al Dr. Allan J. Baker, y el *Department of Museum Volunteers* del *Royal Ontario Museum* (Canadá).

## ÍNDICE DE MATERIAS

<u>AGRADECIMIENTOS</u>	iii
<u>ÍNDICE DE MATERIAS</u>	v
<u>ÍNDICE DE TABLAS</u>	vii
<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	ix
<u>ABREVIATURAS</u>	xii
<u>RESUMEN</u>	xiii
<u>ABSTRACT</u>	xv
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
a) Descripción de Thinocoridae	1
b) Un Escolopácido Aberrante	5
c) El Problema	10
d) Genes del DNA Mitocondrial: Citocromo <i>b</i> y rRNA 12S	16
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	20
<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	21
<u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	22
<u>MATERIALES Y MÉTODO</u>	24
a) Colecta y Preservación de las Muestras	24
b) Aislamiento, Amplificación y Secuenciación del DNA	27
c) Análisis de las Secuencias Nucleotídicas	32
d) Calibración del Reloj Molecular	36
e) Constancia de Tasas de Evolución Molecular	37

<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
a) Composición de Nucleótidos en los Genes Citocromo <i>b</i> y rRNA 12S	42
b) Variabilidad en las Secuencias y Distancias Genéticas	49
c) Efectos de Saturación y Tasas de Substituciones	61
d) Relaciones Filogenéticas	70
e) Constancia en Tasas de Evolución Molecular y Calibración del Reloj Molecular	77
f) Estimación Temporal de los Nodos Internos de Thinocoridae	84
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
a) Citocromo <i>b</i> , rRNA 12S y Seudogenes	89
b) Problemas en la Reconstrucción Filogenética	91
c) Sesgo en la Composición de los Genes Citocromo <i>b</i> y rRNA 12S	93
d) Tasas de Substituciones en los Genes Citocromo <i>b</i> y rRNA 12S	96
e) Problemas de Saturación	99
f) Análisis Filogenético	101
g) Congruencia con la Hibridación de DNA	105
h) Reloj Molecular	108
i) Deriva y Paleoclima de Continentes Australes y la Orogénesis Andina	112
j) Modelo de Especiación Para Thinocoridae	119
k) Perspectivas de Investigación Futura	125
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>128</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>130</b>
<b>APÉNDICE A</b>	<b>140</b>
<b>APÉNDICE B</b>	<b>148</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Número de individuos por especie y las localidades en donde fueron colectados. ....	26
Tabla 2.	Secuencia y localización de cada oligonucleótido usado como partidor para la amplificación y secuenciación del citocromo <i>b</i> y el rRNA 12S.....	30
Tabla 3.	Composición de nucleótidos por taxon y sesgo en cada posición del codón del gen citocromo <i>b</i> . ....	45
Tabla 4.	Composición de nucleótidos y sesgo en el gen rRNA 12S.....	46
Tabla 5.	Razones de transiciones/transversiones en el gen citocromo <i>b</i> (sobre el diagonal) y el gen rRNA 12S (bajo el diagonal). ....	55
Tabla 6.	Matriz de distancias y sus desviaciones típicas según el modelo de dos parámetros de Kimura $d_K$ (sobre el diagonal) y las proporciones $p$ (bajo el diagonal) en el gen citocromo <i>b</i> . ....	56
Tabla 7.	Matriz de distancias y sus desviaciones típicas según el modelo de dos parámetros de Kimura $d_K$ (sobre el diagonal) y las proporciones $p$ (bajo el diagonal) en el gen rRNA 12S. ....	57

Tabla 8.	Frecuencia promedio de sustituciones en el gen citocromo <i>b</i> según los taxa comparados.....	58
Tabla 9.	Frecuencia promedio de sustituciones en el gen rRNA 12S según los taxa comparados.....	60
Tabla 10.	Prueba de largos de ramas con las secuencias del gen rRNA 12S de carádridos y las cuatro especies de ratites. ....	80
Tabla 11.	Prueba de largos de ramas después de eliminar la secuencia de <i>Numenius americanus</i> .....	81
Tabla 12.	Prueba de dos grupos con las secuencias del gen rRNA 12S de carádridos y las cuatro especies de ratites. ....	82
Tabla 13.	Estimación temporal de los nodos internos de Thinocoridae a través del método de dos grupos utilizando las secuencias de los genes rRNA 12S y citocromo <i>b</i> .....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución geográfica y las localidades de captura de las cuatro especies que conforman Thinocoridae.....	4
Figura 2.	Distribución geográfica y la localidad de captura de <i>Pedionomus torquatus</i> (según Llewellyn, 1974). .....	14
Figura 3.	Relaciones filogenéticas de Thinocoridae obtenidas a través de la hibridación de DNA.....	15
Figura 4.	Localización de los partidores utilizados en la amplificación y secuenciación del citocromo <i>b</i> . .....	31
Figura 5.	Métodos de dos grupos. ....	39
Figura 6.	Método de longitudes de ramas y árboles ultramétricos.....	40
Figura 7.	Constancia en las tasas de evolución del gen rRNA 12S en ratites y carádridos.....	41
Figura 8.	Composición de nucleótidos en cada posición del codón del gen citocromo <i>b</i> .....	47

Figura 9. Composición de nucleótidos en los genes citocromo <i>b</i> y rRNA 12S. ....	48
Figura 10. Curva de saturación en el gen citocromo <i>b</i> . ....	64
Figura 11. Curva de saturación en el gen rRNA 12S. ....	65
Figura 12. Tasa de transiciones y transversiones en el gen rRNA 12S en función de la divergencia <i>p</i> . ....	66
Figura 13. Tasa de transiciones y transversiones en el gen citocromo <i>b</i> en función de la divergencia <i>p</i> . ....	67
Figura 14. Sustituciones totales en cada posición del codón del gen citocromo <i>b</i> . ....	68
Figura 15. Sustituciones sinónimas y no sinónimas en el gen citocromo <i>b</i> en función de la divergencia <i>p</i> . ....	69
Figura 16. Relaciones filogenéticas de <i>Thinocoridae</i> basadas en las secuencias del gen citocromo <i>b</i> . ....	74
Figura 17. Relaciones filogenéticas de <i>Thinocoridae</i> basadas en las secuencias del gen rRNA 12S. ....	75
Figura 18. Relaciones filogenéticas de <i>Thinocoridae</i> basadas en las secuencias de los genes rRNA 12S y citocromo <i>b</i> . ....	76
Figura 19. Árbol ultramétrico confeccionado a partir de las secuencias del gen rRNA 12S. ....	83

Figura 20. Árboles ultramétricos. .... 88

## ABREVIATURAS

### SIGLAS:

MNHN: Museo Nacional de Historia Natural (Chile).  
ROM: *Royal Ontario Museum* (Canadá).  
PCR: *Polymerase Chain Reaction*.

### REATIVOS:

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético.  
TA: Ácido Acético Glacial-Tris.  
STE: Cloruro de Sodio-Tris-EDTA.  
SDS: Dodecil Sulfato de Sodio.  
dNTP: Deoxiribonucleótidos.

### PROGRAMAS PARA ORDENADORES:

ESEE: *EyeBall SEquence Editor*.  
MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*.  
PHYLP: *PHYLogeny Inference Package*.  
PAUP: *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*.  
LINTRE: *LINearized TREes*.

### UNIDADES DE MEDICIÓN

ma: millones de años.  
msnm: metros sobre el nivel del mar.  
 $T_{50H}$ : temperatura interpolada en una curva de disociación de DNA en donde el 50% del DNA se encuentra en estado de hebra doble.  
 $\Delta T_{50H}$ : diferencia entre la  $T_{50H}$  de los apareamientos homo y heteroduplex.  
V: volumen.  
rpm: revoluciones por minuto.  
ts: transición ( $A \leftrightarrow G$  o  $T \leftrightarrow C$ ).  
tv: transversión ( $A \leftrightarrow C$  o  $T \leftrightarrow G$ ).  
sub: substitución.  
st: sitio.  
h: hora.  
' : minuto.  
" : segundo.

## RESUMEN

Thinocoridae es un grupo de Charadriiformes que habita exclusivamente en Suramérica. Esta familia posee dos géneros y cuatro especies, *Thinocorus rumicivorus*, *T. orbignyianus*, *Attagis malouinus* y *A. gayi*.

Las relaciones filogenéticas de Thinocoridae, así como su posición taxonómica en relación con otros grupos de aves, han sido materia de debate y han llamado la atención de los sistemáticos desde el siglo pasado. Las últimas evidencias a partir de la hibridación de DNA —Sibley *et. al.*, 1988— indican que Pedionomidae, una familia monotípica australiana, es el grupo hermano de Thinocoridae. Esta relación filogenética unida a la distribución de Thinocoridae y Pedionomidae sugiere un origen Gondwánico para el ascendiente de Thinocoridae. No obstante, los resultados de la hibridación de DNA han generado polémica y una evidencia idónea para contrastarlos proviene de las secuencias nucleotídicas de DNA.

Se secuenciaron un total de 1,044 y 408 pares de bases de los genes mitocondriales citocromo *b* y rRNA 12S, respectivamente. Se confeccionaron árboles filogenéticos a través de los métodos de parsimonia, de distancia y de probabilidad máxima, en donde Chionidae (*Chionis minor* y *C. alba*) y Scolopacidae (*Numenius americanus*) fueron usados como grupos externos. Además,

la tasa de evolución molecular del gen rRNA 12S fue calibrada sobre la base de la divergencia existente entre ratites sudamericanas (*Pterocnemia pennata* y *Rhea americana*) y australianas (*Dromaius novaehollandiae* y *Casuarius casuarius*), suponiendo que el aislamiento de Australia ocurrió hace 38 ma.

La topología generada a partir de secuencias nucleotídicas es congruente con los resultados de hibridación de DNA. Thinocoridae es un grupo monofilético y Pedionomidae su grupo hermano.

Usando el reloj molecular del gen rRNA 12S, se estima que la separación de Pedionomidae y Thinocoridae habría ocurrido hace 39.8 ma, probablemente debido al aislamiento de Australia a fines del Eoceno. La separación de *Attagis* y *Thinocorus* habría ocurrido hace 22.7-20.5 ma, data que coincide con el calentamiento global e introgresiones marinas del Mioceno. Finalmente, la separación de *T. orbignyianus* y *T. rumicivorus* habría ocurrido hace 7.4 ma, data que coincide con la gran glaciación y el último levantamiento de la Cordillera de los Andes a fines del Mioceno. Además, la tasa de evolución molecular del gen rRNA 12S sería 3.3 veces más lenta que la descrita para mamíferos y salamandras al considerar sólo las transversiones. Sin embargo, se necesita una mayor cantidad de secuencias nucleotídicas mitocondriales para probar adecuadamente estas hipótesis.

## ABSTRACT

Thinocoridae is an endemic South American charadriiform group, consisting of four species and two genera: *Thinocorus rumicivorus*, *T. orbignyianus*, *Attagis malouinus* and *A. gayi*.

The phylogenetic relationships of Thinocoridae and its taxonomic position relative to other avian groups, have been subject of considerable debate and have drawn the attention of systematists since the turn of the century. DNA-hybridization studies —Sibley *et. al.*, 1988— indicate that Pedionomidae, an Australian monotypic family, is the sister group of Thinocoridae. This phylogeny, and the distribution of both the Thinocoridae and the Pedionomidae may suggest a Gondwanic origin for the ancestor of Thinocoridae. The DNA-hybridization results have produced much controversy. One way to test the current hypothesis is through the use of DNA sequences.

I sequenced a total of 1,044 and 408 base pairs from the mitochondrial genes cytochrome *b* and 12S rRNA genes, respectively. Phylogenetic trees were constructed using parsimony, distance, and maximum likelihood methods, using with Chionidae (*Chionis minor* and *C. alba*) and Scolopacidae (*Numenius americanus*) as outgroups. The rate of molecular evolution of the 12S rRNA gene was calibrated using the divergence between South American (*Ptero-*

*cpnemia pennata* and *Rhea americana*) and Australian ratites (*Dromaius novaehollandiae* and *Casuarius casuarius*), and the 38 million years of Australian isolation.

The topology obtained from the mitochondrial sequences agreed with the DNA-hybridization data. Thinocoridae is monophyletic, and Pedionomidae is its sister group.

Using the 12S rRNA molecular clock, the split of Pedionomidae and Thinocoridae would have occurred 39.8 million years ago (mya). This fits well with the date of separation of Australia from Antarctica at the end of the Eocene. The split of *Attagis* and *Thinocorus* would have occurred 22.7-20.5 mya, and corresponds roughly with global warming and the epicontinental marine incursions of the Miocene. Finally, the split of *T. orbignyianus* and *T. rumicivorus* would have occurred 7.4 mya, about the time of the glaciation and uplift of the Andean Range at the end of the Miocene.

When using transversions, the rate of molecular evolution of the 12S rRNA gene would be 3.3 times slower than the rates described for mammals and salamanders. However, larger amounts of mitochondrial nucleotide sequences would be required to adequately test these hypothesis.

## INTRODUCCIÓN

### a) Descripción de *Thinocoridae*

*Thinocoridae* es un grupo de Charadriiformes que está compuesto por dos géneros y cuatro especies: *Attagis gayi* (Geoffroy Saint-Hilaire y Lesson, 1831), *A. malouinus* [(Boddaert), 1783], *Thinocorus orbignyianus* (Geoffroy Saint-Hilaire y Lesson, 1831) y *T. rumicivorus* (Eschscholtz, 1829) [de Schauensee, 1982; Hayman *et al.*, 1986]. Esta familia es exclusivamente Neotropical y habita desde los Andes ecuatorianos hasta la porción más austral de Suramérica. Su rango de distribución presenta un gradiente de altitud extremo, desde las costas cálidas de Perú y Chile hasta el límite de nieves en la Cordillera de los Andes a 5,600 msnm (Chapman, 1926).

En general, son aves que tienen un aspecto similar al de una perdiz y se alimentan principalmente de semillas, brotes tiernos e insectos (Sibley y Ahlquist, 1990). Poseen un plumaje críptico con colores grises y cafés que consigue un mimetismo extraordinario. Generalmente, se trasladan en bandadas con un vuelo muy rápido semejante al de las becacas —*Gallinago*— y, en relación con su conducta reproductiva, colocan de tres a cuatro huevos cónicos sobre el suelo que presentan el patrón típico de colores crípticos descrito para

los Charadriiformes (Goodall *et al.*, 1951).

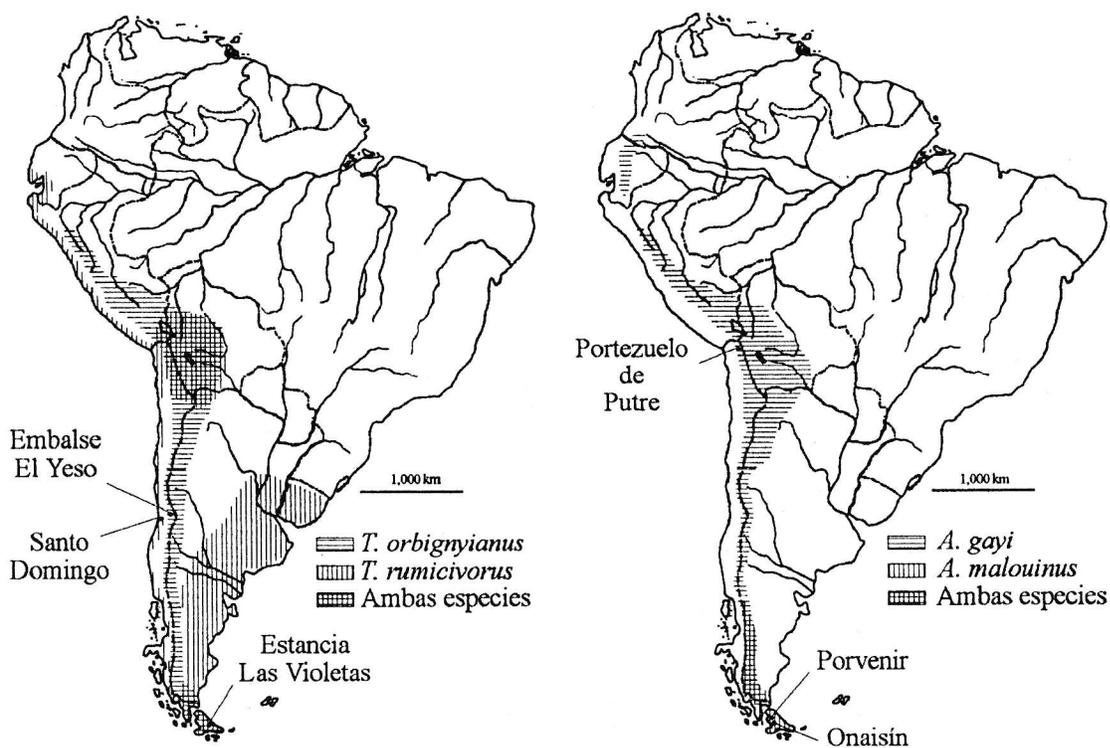
Específicamente, *Attagis gayi* habita la zona de la puna del sur de Ecuador, Perú, oeste de Bolivia y de todos los Andes chilenos. La distribución hacia el sur de esta especie se extiende hasta las zonas montañosas de Última Esperanza, Sierra Baguales y otras áreas elevadas del extremo norte del sector continental de Magallanes. En el oeste de Argentina, habita desde Salta y el sur de Jujuy hasta Magallanes (Figura 1; Goodall *et al.*, 1951; Philippi, 1964; Venegas, 1979).

*Attagis malouinus* habita también en planicies elevadas. Sin embargo, su distribución se encuentra restringida al sur de Chile en Magallanes y Tierra del Fuego. En Argentina, habita desde el oeste y sur de Río Negro hasta Tierra del Fuego, Cabo de Hornos, Isla de los Estados e Islas Falkland (Figura 1; Venegas, 1979).

*Thinocorus orbignyianus* habita desde los Andes del sur de Perú y suroeste de Bolivia hasta Magallanes. Rara vez desciende bajo los 700 msnm, excepto en el extremo sur de su rango de distribución. En el oeste de Argentina, habita desde Jujuy y Salta hasta Tierra del Fuego e Isla de los Estados (Figura 1; Maclean, 1969).

Finalmente, *Thinocorus rumicivorus* es la especie de menor tamaño y habita en terrenos abiertos con vegetación baja y esparcida, generalmente cercanos a la costa. Su distribución comprende parte de la costa sudoeste de Ecuador y la costa de Perú hasta el noroeste de Chile. También habita en la

zona de la puna de los Andes del oeste de Bolivia. Su distribución continúa por la costa de Chile desde el sur de Atacama hasta Magallanes. En Argentina, se encuentra en Jujuy, Tucumán y desde el sur de Río Negro hasta Tierra del Fuego e Islas de los Estados (Figura 1; Philippi, 1964).



**Figura 1.** Distribución geográfica y las localidades de captura de las cuatro especies que conforman Thinocoridae.

## b) Un Escolopácido Aberrante

Los grupos mayores de aves comienzan a distinguirse cuando Huxley (1867) define los tipos de paladar y su significación taxonómica, proponiendo agrupar a todas las aves *schizognatha* en un sólo gran grupo. Según este carácter, *Thinocoridae* no era considerado dentro de los *Charadriiformes*, por poseer un paladar del tipo *aegithognatha*.

Garrod (1877), quien revolucionó la sistemática de las aves al proponer una clasificación de todas las aves conocidas en su época, estudió la anatomía de *Thinocoridae* confirmando, entre otras cosas, que la pterilosis de *Thinocoridae* es del tipo *Charadriiforme*. Garrod postuló que los parientes más cercanos a esta familia son *Cursorius* y *Glareola*: "...but Burmeister himself is of opinion that this remarkable bird, which Wagler very improperly compares with the Sand-Grouse (*Pterocles*), is in every particular an aberrant Scolopacine form, related to *Glareola*...".

Los sistemáticos de la segunda mitad del siglo pasado ya reconocían la relación de *Thinocoridae* con el grupo de los *Charadriiformes*, esto es, con *Laridae*, *Chionidae*, *Alcidae*, *Charadriidae* y *Scolopacidae*, entre otros (Seebohm, 1888; Fürbringer, 1888; Shufeldt, 1891 y Sharpe, 1981). Posteriormente, esta relación fue reforzada con estudios de anatomía interna, tales como los estudios miológicos de Mitchell (1905). Sin embargo, Mathews e Iredale (1921) apuntaron que los caracteres internos que favorecían la alianza con los *Charadriiformes* habían sido mal entendidos y colocaron a *Thinocoridae* junto con los

Galliformes.

Las características morfológicas de *Thinocoridae* motivaron a Lowe (1923) a sugerir que esta familia, junto con *Turnicidae* y *Pteroclididae*, sería un relictos de un grupo ancestral que estaría extinto y de donde se habrían originado grupos actuales como *Columbidae* (palomas) o *Charadriidae* (chorlos). Sin embargo, con estudios morfológicos posteriores detallados de *Thinocorus* y *Attagis*, Lowe modificó su opinión previa considerando que *Thinocoridae* es indudablemente un Charadriiforme.

Stresemann (1927-34) propuso varios rearrreglos dentro de los Charadriiformes y señaló una relación lejana de *Thinocoridae* con *Gruidae* y *Aramidae* (grullas). Esta observación fue reafirmada por Mayr y Amadon (1951), quienes comentan que los Charadriiformes podrían estar relacionados con las grullas a través de *Burhinidae*, *Jacaniidae* o *Thinocoridae*. Diez años más tarde, Verheyen (1961) destaca el paralelismo entre *Pteroclididae* y *Thinocoridae* y considera que estos dos grupos están relacionados por paramorfogénesis, colocándolos en un suborden separado dentro de sus Columbiformes.

Otro rasgo aberrante de *Thinocoridae* fue revelado por los estudios de Stresemann (1966), quien estudia el patrón de muda que presenta esta familia. La muda de las plumas primarias comienza en forma ascendente desde la más interna, es decir, la décima pluma. Sin embargo, después que se reemplaza la octava o séptima pluma, la muda procede en forma irregular, lo que difiere a lo descrito para otros Charadriiformes.

Posteriormente, con el uso de las primeras técnicas moleculares, se reafirmó la alianza de *Thinocoridae* con los *Charadriiformes*. Sin embargo, a partir de la electroforesis de hemoglobinas y ovoalbúminas, no fue posible establecer el grupo más cercano a *Thinocoridae* (Sibley *et al.*, 1968; Sibley y Ahlquist, 1972).

Las últimas evidencias, basadas en la hibridación de DNA, muestran que *Thinocoridae* es en realidad un *Charadriiforme* y que *Pedionomidae* es su pariente más cercano, tal como se sugirió previamente sobre la base de estudios osteológicos (Olson y Steadman, 1981). Además, *Scolopacidae* aparece como grupo hermano de las dos familias anteriores (Sibley *et al.*, 1988).

En relación con la historia de la posición taxonómica de *Pedionomidae* en la clasificación de las aves del mundo, las primeras referencias se remontan a la segunda mitad del siglo pasado, cuando Huxley (1867) agrupa a *Pedionomus* con *Turnicidae*, *Tinamidae* (perdices) y *Charadriidae*, postulando que *Pedionomus* sería el nexo que une a *Turnicidae* y *Charadriidae*. Posteriormente, los estudios comparativos de Gadow (1893) incluyeron a *Pedionomidae* junto con algunos *Galliformes*, conclusión que sería reforzada por los estudios de Verheyen (1961), donde *Turnicidae* y *Pedionomidae* permanecen en el mismo suborden dentro de este orden de aves.

Sin embargo, esta estrecha relación de *Turnicidae* y *Pedionomidae* fue por primera vez refutada por Bock y McEvey (1969), quienes encontraron diferencias osteológicas suficientes entre estas dos familias como para colocarlas

en grupos distintos pero siguieron considerándolas como representantes anómalos de los Gruiformes.

Curiosamente, en los estudios de electroforesis de ovoalbúminas de Sibley y Ahlquist (1972) no se discute acerca del patrón de migración de proteínas para Pedionomidae ni se presenta la fotografía del gel electroforético, sino que se limitan solamente a incluir esta familia entre los Gruiformes. Probablemente habían encontrado ya la notable peculiaridad de Pedionomidae en relación con el resto de los Gruiformes.

Los estudios osteológicos de Olson y Steadman (1981), dirigidos específicamente a determinar el verdadero grupo hermano de Pedionomidae, fueron determinantes para el cambio rotundo en la clasificación de este grupo, el que, hasta ese momento, era considerado como pariente de los Gruiformes. Los resultados de este estudio proporcionaron evidencias para sostener la relación de Pedionomidae de Australia con los Charadriiformes y en especial con Thinocoridae de Suramérica (Olson y Steadman, 1981: 22).

Con esta revisión histórica concerniente a la clasificación de Thinocoridae y Pedionomidae, queda en evidencia que estos grupos de Charadriiformes muestran características bastante peculiares que han sido responsables de una clasificación antojadiza y debatida. Esto revela la necesidad de caracteres neutros —como las secuencias nucleotídicas—, modelos para su dinámica de cambio y métodos de reconstrucción filogenética rigurosos y objetivos, que permitan establecer las relaciones evolutivas de acuerdo a un criterio temporal

más independiente de la biología fenotípica de estas especies.

### c) El Problema

Las biotas del hemisferio sur han representado un papel preponderante en la formulación de modelos vicariantes y en la data de divergencias entre taxa de continentes que una vez conformaron una sola región biogeográfica (Hill y Scriven, 1995). Varios taxa que poseen una distribución fragmentada, como las ratites, los marsupiales o las fagáceas, son sólo algunos ejemplos de muchos otros grupos que han sido responsables de debates en torno a la importancia de la especiación por vicarianza o dispersión (Croizat *et al.*, 1974; Platnick y Nelson, 1978).

Las hipótesis alternativas de especiación han sido sometidas a prueba sólo después del desarrollo de métodos de reconstrucción filogenética, en donde las relaciones entre taxa hermanos son vitales para argumentar en favor de los eventos de especiación originados como consecuencia de derivas continentales (Brown y Gibson, 1983).

Una forma de dirimir entre vicarianza y dispersión es estimar la edad de los eventos cladogénéticos correspondientes a cada uno de los nodos de un cladograma y reconocer su coincidencia o no con sucesos geológicos como el establecimiento de nuevas barreras geográficas (McDowall, 1978). Además, para datar la posición de cada nodo en una escala temporal sobre la base de la presencia de paleolinajes, es necesario un registro fósil generoso que en la mayoría de los casos no lo es, especialmente en aves (Carroll, 1988).

La sistemática molecular ofrece una solución al problema de escasez de

registros fósiles, dado que permite establecer relaciones filogenéticas entre taxa y a la vez estimar la magnitud de la divergencia entre secuencias ortólogas provenientes de dichos taxa (Ridley, 1993). En vista de la teoría neutral, se espera que esta divergencia sea sólo función del tiempo de divergencia de los taxa y de la tasa evolutiva del marcador molecular (Kimura, 1986). Actualmente, los relojes moleculares basados en secuencias nucleotídicas de DNA mitocondrial están siendo utilizados para estimar tiempos de divergencia entre taxa. No obstante, antes de obtener datos confiables, la tasa de cambio y su error asociado necesita ser calculada independientemente para cada gen y grupo taxonómico en particular (Rand, 1994).

Aunque la monofilia de *Thinocoridae* nunca ha sido objeto de debate, sus relaciones filogenéticas intrafamiliares y sus relaciones con otros grupos de aves han llamado la atención de los sistemáticos desde el siglo pasado. Como se menciona con anterioridad, sus similitudes a escala morfológica, su hábitat de regiones áridas y abiertas y la presencia de una molleja, sugirieron probablemente a los sistemáticos —como Bonaparte (1853) o Lilljeborg (1866)— que los parientes más cercanos a *Thinocoridae* serían *Pteroclididae* de África —gargas—, *Tinamidae* del Neotrópico o Galliformes (Sibley y Ahlquist, 1990: 463-464). Hasta esa fecha y dependiendo del carácter morfológico considerado, la posición taxonómica de *Thinocoridae* permaneció confusa.

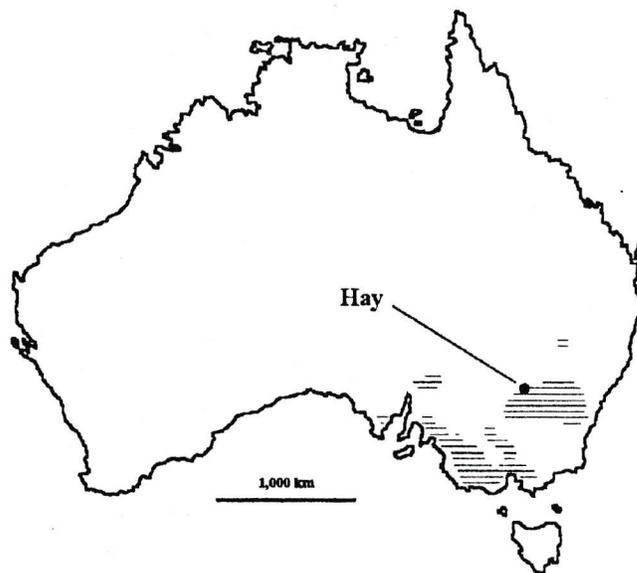
Una de las últimas evidencias que apunta a esclarecer el problema de la filogenia de *Thinocoridae* proviene de la osteología comparada y la hibridación

de DNA (Olson y Steadman, 1981; Sibley y Ahlquist, 1988). Los resultados de estos estudios indican que el grupo hermano de *Thinocoridae* sería una familia monotípica endémica del sureste de Australia, *Pedionomidae*, que hasta fines del siglo pasado había sido agrupada junto con los Gruiformes (Wetmore, 1960, ver la Figura 2). Tal proposición, unida a la distribución actual de *Thinocoridae* y *Pedionomidae*, sugiere un origen Gondwánico para el ancestro de estos dos grupos. Además, el método de hibridación de DNA muestra a *Attagis gayi* como grupo hermano de las dos especies de *Thinocorus* y, en relación con los niveles de divergencia, las dos especies de *Thinocorus* divergen en un  $\Delta T_{50H} = 4.2$ , mientras que *Attagis gayi* presenta un  $\Delta T_{50H} = 7.9$  relativo a *Thinocorus* (Figura 3). Sin embargo, la filogenia de *Thinocoridae* obtenida a través de la hibridación de DNA está incompleta, faltando *Attagis malouinus* en los análisis. Finalmente, el grupo hermano *Pedionomidae* dista con un  $\Delta T_{50H} = 10.8$  de *Thinocoridae* (Figura 3).

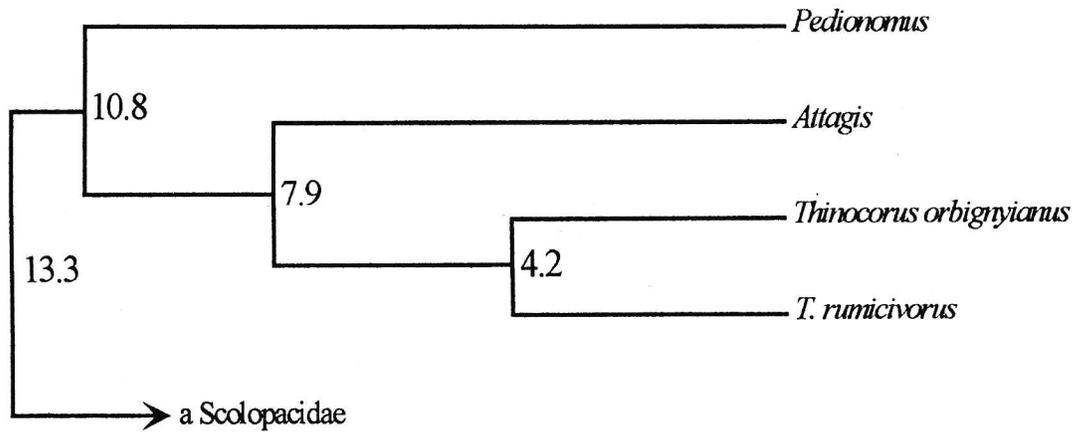
El nexa entre *Thinocoridae* de Suramérica y *Pedionomidae* de Australia proporcionaría un escenario biogeográfico adecuado para establecer y reconocer el papel histórico de la deriva de continentes del hemisferio sur —Suramérica, Antártica y Australia— en la filogenia de este grupo de Charadriiformes. Esto podría ser sometido a prueba a través del análisis filogenético con marcadores moleculares que permitan datar temporalmente cada nodo generado.

Por otro lado, la filogenia de las aves del mundo generada a partir de la hibridación de DNA ha recibido una fuerte crítica en relación con el grado de

solidez del análisis (Harshman, 1994). Las secuencias nucleotídicas de genes mitocondriales podrían proporcionar un marco de contraste y un complemento de los resultados presentados por Sibley y Ahlquist en 1988 (Sibley y Ahlquist, 1990; Ahlquist *et al.*, 1987).



**Figura 2.** Distribución geográfica y la localidad de captura de *Pedionomus torquatus* (según Llewellyn, 1974).



**Figura 3.** Relaciones filogenéticas de Thinocoridae obtenidas a través de la hibridación de DNA (según Sibley *et al.*, 1993: 848). Se señalan los  $\Delta T_{50H}$  para cada nodo en el fenograma.

**d) Genes del DNA Mitocondrial: Citocromo *b* y rRNA 12S**

Las secuencias de genes mitocondriales han sido utilizadas en forma extensiva para resolver relaciones filogenéticas en una amplia variedad de niveles de jerarquía taxonómica. Las propiedades del DNA mitocondrial, tales como la heredabilidad maternal, la ausencia de recombinación, el alto número de copias y una alta tasa de evolución molecular, han convertido a esta molécula en un marcador óptimo para la reconstrucción filogenética (Hillis y Moritz, 1990; Wilson *et al.*, 1985). Otra de las ventajas es el gran número de caracteres informativos que pueden ser obtenidos a partir de tales secuencias nucleotídicas. En principio, cada mutación de un nucleótido en un gen puede ser examinada e incorporada dentro del análisis filogenético.

Por otro lado, se han descrito los patrones de evolución molecular para varios genes del DNA mitocondrial. Las tasas diferenciales de cambio respecto al tipo de sustituciones nucleotídicas —transversiones o transiciones—, posición del codón o tipo de aminoácido reemplazado (Naylor *et al.*, 1995), han mostrado ser características de cada gen y es posible optar *a priori* por el gen más informativo filogenéticamente de acuerdo a la magnitud de la divergencia de los taxa que van a ser examinados. Los genes que evolucionen muy lentamente relativo a la edad del grupo en cuestión no tendrán el número suficiente de caracteres informativos, y los genes que cambien a una tasa demasiado rápida estarán expuestos a la homoplasia y presentarán una señal filogenética insuficiente y aleatoria (Simon *et al.*, 1994).

En general, el gen mitocondrial que ha sido más utilizado en el campo de la sistemática de aves y vertebrados es el citocromo *b* (Edwards *et al.*, 1991; Helm-Bychowski y Cracraft, 1993; Krajewski y Fetzner, 1994), dada la disponibilidad de partidores universales para la secuenciación de esta molécula a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Saiki *et al.*, 1988).

Sin embargo, muchos estudios que han usado secuencias nucleotídicas del gen citocromo *b* han encontrado una resolución escasa en las ramas basales de los cladogramas generados, fenómeno que se conoce como "filogenia estrellada" (Helm-Bychowski y Cracraft, 1993). Este fenómeno ocurre debido a la pérdida creciente de mutaciones que son filogenéticamente informativas hacia la raíz del cladograma. Específicamente, existe una carencia de sustituciones que pueden resolver los nodos basales, dado que la mayoría de los sitios que cambian libremente habrán sufrido mutaciones sobrepuestas, dejando así la mayor parte de los caracteres informativos definiendo adecuadamente sólo los nodos más recientes. La tasa de sustitución que posee el citocromo *b*, determinada por restricciones funcionales, lo convierte en un gen útil para estimar filogenias de grupos con una divergencia no mayor que 50 ma (Graybeal, 1994).

Si se consideran los resultados obtenidos a partir de la hibridación de DNA, el nodo del fenograma que sostiene la relación de Pedionomidae y Thincoridae, posee un valor de  $\Delta T_{50H} = 10.8$  (Figura 3, página 15; Sibley y Ahlquist, 1988). Utilizando la calibración de  $\Delta T_{50H} = 1.0 = 4.5$  ma (Sibley y Ahl-

quist, 1983), este nodo tendría una edad de 49 ma, de modo que la separación de Pedionomidae y Thinocoridae habría ocurrido a mediados del Eoceno, probablemente cuando Australia se separó de la Antártica. Sobre la base de la misma calibración anterior, el nodo que sostiene la relación de los dos géneros *Attagis* y *Thinocorus* tendría una edad de 30 ma. Según estos tiempos de divergencia y considerando el poder de resolución del gen citocromo *b*, es posible suponer *a priori* que este gen presentará una alta resolución de los nodos más recientes, pero a la vez tendrá problemas de saturación y no podrá ser igualmente informativo en las ramas basales del cladograma al reconstruir la filogenia de Thinocoridae.

Una forma de incrementar el número de caracteres que resuelvan las ramas basales de un cladograma es secuenciar otro gen que evolucione a una tasa más lenta y, al concatenar las secuencias de ambos genes, será posible aumentar la resolución de los nodos basales. Además, considerando que los genes del DNA mitocondrial están ligados en ausencia de recombinación, al concatenar las secuencias de dos o más genes se generaría en principio un incremento directo en la resolución filogenética de todos los nodos del cladograma.

El gen mitocondrial rRNA 12S se considera como un gen que evoluciona a una tasa menor que el gen citocromo *b*, debido a la alta presión selectiva que significa su funcionalidad en un nivel de estructura secundaria (Springer *et al.*, 1995). Dada esta lentitud del reloj molecular del rRNA 12S, este gen ha sido

útil para estimar relaciones filogenéticas entre grupos que presentan un gran tiempo de divergencia en el reino animal (Field et al., 1988) y eventualmente datar temporalmente eventos de especiación entre linajes de vertebrados, dado que su tasa de evolución ha sido calibrada sobre la base de registros fósiles (Caccone *et al.*, 1994 y Kraus y Miyamoto, 1991). Por lo tanto, al utilizar las secuencias del gen citocromo *b* junto con las del gen rRNA 12S en los análisis filogenéticos de Thinocoridae, se espera que se incremente la resolución para la mayoría de los nodos en los distintos niveles de divergencia. Es así como se justifica el uso de estos dos genes en conjunto para establecer las relaciones filogenéticas del grupo problema, Thinocoridae.

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de esta tesis es establecer las relaciones filogenéticas intrafamiliares e interfamiliares de *Thinocoridae* (Aves, Charadriiformes) a partir de secuencias nucleotídicas de los genes mitocondriales citocromo *b* y rRNA 12S.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la secuencia nucleotídica de los genes citocromo *b* y rRNA 12S de cada una de las cuatro especies que conforman a Thinocoridae y sus grupos externos Pedionomidae, Scolopacidae y Chionidae.
2. Confeccionar árboles filogenéticos usando métodos de reconstrucción filogenética parsimoniosos, de distancia y de probabilidad máxima.
3. Calibrar el reloj molecular del gen rRNA 12S y estimar el tiempo de divergencia de cada nodo en el árbol filogenético de Thinocoridae.
4. Proponer un modelo de especiación para Thinocoridae.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. A partir de las evidencias de hibridación de DNA propuesta por Sibley *et al.* (1988), se espera encontrar la misma topología, pero ahora sobre la base de caracteres neutros como son las secuencias nucleotídicas de DNA, del grupo en estudio. Sin embargo, en los análisis de hibridación no se consideró a *Attagis malouinus* (Figura 3, página 15). Esta especie podría presentar una ecomorfología paralela a la de *Attagis gayi* y, si es así, *Attagis* sería un grupo parafilético. Por lo tanto, la hipótesis nula de trabajo sería

**H<sub>0</sub>:** *Attagis* y *Thinocorus* son recíprocamente monofiléticos, siendo Pedionomidae el grupo hermano de Thinocoridae

y la hipótesis alternativa (una de ellas)

**H<sub>1</sub>:** *Attagis* es parafilético y *Thinocorus* monofilético, siendo Pedionomidae el grupo hermano de Thinocoridae.

2. Considerando la distribución de Thinocoridae y su grupo hermano Pedionomidae —Sudamérica y Australia, respectivamente— y el tiempo de divergencia entre estas familias, estimado a partir de la magnitud de la distancia genética, sería equivalente o no al tiempo de disyunción entre Australia y la Antártica si es que,

**H<sub>0</sub>: la separación de Thinocoridae y Pedionomidae corresponde a un evento cladogenético vicariante**

o si

**H<sub>1</sub>: la distribución actual de Thinocoridae y Pedionomidae puede explicarse por dispersión,**

respectivamente.

## MATERIALES Y MÉTODO

### a) Colecta y Preservación de las Muestras

Se colectaron y procesaron 13 especímenes correspondientes a ocho especies, cuatro especies del grupo interno Thinocoridae —*Thinocorus rumicivorus*, *T. orbignyianus*, *Attagis gayi* y *A. malouinus* (dos individuos por taxon)— y cuatro especies como grupos externos pertenecientes a las familias Pedionomidae —*Pedionomus torquatus* (grupo hermano)—, Scolopacidae —*Numenius americanus*— y Chionidae (*Chionis minor* y *C. alba*, ver la Tabla 1). Los especímenes de referencia fueron depositados en el Museo Nacional de Historia Natural (MNHN) de Chile y en el Royal Ontario Museum (ROM) de Canadá.

Inmediatamente después de haber sacrificado el animal, se removieron algunas muestras de tejido de músculo cardíaco, músculo pectoral e hígado —excepto de *Pedionomus torquatus* y *Attagis malouinus*, ver más adelante—. Los tejidos fueron recuperados en tubos criogénicos y congelados en nitrógeno líquido durante el transporte al laboratorio, en donde fueron almacenados a -80 °C.

En *Attagis malouinus*, sólo se obtuvieron muestras de trozos de pieles de colección —de dos individuos— donadas por el MNHN de Chile.

Las localidades de colecta de las cuatro especies que conforman Thino-  
coridae se presentan en la Figura 1 (página 4) junto con sus rangos de distribu-  
ción geográfica respectivos.

Por otro lado, considerando el estado de conservación de *Pedionomus  
torquatus* (Llewellyn, 1974), de esta especie se obtuvo solamente muestras de  
sangre de dos especímenes. La sangre se extrajo de la vena braquial, se mez-  
cló directamente con 0.1 V de EDTA (500 mM, pH 8.0) y se congeló inmedia-  
tamente en nitrógeno líquido.

Las muestras de pieles de colección y la sangre fueron procesadas de la  
misma forma que el resto de los tejidos.

**Tabla 1.** Número de individuos por especie y las localidades en donde fueron colectados.

Taxa	Localidad				Código <sup>a</sup>
	Nombre	País	Latitud	Longitud	
<b>Thinocoridae</b>					
<i>Thinocorus rumicivorus</i>	Playa de Santo Domingo	Chile	33° 40' S	71° 39' O	JG 0028
<i>T. rumicivorus</i>	Estancia Las Violetas	Argentina	53° 41' S	67° 56' O	AJB 4410
<i>T. orbignyianus</i>	Portezuelo de Putre	Chile	18° 12' S	69° 35' O	JG 0002
<i>T. orbignyianus</i>	Embalse El Yeso	Chile	33° 36' S	70° 00' O	MKP 2553
<i>Attagis gayi</i>	Portezuelo de Putre	Chile	18° 12' S	69° 35' O	JG 0001
<i>A. gayi</i>	Portezuelo de Putre	Chile	18° 12' S	69° 35' O	JG 0011
<i>A. malouinus</i>	Onaisin, T. del Fuego	Chile	53° 24' S	69° 19' O	MNHN 4375
<i>A. malouinus</i>	Porvenir, T. del Fuego	Chile	53° 17' S	70° 21' O	MNHN 4534
<b>Pedionomidae</b>					
<i>Pedionomus torquatus</i>	Hay, Nueva Gales del Sur	Australia	30° 55' S	145° 05' E	MKP 2685
<i>P. torquatus</i>	Hay, Nueva Gales del Sur	Australia	30° 55' S	145° 05' E	MKP 2687
<b>Scolopacidae</b>					
<i>Numenius americanus</i> <sup>b</sup>	Alberta	Canadá	55° 00' N	115° 00' O	RCA 8847
<b>Chionidae</b>					
<i>Chionis minor</i>	Isla Crozet	Francia	46° 00' S	52° 00' E	CM 0002
<i>C. alba</i>	Río Grande	Argentina	36° 09' S	69° 41' O	AJB 4465

a: Los códigos corresponden a los números de colección de tejidos congelados del ROM (Canadá) excepto los de *A. malouinus* que pertenecen a las colecciones de pieles del MNHN (Chile). Cada número del código, más la primera letra del nombre genérico y del nombre específico, se utilizará como la abreviación que identificará a cada individuo en este documento, ejemplo: *Attagis gayi* JG 0001 = Ag0001.

b: Secuencia obtenida por Birt y Baker (datos no publicados).

## b) Aislamiento, Amplificación y Secuenciación del DNA

El DNA total fue aislado desde 0.1 g de tejido congelado (músculo cardíaco, músculo pectoral y/o hígado), 15 ul de sangre de *Pedionomus torquatus* y 0.5 cm<sup>2</sup> de piel de *Attagis malouinus*.

El tejido de cada espécimen fue macerado en 350 ul de buffer STE [100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 ul de SDS (10%) y 2 ul de proteinasa K (20 mg/ml)]. La mezcla fue rotada suavemente durante 12 h a 52 °C. Posteriormente, el DNA fue extraído dos veces con 500 ul de fenol —saturado con Tris-HCl— y una vez con 500 ul de una solución cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 24/1 (Sambrook *et al.*, 1989).

El DNA fue precipitado por la adición de 4 ul de NaCl 5 M y 400 ul de etanol puro a -20 °C. La mezcla se agitó suavemente durante 5' y se congeló a -80 °C por 15'. Los precipitados de DNA, obtenidos por microcentrifugación, fueron lavados una vez con etanol (70%, -20 °C), secados en una centrifuga al vacío y resuspendidos en 200 ul de agua bidestilada.

Las amplificaciones, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fueron realizadas en un termociclador Perkin-Elmer-Cetus, usando diferentes combinaciones de partidores (Tabla 2 y Figura 4). Cada reacción de PCR (V = 25 ul) contuvo 2 ul de la solución de DNA templado y 23 ul de una solución con las siguientes concentraciones finales: 10 mM de Tris (pH 8.3), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 0.01% de gelatina, 160 ug/ml de albúmina sérica de bovino, 0.75 mM de dNTP, 1 uM de cada partidor y una unidad de la enzima

polimerasa de DNA Taq (*Thermus aquaticus*, Boehringer-Mannheim). En cada amplificación se utilizó un control negativo que, en lugar de DNA, contuvo agua estéril bidestilada. Todos los volúmenes de reacción fueron cubiertos con una o dos gotas de aceite mineral para prevenir la evaporación durante el calentamiento.

Las condiciones de PCR fueron: 30-35 y 40-48 ciclos de amplificación para el tejido fresco y el proveniente de trozos de pieles de colección, respectivamente; 94 °C por 45-90" para la desnaturación, 48-58 °C por 45-60" para el alineamiento y 72 °C por 45-120" para la extensión. El primer ciclo fue precedido por una etapa de desnaturación a 94 °C por 2' y el último ciclo fue seguido por una etapa de extensión a 72 °C por 5'.

El DNA amplificado fue purificado y extraído de geles de agarosa al 2% —en solución tampón TA— y visualizados con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. El DNA de las bandas fue extraído por centrifugación a 4,000 rpm por 10' en una microcentrífuga de mesón estándar usando puntas de pipetas filtradoras (Dean y Greenwald, 1995).

Se utilizó una batería de reactivos AmpliCycle (Perkin-Elmer) para secuenciar 5 ul de los productos de la amplificación utilizando los partidores de secuenciación señalados en la Tabla 2, de acuerdo al método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de comenzar la secuenciación, las muestras fueron desnaturadas a 95 °C por 5'.

El DNA marcado radioactivamente, con P<sup>32</sup>, fue separado en geles de

urea al 5% usando "Long Ranger" (J. T. Baker Inc., Phillipsburg, Nueva Jersey). Los geles fueron corridos por 1.5-5.5 h a 75 W. Para incrementar el número de bandas visibles, una gradiente de soluciones tampón fue confeccionada colocando 30 g de acetato de sodio en el recipiente inferior ( $V = 500$  ml). Luego de secar los geles en una estufa al vacío, estos fueron expuestos a películas sensibles a rayos X por 48-120 h.

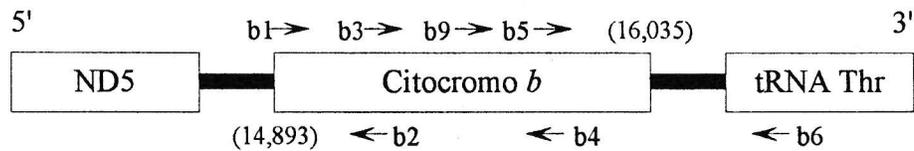
**Tabla 2.** Secuencia y localización de cada oligonucleótido usado como partidor para la amplificación y secuenciación del citocromo *b* y el rRNA 12S<sup>a</sup>.

Nombre <sup>b</sup>	Posición <sup>c</sup>	Secuencia del partidor
b1	L 14,990	5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'
b2	L 15,298	5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'
b3	L 15,212	5'-GGACGAGGCTTTTACTACGGCTC-3'
b4	H 15,689	5'-TTGCTGGGGTGAAGTTTCTGGGTC-3'
b5	L 15,578	5'-TTCCACCCCTACTTCTCACTAAAAGA-3'
b6	H 16,065	5'-GTCTTCAGTTTTTGGTTTACAAGAC-3'
b9	L 15,347	5'-GTCATCACAAACCTATTCTC-3'
12S a	L 1,091	5'-AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'
12S b	H 1,478	5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGGCGGTGTGT-3'

a: Los partidores del gen rRNA 12S (12Sa y 12Sb) corresponden a los de Kocher *et al.*, 1989. Los del citocromo *b* a los de Birt y Baker (datos no publicados).

b: Los nombres corresponden a aquellos esquematizados en la Figura 4.

c: Las letras (L) y (H) se refieren a la hebra liviana y pesada, respectivamente. Los números corresponden a la localización del extremo 3' del partidor en la secuencia del DNA mitocondrial de *Gallus gallus* (Desjardins y Morais, 1990).



**Figura 4.** Localización de los partidores utilizados en la amplificación y secuenciación del citocromo *b*. Se señalan entre paréntesis la posición del extremo 5' y 3' del citocromo *b* en el DNA mitocondrial de *Gallus gallus* (según Desjardins y Morais, 1990). Los oligonucleótidos y su posición exacta aparecen en la Tabla 2. Aguas arriba del citocromo *b* la subunidad 5 de la deshidrogenasa de NADH (ND5), aguas abajo el RNA de transferencia para treonina (tRNA Thr).

### c) Análisis de las Secuencias Nucleotídicas

Las secuencias del gen citocromo *b* fueron alineadas manualmente con un editor de secuencias ESEE, versión 3.0 (Cabot y Beckenbach, 1989). Las secuencias del gen rRNA 12S fueron alineadas previamente con CLUSTAL, versión 5.0 (Higgins *et al.*, 1991) y luego manualmente.

La estadística básica, como el porcentaje de composición de los diferentes nucleótidos, las matrices de distancias, el número de transiciones (ts), el número de transversiones (tv) y las razones de estas (ts/tv), fue calculada con el programa MEGA, versión 1.01 (Kumar *et al.*, 1993).

El sesgo en la composición de bases fue estimado por

$$C = \frac{2}{3} \sum |c_i - 0.25|, \quad (1)$$

en donde ( $c_i$ ) es la frecuencia de la  $i$ -ésima base (Irwin *et al.*, 1991).

Dada la hipótesis de trabajo, se utilizaron como grupos externos las secuencias de tres especies de Charadriiformes para enraizar los árboles filogenéticos: *Chionis minor*, *C. alba* y *Numenius americanus* (Tabla 1, página 26). *Thinocoridae* será tratado como grupo interno y como grupos externos *Pediionomidae*, *Scolopacidae* y *Chionidae*.

Las relaciones filogenéticas fueron investigadas con el criterio de parsimonia máxima usando el programa PAUP, versión 3.0 (Swofford, 1993). Los caracteres fueron especificados como no ordenados, los intervalos —deleciones o inserciones— se trataron como un nuevo estado del carácter (opción

“gapmode = newstate”) y la optimización para los estados del carácter fue “acctran”. Los árboles más parsimoniosos fueron determinados a través de una búsqueda exhaustiva (opción “exhaustive search”). Por otro lado, se utilizó el criterio de parsimonia ponderada con diferentes razones de ts/tv (5/1 y 10/1). Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de parsimonia considerando solamente las transversiones (“transversion parsimony”) y eliminando la tercera posición de las secuencias del gen citocromo *b*. Finalmente, con las topologías así generadas, se confeccionaron árboles de consenso estricto.

La confiabilidad de los nodos generados fue investigada a través de un análisis de “bootstrap” de 1,000 réplicas. Con los métodos de reconstrucción filogenética parsimoniosa, el análisis de “bootstrap” fue realizado a través de una búsqueda heurística (“heuristic search”) y la selección de los siguientes parámetros en PAUP: árbol inicial obtenido a través de “stepwise addition”; “collapse” (las ramas de largo igual a cero son tratadas como una sola politomía); “addseq = random” (la adición de los taxa al árbol en crecimiento es aleatoria); “#reps = 10” (10 repeticiones en la adición aleatoria de las secuencias); “hold = 1” (sostiene 1 árbol en cada ciclo); “branch-swapping = tree-bisection-reconnection (tbr)” (bisección y reconexión del árbol); “mulpars” (todos los árboles de largo óptimo se mantienen) y “steepest decent” (antes de pasar al próximo árbol más corto, permuta sobre todos los árboles hallados previamente). Para el cálculo de los índices de consistencia y retención se excluyeron los caracteres no informativos de acuerdo al criterio de parsimonia.

Adicionalmente, se utilizó una aproximación fenética para la reconstrucción filogenética. Las distancias genéticas fueron calculadas usando el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) corregido para mutaciones múltiples ("dnadist" de PHYLIP, versión 3.5; Felsenstein, 1992). Los árboles filogenéticos se confeccionaron utilizando el algoritmo de "Neighbor-Joining" (programa "neighbor" de PHYLIP; Saitou y Nei, 1987). El análisis de "bootstrap" fenético (1,000 réplicas) se confeccionó con los programas "seqboot", "dnadist", "neighbor" y "consense" de PHYLIP.

Finalmente, se utilizó el modelo de probabilidad máxima (Felsenstein, 1981) con la frecuencia de bases observada, la razón ts/tv por defecto, una categoría de tasa de sustitución de bases y la opción de rearrreglos globales ("dnaml" en PHYLIP). El análisis de "bootstrap" (1,000) con el modelo de probabilidad máxima se confeccionó a través de una búsqueda heurística, con la frecuencia de bases empírica y la adición aleatoria de los taxa (programa fast-DNAml, versión 1.0.6; Olsen et al., 1994).

Por otra parte, para distinguir la señal filogenética del ruido aleatorio, se evaluó la distribución del número de etapas requeridas por todas las topologías generadas a través de la búsqueda exhaustiva. El universo de muestras con- tuvo 2,027,025 árboles (Huelsenbeck, 1991; Hillis *et al.*, 1994).

Estos análisis se efectuaron con las secuencias de cada gen por separado —citocromo *b* y rRNA 12S— y también con el conjunto de ellas concatenadas, es decir, las secuencias obtenidas de cada gen fueron consideradas al

mismo tiempo en una matriz única.

#### d) Calibración del Reloj Molecular

Para descartar la posibilidad de dispersión posterior a la separación de Australia del resto del megacontinente Gondwánico, fenómeno que invalidaría el uso de la estimación temporal de este rompimiento y deriva continental, se utilizaron las secuencias del gen rRNA 12S de cuatro especies de ratites (Baker y Haddrath, datos no publicados), dado que son aves sin poder de vuelo. Específicamente, se calculó la distancia genética promedio según el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) entre dos ratites sudamericanas: *Rhea americana* (suri) y *Pterocnemia pennata* (ñandú), y dos australianas: *Dromaius novaehollandiae* (emú) y *Casuaris casuaris* (casuario). Se consideró un tiempo de separación entre estas taxa de 38 ma, data que corresponde a la estimación temporal de la separación de Australia del megacontinente Gondwánico (Kennett, 1980).

Con el reloj molecular calibrado de esta manera, se dató temporalmente el nodo que conduce a Pedionomidae y Thinocoridae.

### e) Constancia de Tasas de Evolución Molecular

Se utilizaron dos métodos estadísticos para probar homogeneidad en las tasas de evolución molecular entre los taxa y generar así árboles ultramétricos. El método de dos grupos (Takezaki *et al.*, 1995) consiste en calcular un delta ( $\delta$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación (ver Figura 5 y Figura 6):

$$\delta = b_A - b_B = L_{AC} - L_{BC}. \quad (2)$$

La hipótesis nula para esta prueba es  $H_0: \delta = 0$ , es decir, las tasas de evolución de los dos grupos (A y B) no diferirían en magnitud. La significación de  $H_0$  puede ser estimada con la curva de desviación típica normal considerando las dos colas de la distribución. El estadístico ( $Z$ ) se calcula por

$$Z = \frac{|\delta|}{\sqrt{V(\delta)}} \quad (3)$$

en donde  $V(\delta)$  es la varianza de ( $\delta$ ).

Con el segundo método, la prueba de longitud de ramas, se examina la disparidad entre la suma de las longitudes de las ramas desde la raíz a cada nodo terminal y la divergencia promedio de todos los taxa desde la raíz sin considerar el grupo externo (ver la Figura 6; Takezaki *et al.*, 1995). El estadístico utilizado en esta prueba es ( $Z$ ) calculado según la ecuación (3).

Estos dos métodos están implementados en el programa LINTRE<sup>1</sup> para

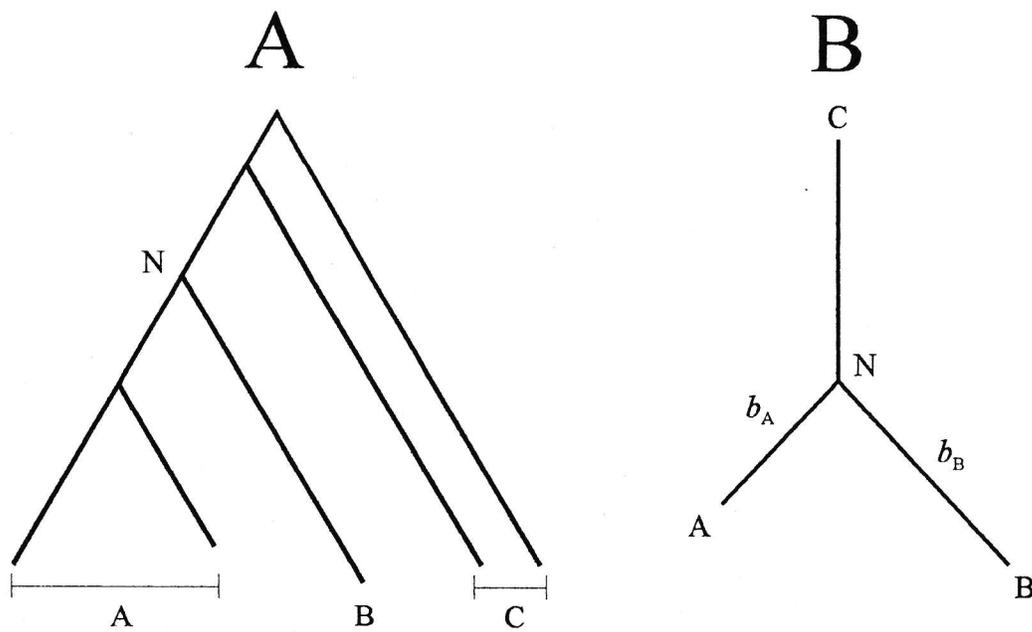
---

<sup>1</sup> Este programa fue proporcionado por el Dr. Naoko Takezaki (*National Institute of Genetics*, Japón).

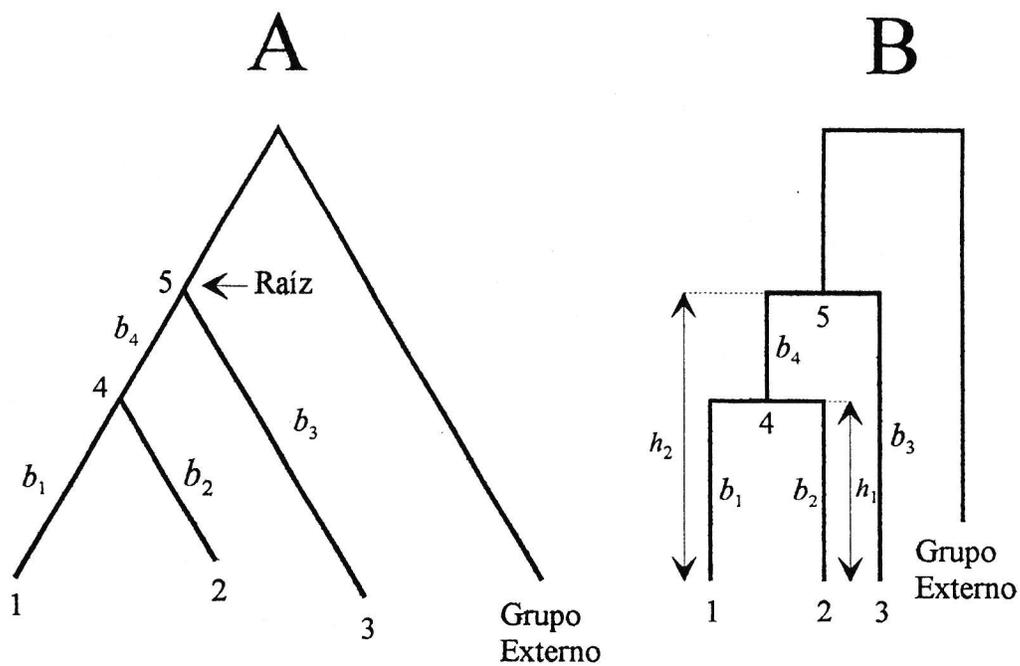
estaciones de trabajo (Takezaki, 1995). En estos análisis se utilizó la distancia genética según el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) basado solo en las transversiones, así como en las transversiones y transiciones. Además, se utilizaron como grupos externos las dos especies de Chionidae y a *Numenius americanus* (ver la Tabla 1, página 26).

Después de excluir las secuencias con una tasa de evolución significativamente diferente, se confeccionó el árbol ultramétrico respectivo (Figura 6). Luego, bajo el supuesto de constancia en las tasas de evolución molecular, se calculó la altura ( $h$ ) desde los nodos terminales al nodo raíz de los grupos correspondientes y su varianza  $[V(h)]$ . Posteriormente, se estimó el tiempo de divergencia de cada nodo por proporcionalidad directa al nodo que separa Pedionomidae de Thinocoridae.

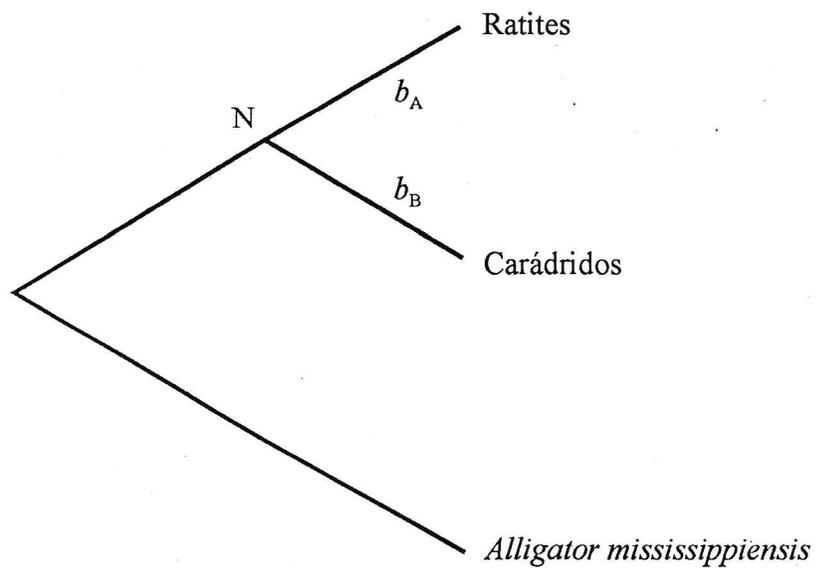
Por otro lado, para estimar la homogeneidad en las tasas de evolución molecular de ratites y carádridos, y así validar el uso de una calibración externa, se utilizaron los métodos de dos grupos y de longitud de ramas, usando la secuencia del gen rRNA 12S de *Alligator mississippiensis* como grupo externo (Figura 7; Hedges, 1994).



**Figura 5.** Método de dos grupos. *A*, los grupos A y B representan las secuencias descendientes, el grupo C puede contener cualquier número de secuencias y corresponde al grupo externo. *B*, es posible probar a través del método de dos grupos si las distancias promedias ( $b_A$  y  $b_B$ ) desde el nodo N (raíz del grupo interno) a las puntas de los grupos A y B difieren significativamente. Modificado de Takezaki *et al.*, 1995.



**Figura 6.** Método de longitudes de ramas y árboles ultramétricos. **A**, La prueba de las longitudes de ramas estima la disparidad entre la distancia comprendida desde la raíz a un nodo terminal del árbol (distancia que corresponde a la suma de los largos de las ramas. Por ejemplo, la distancia para el taxon 1 =  $b_1 + b_4$ ); y la distancia promedio de todos los taxa (excluyendo el grupo externo) a esta raíz. **B**, árbol ultramétrico. El largo de una rama exterior es el mismo que la altura del nodo que conduce a esta rama, es decir,  $b_1 = b_2 = h_1$  y  $b_3 = h_2$ . El largo de una rama interior se calcula por la diferencia entre estas alturas, por ejemplo,  $b_4 = h_2 - h_1$ . Según Takezaki *et al.*, 1995.



**Figura 7.** Constancia en las tasas de evolución del gen rRNA 12S en ratites y carádridos. Con la secuencia de *Alligator mississippiensis* como grupo externo (siguiendo a Hedges, 1994), es posible estimar la diferencia entre  $b_A$  y  $b_B$ , y así conocer que tan constantes son las tasas de evolución molecular en estas aves.

## RESULTADOS

### a) Composición de Nucleótidos en los Genes Citocromo *b* y rRNA 12S

De todos los taxa se obtuvo —al menos— un total de 1,044 pares de bases (pb) del gen citocromo *b*. Las secuencias se tradujeron completamente usando el código genético del DNA mitocondrial de *Gallus gallus* (Desjardins y Morais, 1990), no encontrándose codones internos de término ni cambios en el marco de lectura. En el género *Thinocorus* el codón de término fue TAG, mientras que en el resto de los taxa, incluyendo *Attagis*, se encontró el codón de término habitual: TAA (APÉNDICE A, página 140). La alineación de las secuencias del gen rRNA 12S resultó de un largo consensual por secuencia de 408 pb, considerando todos los intervalos (APÉNDICE B, página 148).

La composición promedio de nucleótidos en el gen citocromo *b*, incluyendo a los grupos externos y considerando todas las posiciones del codón, fue de 29.0% de adenina (A), 25.4% de timina (T), 33.3% de citosina (C) y 12.3% de guanina (G), observándose un sesgo total de  $C = 0.17$  (Tabla 3 y Figura 8). Esta composición de nucleótidos fue muy similar en las diferentes especies.

La frecuencia de los cuatro nucleótidos difiere en relación con la posi-

ción del codón. Existe una distribución de frecuencias de bases más equilibrada en la primera posición, encontrándose en esta posición el sesgo menor ( $C = 0.06$ ). En la segunda posición del codón, se observó un importante sesgo en la composición de bases de T y G ( $C = 0.22$ ), y en la tercera posición del codón, se encontró una elevada cantidad de C y una deficiencia en G ( $C = 0.48$ , Tabla 3 y Figura 9). Los sesgos en composición de bases, considerando cada una de las posiciones del codón, son comunes a todas las especies estudiadas en el citocromo *b*.

Las medidas de dispersión, tales como la desviación típica y el coeficiente de variación, indican que la tercera posición del codón es más variable que las dos primeras cuando se comparan todas las secuencias. Todas las medidas de desviación típica en la tercera posición del codón tienen valores sobre la unidad, encontrándose los tres valores de mayor magnitud entre todas las posiciones del codón (2.58, 3.08 y 2.94; celdas sombreadas en la Tabla 3). Respecto al coeficiente de variación, destacan los dos valores de mayor magnitud siempre en la tercera posición del codón (25.0 y 54.5; indicadas en la Tabla 3).

Considerando la premisa de independencia entre las diferentes posiciones del codón, la hipótesis nula de homogeneidad en la variación de la composición de nucleótidos entre cada posición del codón es rechazada si se considera en este análisis los porcentajes de G y C, bases que presentan el mayor rango observado (Kruskal-Wallis,  $P = 0.107$ ).

Por el contrario, en las secuencias del gen rRNA 12S, se observó una composición promedio de nucleótidos más o menos equilibrada entre A y C, por una parte (30.1% de A y 28.3% de C, respectivamente) y T y G por otra (20.3% de T y 21.3% de G;  $C = 0.11$ , ver la Tabla 4 y la Figura 8). De la misma forma que en el gen citocromo *b*, la composición de nucleótidos en el gen rRNA 12S fue muy similar entre las especies (Tabla 4).

Tabla 3. Composición de nucleótidos por taxon y sesgo en cada posición del codón del gen citocromo b.

Taxa	Posición del codón									Total						
	primera			segunda			tercera			A	T	C	G			
	A	T	G	A	T	G	A	T	G							
<i>Chionis minor</i>	25.3	23.9	28.7	22.1	20.1	40.8	25.6	13.5	38.8	16.1	41.1	4.0	28.1	26.9	31.8	13.2
<i>C. alba</i>	25.3	24.4	27.9	22.4	20.1	40.8	25.6	13.5	38.2	17.5	40.2	4.0	27.9	27.6	31.2	13.3
<i>Numenius americanus</i>	25.0	24.4	28.7	21.8	20.1	40.5	26.7	12.6	40.8	15.2	41.1	2.9	28.6	26.7	32.2	12.5
<i>Pedionomus torquatus</i> 2685	25.6	23.9	28.7	21.8	20.1	40.2	26.4	13.2	36.8	15.5	45.7	2.0	27.5	26.5	33.6	12.4
<i>P. torquatus</i> 2687	25.6	24.1	28.4	21.8	20.1	40.2	26.4	13.2	36.8	15.5	45.7	2.0	27.5	26.6	33.5	12.4
<i>Thinocorus orbignyianus</i> 0002	26.1	24.7	27.6	21.6	20.4	40.2	26.1	13.2	44.5	10.3	44.5	0.6	30.4	25.1	32.8	11.8
<i>T. orbignyianus</i> 2553	26.1	24.4	27.9	21.6	20.4	40.2	26.1	13.2	44.5	10.3	44.5	0.6	30.4	25.0	32.9	11.8
<i>T. rumicivorus</i> 0028	26.1	24.1	28.2	21.6	20.1	40.2	26.4	13.2	43.4	12.1	43.7	0.9	29.9	25.5	32.8	11.9
<i>T. rumicivorus</i> 4410	26.1	24.4	27.9	21.6	20.1	39.9	26.7	13.2	43.7	11.8	43.7	0.9	30.0	25.4	32.8	11.9
<i>Attagis gayi</i> 0001	27.0	22.4	29.0	21.6	20.1	39.7	27.0	13.2	40.8	9.2	48.3	1.7	29.3	23.8	34.8	12.2
<i>A. gayi</i> 0011	27.0	22.4	29.0	21.6	20.1	39.7	27.0	13.2	40.8	9.2	48.3	1.7	29.3	23.8	34.8	12.2
<i>A. malouinus</i> 4375	27.0	22.1	29.6	21.3	20.1	39.9	26.7	13.2	39.9	8.6	49.1	2.3	29.0	23.6	35.2	12.3
<i>A. malouinus</i> 4534	27.0	22.1	29.6	21.3	20.1	39.9	26.7	13.2	39.9	8.9	48.9	2.3	29.0	23.7	35.1	12.3
$\bar{x}$	26.1	23.6	28.6	21.7	20.1	40.2	26.4	13.2	40.7	12.3	45.0	2.0	29.0	25.4	33.3	12.3
<i>s</i>	0.69	0.95	0.62	0.29	0.11	0.35	0.44	0.02	2.58	3.08	2.94	1.09	0.98	1.33	1.25	0.46
CV	2.6	4.0	2.2	1.3	0.5	0.9	1.7	0.2	6.3	25.0	6.5	54.5	3.4	5.2	3.8	3.7
<i>C</i>	0.06			0.22			0.48			0.17						

*s*: desviación típica de la muestra ( $n = 13$ ). CV: coeficiente de variación. C: sesgo en la composición relativa de nucleótidos según la ecuación de Irwin *et al.*, 1991 [ver MATERIALES Y MÉTODO, sección c) Análisis de las Secuencias Nucleotídicas, en la página 32].

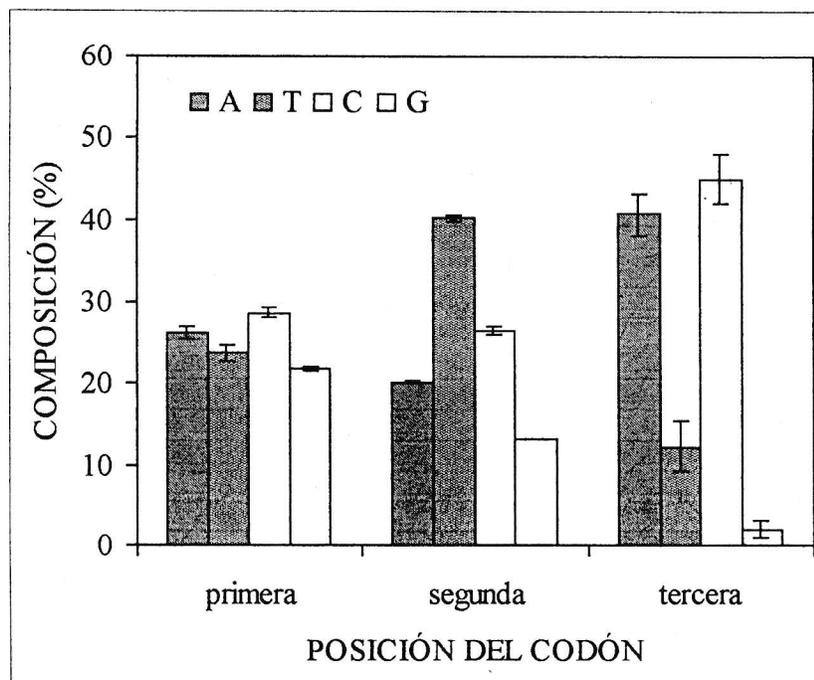
**Tabla 4.** Composición de nucleótidos y sesgo en el gen rRNA 12S.

Taxa	Composición de nucleótidos				Número de sitios
	A	T	C	G	
<i>Chionis minor</i>	28.9	22.6	25.6	22.9	398
<i>C. alba</i>	29.4	22.9	25.4	22.4	398
<i>Numenius americanus</i>	29.9	20.4	27.7	21.9	401
<i>Pedionomus torquatus</i> 2685	29.9	20.0	27.8	22.3	395
<i>P. torquatus</i> 2687	29.9	20.0	27.8	22.3	395
<i>Thinocorus orbignyianus</i> 0002	30.0	18.6	30.0	21.4	397
<i>T. orbignyianus</i> 2553	30.2	18.6	30.0	21.2	397
<i>T. rumicivorus</i> 0028	30.8	19.2	29.3	20.7	396
<i>T. rumicivorus</i> 4410	30.7	18.8	29.9	20.6	398
<i>Attagis gayi</i> 0001	30.5	20.7	28.5	20.4	397
<i>A. gayi</i> 0011	30.5	20.7	28.5	20.4	397
<i>A. malouinus</i> 4375	30.5	20.7	28.5	20.4	397
<i>A. malouinus</i> 4534	30.5	20.7	28.5	20.4	397
$\bar{x}$	30.1	20.3	28.3	21.3	
<i>s</i>	0.52	1.30	1.42	0.89	
CV	1.7	6.4	5.0	4.2	
<i>C</i>	0.11				

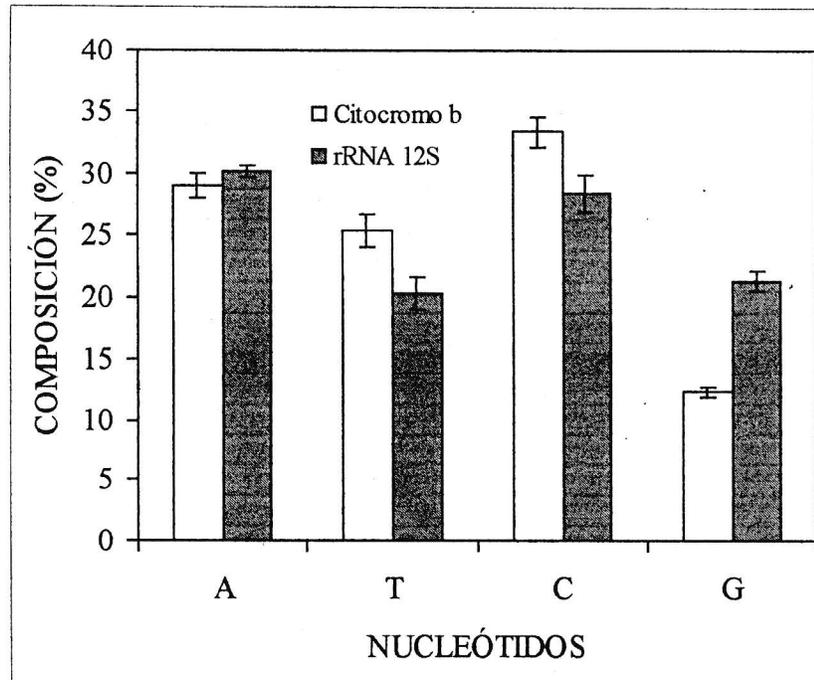
*s*: desviación típica de la muestra ( $n = 13$ ).

CV: coeficiente de variación.

*C*: sesgo en la composición relativa de nucleótidos según la ecuación de Irwin *et al.*, 1991 [ver MATERIALES Y MÉTODO, sección c) Análisis de las Secuencias Nucleotídicas, en la página 32].



**Figura 8.** Composición de nucleótidos en cada posición del codón del gen citocromo *b*. Los sesgos para la primera, segunda y tercera posición fueron: 0.06; 0.22 y 0.48, respectivamente (ver las Tablas 3 y 4). Las barras de error representan la desviación típica de la muestra ( $n = 13$ ).



**Figura 9.** Composición de nucleótidos en los genes citocromo *b* y rRNA 12S. Las barras de error representan la desviación estándar de la muestra ( $n = 13$ , ver la Tabla 4).

## b) Variabilidad en las Secuencias y Distancias Genéticas

De 1,044 pb del gen citocromo *b*, 334 sitios (32.0%) fueron variables; 66 (19.8%), 16 (4.8%) y 252 (75.4%) de ellos en la primera, segunda y tercera posición del codón, respectivamente (señalados en el APÉNDICE A, página 140). En el caso del gen rRNA 12S, de las 408 pb obtenidas, 116 sitios fueron variables (28.4%) considerando los intervalos y 104 (25.5%) fueron variables sin considerar los intervalos (señalados en el APÉNDICE B, página 148).

Las secuencias de los genes citocromo *b* y rRNA 12S, presentaron diferentes proporciones de ts/tv según la magnitud de la divergencia genética observada entre ellas. En promedio, el gen citocromo *b* presentó una razón ts/tv de  $\bar{x} = 2.50 \pm s = 2.38$  ( $n = 62$ ). El rango de las razones entre este tipo de sustituciones varió de 13.33 (40/3), entre las dos especies de Chionidae, a 1.20 (103/86) en las comparaciones de *Chionis alba* con *Pedionomus torquatus* (Tabla 5). La media de las razones observadas entre Pedionomidae y todas las especies de Thinocoridae fue de  $\bar{x} = 1.31 \pm s = 0.09$  ( $n = 16$ ). En el grupo interno las razones variaron de 11.00 entre los dos individuos de *Thinocorus rumicivorus*, a 1.89 entre *Attagis malouinus* (Am 4534) y *Thinocorus orbignyianus* (To 2553).

Razones mayores de ts/tv fueron observadas en el gen rRNA 12S,  $\bar{x} = 5.53 \pm s = 1.73$  ( $n = 53$ ), donde el valor mínimo fue 3.25 (39/12; To 0002 y Cm 0002) y el valor máximo 8.80 (44/5; entre To 2553 y Tr 0028 con *P. torquatus*) sin considerar los intervalos vacíos —deleciones o inserciones—. Entre Pe-

dionomidae y Thinocoridae la razón promedio fue de  $\bar{x} = 6.79 \pm s = 1.97$  ( $n = 16$ ). El grupo interno presentó un rango de razones menor que en el gen citocromo *b*, de 6.25 a 5.75 (Tabla 5).

En relación con las distancias genéticas obtenidas en el gen citocromo *b* entre las diferentes especies, la matriz de distancias presentó un promedio de  $\bar{p} = 0.123 \pm s = 0.052$  sub/st  $n = 78$ , considerando sólo la proporción de nucleótidos diferentes ( $p$  corresponde al número de sitios variables sobre el número total de sitios considerados, ver la Tabla 6). Empleando el modelo de dos parámetros de Kimura, la distancia promedio fue de  $\bar{d}_k = 0.139 \pm s = 0.061$  sub/st ( $n = 78$ ).

En general las dos formas de estimar la divergencia entre las especies entregan resultados similares cuando la distancia en cuestión es pequeña. Por ejemplo, a distancias menores que  $\approx 0.100$  sub/st, la discrepancia entre estas dos aproximaciones son  $\leq 10\%$  (Tabla 6). Este nivel de divergencia aparece en las comparaciones mutuas entre las especies que conforman a Thinocoridae.

Los valores de  $p$  variaron de 0.000, entre los individuos de las especies *Pedionomus torquatus*, *Attagis gayi* y *A. malouinus*, a  $0.183 \pm s = 0.012$  sub/st, entre *Chionis alba* y *Attagis*.

Thinocoridae presenta una distancia  $\bar{p} = 0.135 \pm s = 0.003$  sub/st ( $n = 16$ ) de su grupo hermano Pedionomidae (recuadro bajo la diagonal en la Tabla 6). Las distancias promedio a los grupos externos Scolopacidae y Chionidae fueron  $\bar{p} = 0.150 \pm s = 0.006$  sub/st ( $n = 8$ ) y  $\bar{p} = 0.173 \pm s = 0.007$  sub/st ( $n =$

16), respectivamente.

Las distancias  $d_k$  variaron de 0.000, entre los individuos de las especies *P. torquatus*, *A. gayi* y *A. malouinus*, a  $0.213 \pm s = 0.016$  sub/st, entre *A. gayi* y *Chionis alba*. Pedionomidae dista a un  $\bar{d}_k = 0.150 \pm s = 0.004$  sub/st ( $n = 16$ ) de Thinocoridae (recuadro sobre la diagonal en la Tabla 6). Considerando los grupos externos Scolopacidae y Chionidae, estos presentaron una divergencia promedio de  $\bar{d}_k = 0.169 \pm s = 0.008$  sub/st ( $n = 8$ ) y  $\bar{d}_k = 0.199 \pm s = 0.010$  sub/st ( $n = 16$ ) de Thinocoridae, respectivamente.

La discrepancia entre  $d_k$  (Pedionomidae-Thinocoridae) y  $p$  (Pedionomidae-Thinocoridae), indica la presencia de substituciones múltiples o superpuestas en algunos sitios, es decir, un aumento en la divergencia temporal absoluta no necesariamente implica un incremento en la proporción de nucleótidos diferentes. Incluso es posible que, a estos niveles de divergencia, un cierto número de mutaciones haya provocado una disminución en la distancia  $p$  entre las secuencias. Este fenómeno denominado efecto de saturación será tratado en la próxima sección.

En el caso del gen rRNA 12S, se obtuvo en general estimaciones de divergencia menores que en el gen citocromo *b*. La proporción promedio de nucleótidos diferentes fue de  $\bar{p} = 0.104 \pm s = 0.054$  sub/st ( $n = 78$ ) entre todas las secuencias y el modelo de dos parámetros de Kimura estimó un  $\bar{d}_k = 0.118 \pm s = 0.063$  sub/st ( $n = 78$ ; ver la Tabla 7).

La distancia  $p$  varió de 0.000, entre las especies de *Attagis* y los dos in-

individuos de *P. torquatus*, a  $0.159 \pm 0.019$  sub/st en las comparaciones de Chionidae con *Attagis*. En el caso del modelo de dos parámetros de Kimura, la distancia  $d_k$  presentó un rango de 0.000, entre los individuos de *Pedionomus* y *Attagis*, a  $0.187 \pm 0.026$  sub/st, entre *Numenius americanus* y *P. torquatus*.

El grupo hermano de Thinocoridae dista a un  $\bar{p} = 0.132 \pm s = 0.006$  sub/st ( $n = 16$ ; recuadro bajo la diagonal en la Tabla 7) y a un  $\bar{d}_k = 0.151 \pm s = 0.008$  sub/st ( $n = 16$ ; recuadro sobre la diagonal en la Tabla 7). Las proporciones promedio de nucleótidos diferentes entre Thinocoridae y los grupos externos Scolopacidae y Chionidae fueron  $\bar{p} = 0.136 \pm s = 0.008$  sub/st ( $n = 8$ ) y  $\bar{p} = 0.149 \pm s = 0.010$  sub/st ( $n = 16$ ), respectivamente. Las divergencias promedio sobre la base del modelo de dos parámetros de Kimura entre Thinocoridae y los grupos externos Scolopacidae y Chionidae fueron  $\bar{d}_k = 0.156 \pm s = 0.010$  sub/st ( $n = 8$ ) y  $\bar{d}_k = 0.171 \pm s = 0.014$  sub/st ( $n = 16$ ), respectivamente.

En el gen citocromo *b*, según los taxa comparados y la posición del codón considerada, existen diferencias respecto a la frecuencias promedio de transiciones y transversiones al examinar los diferentes clados con distinta divergencia genética (Tabla 8). En la primera posición del codón se observa una mayor frecuencia de transiciones (0.755), y dentro de este tipo de substituciones destacan las  $T \leftrightarrow C$ . Observando las transversiones, la mayoría son del tipo  $A \leftrightarrow C$  (0.125), seguidas en frecuencia por las del tipo  $T \leftrightarrow G$  (0.023). Las transiciones del tipo  $T \leftrightarrow C$  destacan nuevamente en la segunda posición del codón, siendo las transversiones muy escasas y, en general, esta posición del

codón es muy conservada dado la abundancia de valores cero (Tabla 8). Finalmente, en la tercera posición del codón, las transversiones del tipo  $A \leftrightarrow C$  son aproximadamente la mitad de las transiciones  $T \leftrightarrow C$ . Considerando todas las posiciones del codón, la mayor parte de las substituciones son transiciones ( $T \leftrightarrow C$  y  $A \leftrightarrow G$ ), y entre las transversiones, las del tipo  $A \leftrightarrow C$  y  $A \leftrightarrow T$  son las más comunes.

Si comparamos los distintos clados con niveles de divergencia diferentes se observa, a una divergencia temprana, que la mayor parte de las substituciones corresponden a transiciones del tipo  $T \leftrightarrow C$  (ver las comparaciones entre *Thinocorus orbignyianus* y *T. rumicivorus* en la Tabla 8). A medida que la divergencia aumenta, comienza a incrementarse el otro tipo de transición ( $A \leftrightarrow G$ ) y las transversiones (ver las comparaciones de Chionidae con el resto de las especies en la Tabla 8). Sin embargo, la segunda posición presenta un patrón distinto, comparado con la primera y tercera posición del codón. A una divergencia temprana, las transversiones del tipo  $A \leftrightarrow C$  son más frecuentes que las transiciones, pero en el siguiente nivel de divergencia (*Attagis gayi* y *A. malouinus*), este tipo de transversiones desaparece, siendo la totalidad de las substituciones las transiciones  $T \leftrightarrow C$ . Sin embargo, la situación se revierte a medida que aumenta la divergencia, mostrando una conducta de cambio más bien aleatoria entre los diferentes tipos de substituciones presentes en la segunda posición del codón. Además, existen substituciones ausentes como las transiciones  $A \leftrightarrow C$  y las transversiones  $A \leftrightarrow T$  y  $T \leftrightarrow G$ , no importando el nivel de

divergencia (Tabla 8).

En el gen rRNA 12S, considerando las frecuencias promedio de sustituciones, mayoritariamente las transiciones son del tipo A ↔ G (0.351) y T ↔ C (0.499; ver la Tabla 9). En cuanto a las transversiones, éstas son mínimas. En relación con la divergencia que presentan cada uno de los grupos comparados, a altos grados de divergencia, las transiciones siguen siendo más comunes que las transversiones y estas últimas presentan un patrón más bien equilibrado, en donde los cuatro tipos de transversiones están representados. En general, las diferencias que surgen en el patrón de sustituciones al comparar ambos genes, indican diferentes restricciones moleculares que estarían modulando la tasa y la clase de sustituciones a medida que aumenta la divergencia entre las especies examinadas.

**Tabla 5.** Razones de transiciones/transversiones en el gen citocromo *b* (sobre el diagonal) y el gen rRNA 12S (bajo el diagonal).

Taxa	Cm	Ca	Na	Pt 2685	Pt 2687	To 0002	To 2553	Tr 0028	Tr 4410	Ag 0001	Ag0011	Am 4375	Am 4534
Cm		40/3	106/72	97/83	97/83	107/75	104/75	99/69	101/70	104/74	104/74	100/74	100/76
Ca	3/0		117/71	103/86	103/86	105/78	102/78	100/72	104/73	114/77	114/77	112/79	112/79
Na	48/10	48/10		110/63	111/63	95/63	94/63	105/57	109/58	93/62	93/62	84/64	85/64
Pt 2685	49/11	47/11	54/7		1/0	79/58	78/58	82/58	86/59	79/63	79/63	78/65	78/65
Pt 2687	49/11	47/11	54/7	0/0		79/58	78/58	82/58	86/59	79/63	79/63	78/65	78/65
To 0002	39/12	41/12	42/6	43/5	43/5		3/0	58/10	58/9	75/35	75/35	72/37	71/37
To 2553	40/12	42/12	43/6	44/5	44/5	1/0		57/10	57/9	76/35	76/35	71/37	70/37
Tr 0028	42/12	42/12	45/6	44/5	44/5	10/0	11/0		11/1	88/29	88/29	81/31	80/31
Tr 4410	43/12	43/12	44/6	43/5	43/5	9/0	10/0	1/0		89/30	89/30	82/32	81/32
Ag 0001	47/14	47/14	47/8	44/9	44/9	24/4	25/4	24/4	23/4		0/0	15/2	16/2
Ag 0011	47/14	47/14	47/8	44/9	44/9	24/4	25/4	24/4	23/4	0/0		15/2	16/2
Am4375	47/14	47/14	47/8	44/9	44/9	24/4	25/4	24/4	23/4	0/0	0/0		1/0
Am 4534	47/14	47/14	47/8	44/9	44/9	24/4	25/4	24/4	23/4	0/0	0/0	0/0	0/0

Cm: *Chionis minor*, Ca: *C. alba*, Na: *Numenius americanus*, Pt: *Pedionomus torquatus*, To: *Thinocorus orbignyianus*, Tr: *T. rumicivorus*, Ag: *Attagis gayi*, Am: *A. malouinus*. Para más detalles ver la Tabla 1, página 26.

**Tabla 6.** Matriz de distancias y sus desviaciones típicas según el modelo de dos parámetros de Kimura  $d_k$  (sobre el diagonal) y las proporciones  $p$  (bajo el diagonal) en el gen citocromo  $b$ .

Taxa	Cm	Ca	Na	Pt 2685	Pt 2687	To 0002	To 2553
Cm		0.043 ± 0.007	0.196 ± 0.015	0.197 ± 0.015	0.197 ± 0.015	0.201 ± 0.016	0.197 ± 0.016
Ca	0.041 ± 0.006		0.209 ± 0.016	0.209 ± 0.016	0.209 ± 0.016	0.202 ± 0.016	0.198 ± 0.016
Na	0.170 ± 0.012	0.180 ± 0.012		0.190 ± 0.015	0.192 ± 0.015	0.171 ± 0.014	0.170 ± 0.014
Pt 2685	0.172 ± 0.012	0.181 ± 0.012	0.166 ± 0.012		0.000 ± 0.000	0.145 ± 0.013	0.144 ± 0.013
Pt 2687	0.172 ± 0.012	0.181 ± 0.012	0.167 ± 0.012	0.000 ± 0.000		0.145 ± 0.013	0.144 ± 0.013
To 0002	0.174 ± 0.012	0.175 ± 0.012	0.151 ± 0.011	0.131 ± 0.010	0.131 ± 0.010	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.002
To 2553	0.171 ± 0.012	0.172 ± 0.012	0.150 ± 0.011	0.130 ± 0.010	0.130 ± 0.010	0.065 ± 0.008	0.064 ± 0.008
Tr 0028	0.161 ± 0.011	0.165 ± 0.011	0.155 ± 0.011	0.134 ± 0.011	0.134 ± 0.011	0.064 ± 0.008	0.063 ± 0.008
Tr 4410	0.164 ± 0.011	0.170 ± 0.012	0.160 ± 0.011	0.139 ± 0.011	0.139 ± 0.011	0.105 ± 0.010	0.106 ± 0.010
Ag 0001	0.170 ± 0.012	0.183 ± 0.012	0.148 ± 0.011	0.136 ± 0.011	0.136 ± 0.011	0.105 ± 0.010	0.106 ± 0.010
Ag 0011	0.170 ± 0.012	0.183 ± 0.012	0.148 ± 0.011	0.136 ± 0.011	0.136 ± 0.011	0.104 ± 0.009	0.103 ± 0.009
Am 4375	0.169 ± 0.012	0.183 ± 0.012	0.142 ± 0.011	0.137 ± 0.011	0.137 ± 0.011	0.103 ± 0.009	0.102 ± 0.009
Am 4534	0.169 ± 0.012	0.183 ± 0.012	0.143 ± 0.011	0.137 ± 0.011	0.137 ± 0.011	0.103 ± 0.009	0.102 ± 0.009
Taxa	Tr 0028	Tr 4410	Ag 0001	Ag 0011	Am 4375	Am 4534	
Cm	0.183 ± 0.015	0.187 ± 0.015	0.196 ± 0.015	0.196 ± 0.015	0.193 ± 0.015	0.193 ± 0.015	0.193 ± 0.015
Ca	0.188 ± 0.015	0.194 ± 0.015	0.213 ± 0.016	0.213 ± 0.016	0.212 ± 0.016	0.212 ± 0.016	0.212 ± 0.016
Na	0.177 ± 0.015	0.183 ± 0.015	0.167 ± 0.014	0.167 ± 0.014	0.158 ± 0.014	0.158 ± 0.014	0.160 ± 0.014
Pt 2685	0.149 ± 0.013	0.155 ± 0.013	0.151 ± 0.013	0.151 ± 0.013	0.152 ± 0.013	0.152 ± 0.013	0.152 ± 0.013
Pt 2687	0.149 ± 0.013	0.155 ± 0.013	0.151 ± 0.013	0.151 ± 0.013	0.152 ± 0.013	0.152 ± 0.013	0.152 ± 0.013
To 0002	0.069 ± 0.009	0.068 ± 0.009	0.115 ± 0.011	0.115 ± 0.011	0.114 ± 0.011	0.112 ± 0.011	0.112 ± 0.011
To 2553	0.068 ± 0.009	0.067 ± 0.008	0.116 ± 0.011	0.116 ± 0.011	0.112 ± 0.011	0.111 ± 0.011	0.111 ± 0.011
Tr 0028	0.011 ± 0.003	0.012 ± 0.003	0.124 ± 0.012	0.124 ± 0.012	0.118 ± 0.012	0.116 ± 0.011	0.116 ± 0.011
Tr 4410	0.112 ± 0.010	0.114 ± 0.010	0.126 ± 0.012	0.126 ± 0.012	0.120 ± 0.012	0.119 ± 0.012	0.119 ± 0.012
Ag 0001	0.112 ± 0.010	0.114 ± 0.010	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.017 ± 0.004	0.018 ± 0.004	0.018 ± 0.004
Ag 0011	0.107 ± 0.010	0.109 ± 0.010	0.016 ± 0.004	0.016 ± 0.004	0.017 ± 0.004	0.018 ± 0.004	0.018 ± 0.004
Am 4375	0.106 ± 0.010	0.108 ± 0.010	0.017 ± 0.004	0.017 ± 0.004	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Am 4534	0.106 ± 0.010	0.108 ± 0.010	0.017 ± 0.004	0.017 ± 0.004	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000

Cm: *Chionis minor*, Ca: *C. alba*, Na: *Numenius americanus*, Pt: *Pedionomus torquatus*, To: *Thinocorus orbignyianus*, Tr: *T. rumicivorus*, Ag: *Attagis gayi*, Am: *A. malouinus*. Para más detalles ver la Tabla 1, página 26.

**Tabla 7.** Matriz de distancias y sus desviaciones típicas según el modelo de dos parámetros de Kimura  $d_k$  (sobre el diagonal) y las proporciones  $p$  (bajo el diagonal) en el gen rRNA 12S.

Taxa	Cm	Ca	Na	Pt 2685	Pt 2687	To 0002	To 2553
Cm	0.008 ± 0.005						
Ca	0.008 ± 0.004	0.008 ± 0.005					
Na	0.151 ± 0.018	0.151 ± 0.018	0.175 ± 0.025				
Pt 2685	0.156 ± 0.019	0.151 ± 0.018	0.175 ± 0.025	0.182 ± 0.025	0.182 ± 0.025	0.150 ± 0.022	0.153 ± 0.022
Pt 2687	0.156 ± 0.019	0.151 ± 0.018	0.175 ± 0.025	0.187 ± 0.026	0.174 ± 0.025	0.157 ± 0.023	0.160 ± 0.023
To 0002	0.133 ± 0.017	0.151 ± 0.018	0.159 ± 0.019	0.000 ± 0.000	0.187 ± 0.026	0.141 ± 0.022	0.145 ± 0.022
To 2553	0.135 ± 0.017	0.151 ± 0.018	0.159 ± 0.019	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.142 ± 0.022	0.145 ± 0.022
Tr 0028	0.141 ± 0.018	0.138 ± 0.018	0.125 ± 0.017	0.125 ± 0.017	0.125 ± 0.017	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.003
Tr 4410	0.143 ± 0.018	0.141 ± 0.018	0.128 ± 0.017	0.128 ± 0.017	0.128 ± 0.017	0.026 ± 0.008	0.029 ± 0.009
Ag 0001	0.159 ± 0.019	0.143 ± 0.018	0.133 ± 0.017	0.125 ± 0.017	0.128 ± 0.017	0.023 ± 0.008	0.026 ± 0.008
Ag 0011	0.159 ± 0.019	0.143 ± 0.018	0.130 ± 0.017	0.138 ± 0.018	0.125 ± 0.017	0.073 ± 0.013	0.076 ± 0.013
Am 4375	0.159 ± 0.019	0.159 ± 0.019	0.143 ± 0.018	0.138 ± 0.018	0.138 ± 0.018	0.073 ± 0.013	0.076 ± 0.013
Am 4534	0.159 ± 0.019	0.159 ± 0.019	0.143 ± 0.018	0.138 ± 0.018	0.138 ± 0.018	0.073 ± 0.013	0.076 ± 0.013
Taxa	Tr 0028	Tr 4410	Ag 0001	Ag 0011	Am 4375	Am 4534	
Cm	0.160 ± 0.023	0.163 ± 0.023	0.184 ± 0.025	0.184 ± 0.025	0.184 ± 0.025	0.184 ± 0.025	0.184 ± 0.025
Ca	0.160 ± 0.023	0.163 ± 0.023	0.184 ± 0.025	0.184 ± 0.025	0.184 ± 0.025	0.184 ± 0.025	0.184 ± 0.025
Na	0.152 ± 0.023	0.148 ± 0.022	0.165 ± 0.024	0.165 ± 0.024	0.165 ± 0.024	0.165 ± 0.024	0.165 ± 0.024
Pt 2685	0.145 ± 0.022	0.142 ± 0.022	0.158 ± 0.023	0.158 ± 0.023	0.158 ± 0.023	0.158 ± 0.023	0.158 ± 0.023
Pt 2687	0.145 ± 0.022	0.142 ± 0.022	0.158 ± 0.023	0.158 ± 0.023	0.158 ± 0.023	0.158 ± 0.023	0.158 ± 0.023
To 0002	0.027 ± 0.009	0.024 ± 0.008	0.078 ± 0.015	0.078 ± 0.015	0.078 ± 0.015	0.078 ± 0.015	0.078 ± 0.015
To 2553	0.029 ± 0.009	0.027 ± 0.009	0.081 ± 0.016	0.081 ± 0.016	0.081 ± 0.016	0.081 ± 0.016	0.081 ± 0.016
Tr 0028	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.003	0.078 ± 0.015	0.078 ± 0.015	0.078 ± 0.015	0.078 ± 0.015	0.078 ± 0.015
Tr 4410	0.073 ± 0.013	0.070 ± 0.013	0.075 ± 0.015	0.075 ± 0.015	0.075 ± 0.015	0.075 ± 0.015	0.075 ± 0.015
Ag 0001	0.073 ± 0.013	0.070 ± 0.013	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Ag 0011	0.073 ± 0.013	0.070 ± 0.013	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Am 4375	0.073 ± 0.013	0.070 ± 0.013	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Am 4534	0.073 ± 0.013	0.070 ± 0.013	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000

Cm: *Chionis minor*, Ca: *C. alba*, Na: *Numenius americanus*, Pt: *Pedionomus torquatus*, To: *Thinocorus orbignyianus*, Tr: *T. rumicivorus*, Ag: *Attagis gayi*, Am: *A. malouinus*. Para más detalles ver la Tabla 1, página 26.

**Tabla 8.** Frecuencia promedio de sustituciones en el gen citocromo *b* según los taxa comparados<sup>a</sup>.

Taxa Comparados	Tipo de Sustitución					
	transiciones			transversiones		
Primera posición del codón	AG	TC	AT	AC	TG	CG
Chionidae - otros ( <i>n</i> = 22)	0.163±0.052	0.494±0.084	0.131±0.040	0.177±0.032	0.030±0.011	0.006±0.012
Scolopacidae - otros ( <i>n</i> = 10)	0.228±0.054	0.515±0.098	0.072±0.045	0.147±0.027	0.038±0.024	0.000±0.000
Pedionomidae - Thinocoridae ( <i>n</i> = 16)	0.170±0.111	0.534±0.173	0.121±0.041	0.109±0.073	0.044±0.003	0.023±0.023
<i>Attagis</i> - <i>Thinocorus</i> ( <i>n</i> = 16)	0.321±0.052	0.501±0.018	0.075±0.026	0.103±0.041	0.000±0.000	0.000±0.000
<i>A. gayi</i> - <i>A. malouinus</i> ( <i>n</i> = 4)	0.600±0.000	0.200±0.000	0.000±0.000	0.200±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
<i>T. orbignyianus</i> - <i>T. rumicivorus</i> ( <i>n</i> = 4)	0.069±0.069	0.931±0.069	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
Subtotal ( <i>n</i> = 76)	0.229±0.145	0.526±0.176	0.090±0.056	0.125±0.069	0.023±0.021	0.006±0.015
Segunda posición del codón						
Chionidae - otros ( <i>n</i> = 22)	0.000±0.000	0.812±0.091	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.152±0.052
Scolopacidae - otros ( <i>n</i> = 10)	0.000±0.000	0.767±0.040	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.213±0.023
Pedionomidae - Thinocoridae ( <i>n</i> = 16)	0.000±0.000	0.950±0.087	0.000±0.000	0.050±0.087	0.000±0.000	0.000±0.000
<i>Attagis</i> - <i>Thinocorus</i> ( <i>n</i> = 16)	0.000±0.000	0.887±0.114	0.000±0.000	0.113±0.114	0.000±0.000	0.000±0.000
<i>A. gayi</i> - <i>A. malouinus</i> ( <i>n</i> = 4)	0.000±0.000	1.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
<i>T. orbignyianus</i> - <i>T. rumicivorus</i> ( <i>n</i> = 4)	0.000±0.000	0.250±0.025	0.000±0.000	0.750±0.250	0.000±0.000	0.000±0.000
Subtotal ( <i>n</i> = 73)	0.000±0.000	0.835±0.189	0.000±0.000	0.086±0.189	0.000±0.000	0.075±0.092

a: La frecuencia se obtiene dividiendo el número de sustituciones específicas por el número total de sustituciones observadas en cada categoría (fila). Se indica el promedio ± la desviación típica.

Continuación de la Tabla 8<sup>a</sup>.

Taxa Comparados	Tipo de Substitución						
	transiciones			transversiones			
	AG	TC	AT	AC	TG	CG	
Tercera posición del codón							
Chionidae - otros ( <i>n</i> = 22)	0.109±0.019	0.439±0.014	0.109±0.026	0.321±0.019	0.003±0.004	0.019±0.009	
Scolopacidae - otros ( <i>n</i> = 10)	0.083±0.014	0.485±0.033	0.107±0.017	0.291±0.032	0.008±0.001	0.026±0.003	
Pedionomidae - Thinocoridae ( <i>n</i> = 16)	0.056±0.009	0.465±0.016	0.144±0.014	0.296±0.016	0.006±0.006	0.033±0.011	
<i>Attagis</i> - <i>Thinocorus</i> ( <i>n</i> = 16)	0.091±0.014	0.576±0.035	0.068±0.003	0.248±0.029	0.000±0.000	0.017±0.006	
<i>A. gayi</i> - <i>A. Malouinus</i> ( <i>n</i> = 4)	0.174±0.008	0.739±0.011	0.000±0.000	0.087±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	
<i>T. orbignyianus</i> - <i>T. rumicivorus</i> ( <i>n</i> = 4)	0.029±0.011	0.806±0.006	0.058±0.002	0.078±0.002	0.000±0.000	0.029±0.009	
Subtotal ( <i>n</i> = 76)	0.095±0.066	0.530±0.130	0.094±0.044	0.256±0.090	0.003±0.005	0.021±0.012	
Todas las posiciones del codón							
Chionidae - otros ( <i>n</i> = 22)	0.114±0.021	0.464±0.018	0.109±0.020	0.283±0.016	0.008±0.005	0.022±0.085	
Scolopacidae - otros ( <i>n</i> = 10)	0.105±0.022	0.506±0.043	0.095±0.014	0.248±0.027	0.014±0.005	0.032±0.002	
Pedionomidae - Thinocoridae ( <i>n</i> = 16)	0.073±0.023	0.493±0.037	0.135±0.011	0.257±0.021	0.012±0.005	0.030±0.006	
<i>Attagis</i> - <i>Thinocorus</i> ( <i>n</i> = 16)	0.129±0.006	0.574±0.030	0.067±0.003	0.217±0.033	0.000±0.000	0.013±0.005	
<i>A. gayi</i> - <i>A. Malouinus</i> ( <i>n</i> = 4)	0.286±0.008	0.600±0.011	0.000±0.000	0.114±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	
<i>T. orbignyianus</i> - <i>T. rumicivorus</i> ( <i>n</i> = 4)	0.037±0.023	0.821±0.016	0.045±0.001	0.075±0.001	0.000±0.000	0.022±0.007	
Total ( <i>n</i> = 77)	0.116±0.076	0.546±0.127	0.088±0.042	0.223±0.079	0.007±0.007	0.021±0.011	

a: La frecuencia se obtiene dividiendo el número de sustituciones específicas por el número total de sustituciones observadas en cada categoría (fila). Se indica el promedio ± la desviación típica.

**Tabla 9.** Frecuencia promedio de sustituciones en el gen rRNA 12S según los taxa comparados<sup>a</sup>.

Taxa Comparados	Tipo de Substitución					
	transiciones			transversiones		
	AG	TC	AT	AC	TG	CG
Chionidae - otros ( $n = 22$ )	0.320±0.037	0.465±0.034	0.098±0.013	0.068±0.016	0.028±0.009	0.022±0.013
Scolopacidae - otros ( $n = 10$ )	0.373±0.016	0.497±0.027	0.045±0.009	0.052±0.008	0.026±0.009	0.007±0.009
Pedionomidae - Thinocoridae ( $n = 16$ )	0.402±0.008	0.462±0.029	0.064±0.011	0.063±0.034	0.009±0.010	0.000±0.000
<i>Attagis</i> - <i>Thinocorus</i> ( $n = 16$ )	0.312±0.024	0.545±0.021	0.036±0.001	0.036±0.001	0.036±0.001	0.036±0.001
<i>T. orbignyianus</i> - <i>T. rumicivorus</i> ( $n = 4$ )	0.349±0.051	0.651±0.051	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
Total ( $n = 77$ )	0.351±0.099	0.499±0.103	0.060±0.032	0.051±0.027	0.023±0.014	0.016±0.016

a: La frecuencia se obtiene dividiendo el número de sustituciones específicas por el número total de sustituciones observadas en cada categoría (fila). Se indica el promedio ± la desviación típica. No se consideraron los intervalos en este análisis.

### c) Efectos de Saturación y Tasas de Substituciones

En el gen citocromo *b*, el gráfico de correlación —comparaciones entre todas las especies del número de ts/st y tv/st— muestra una curva con una gran pendiente inicial que se acerca asintóticamente a un *plateau* en las 0.09 ts/st, aproximadamente (Figura 10). Esto refleja un efecto de saturación en el gen citocromo *b*, es decir, que al aumentar el número de transversiones, se incrementan las transiciones sobrepuestas en los mismos sitios.

Sin embargo, en una fase inicial de la curva de saturación del gen citocromo *b*, los puntos siguen una relación más bien lineal con una fuerte pendiente ( $5.72 \pm 0.41$  ts/tv; ver la Figura 10). Esta fase lineal se extiende hasta las comparaciones de *Thinocorus orbignyianus* con *T. rumicivorus* ( $p \leq 0.064$  sub/st; ver recuadro sombreado en la Tabla 6, página 56), lo que sugiere una ausencia de efecto de saturación a bajos niveles de divergencia entre las secuencias. Esta situación no ocurre en el gen rRNA 12S, encontrándose, en general, una relación más bien lineal entre este tipo de substituciones para todas las comparaciones entre las secuencias (Figura 11).

Al contrario de lo que sucede en el gen citocromo *b*, el gráfico de saturación del gen rRNA 12S presenta una curva con una pendiente pronunciada —considerando todas las comparaciones entre las secuencias excepto el grupo externo Chionidae ( $5.30 \pm 0.32$  ts/tv)—, no siendo esta pendiente significativamente diferente de la pendiente en la fase inicial de la curva de saturación del gen citocromo *b* ( $F_{[1,65]} = 0.02$ ,  $P = 0.89$ ). De esta manera, la pendiente pronun-

ciada de la curva de saturación en el gen rRNA 12S da cuenta de una alta razón  $ts/tv$  y una ausencia importante de un efecto de saturación en este gen.

Para apreciar el efecto de saturación en el gen citocromo *b*, cabe considerar las comparaciones de *Thinocoridae* con *Pedionomidae*. El grupo de puntos de estas comparaciones en el gen citocromo *b* aparece totalmente alejado de la recta en la fase inicial de la curva (ver Figura 10). Sin embargo, en el gen rRNA 12S, este grupo de puntos se encuentra cercano a la recta de regresión e incluso desviados hacia la izquierda (ver la Figura 11).

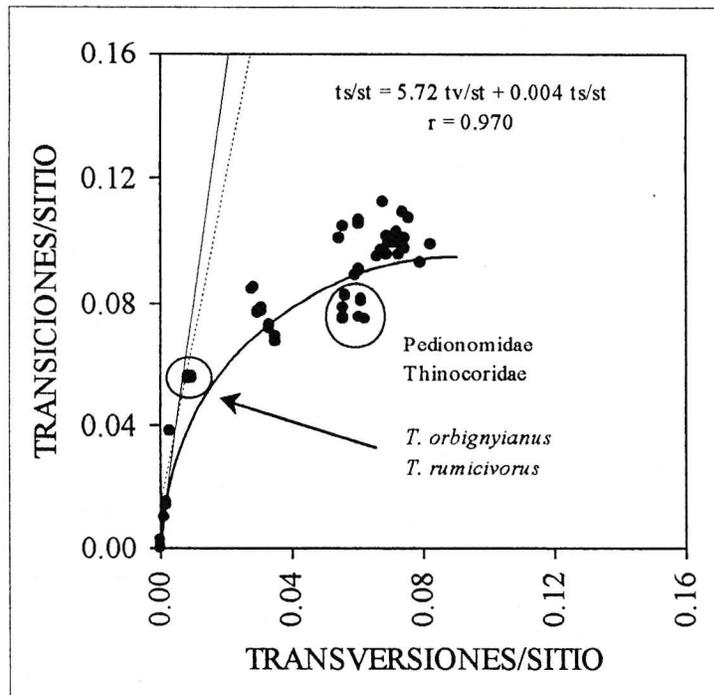
En relación con las tasas de transiciones y transversiones, éstas difieren notablemente en el rRNA 12S respecto de la divergencia  $p$  —número de sitios variables sobre el número total de sitios considerados no incluyendo los intervalos— cuando se comparan todas las secuencias (Figura 12). La razón entre estas dos tasas es cercana a 4.9, cuando se comparan las pendientes de las dos rectas (0.83 y 0.17).

En el caso del gen citocromo *b*, la razón entre estos dos tipos de sustituciones es menor (1.5), mostrando números de transiciones y transversiones más similares a altos grados de divergencia (Figura 13). Sin embargo, al interpolar las pendientes de cada tipo de sustitución, nuevamente considerando sólo los primeros puntos del gráfico de correlación en el gen citocromo *b*, se encuentra que, a una divergencia no mayor que 0.064 sub/st, las pendientes de los dos tipos de sustituciones, tanto en el gen citocromo *b* como en el gen rRNA 12S, no son significativamente diferentes (para transiciones y transver-

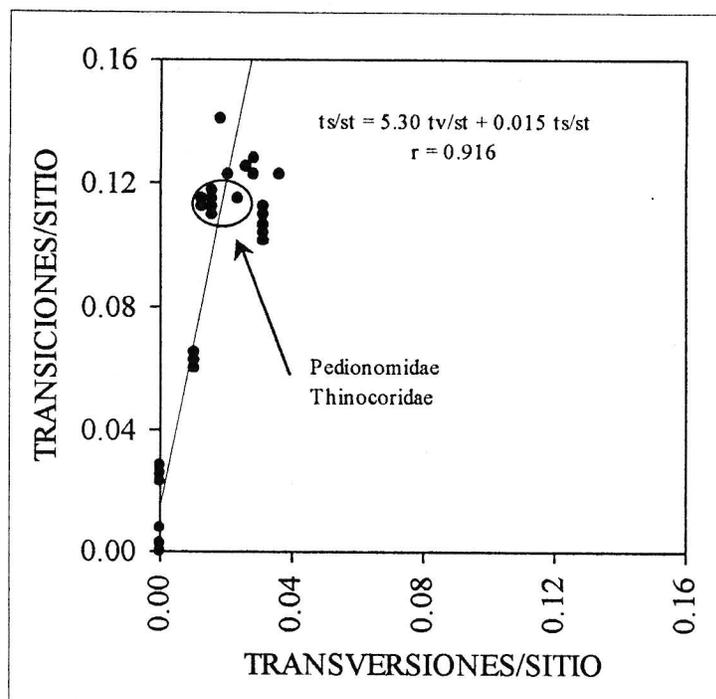
siones  $F_{[1.88]} = 0.51$ ,  $P = 0.48$ ; ver la Figura 13).

Considerando ambos tipos de sustituciones en el gen citocromo *b*, en relación con las posiciones del codón, se observa una mayor tasa de cambio en la tercera posición ( $p = 0.78$  sub/st; Figura 14). La siguiente posición más variable corresponde a la primera posición ( $p = 0.18$  sub/st), siendo la segunda posición la más conservada en relación con la divergencia de las secuencias ( $p = 0.04$  sub/st; Figura 14).

En relación con los cambios en aminoácidos en las secuencias del citocromo *b*, se observa que el número de sustituciones sinónimas, es decir, cambios en la secuencia nucleotídica que no provocan cambios en la secuencia aminoacídica, son considerablemente mayor, aproximadamente 13 veces más (Figura 15).

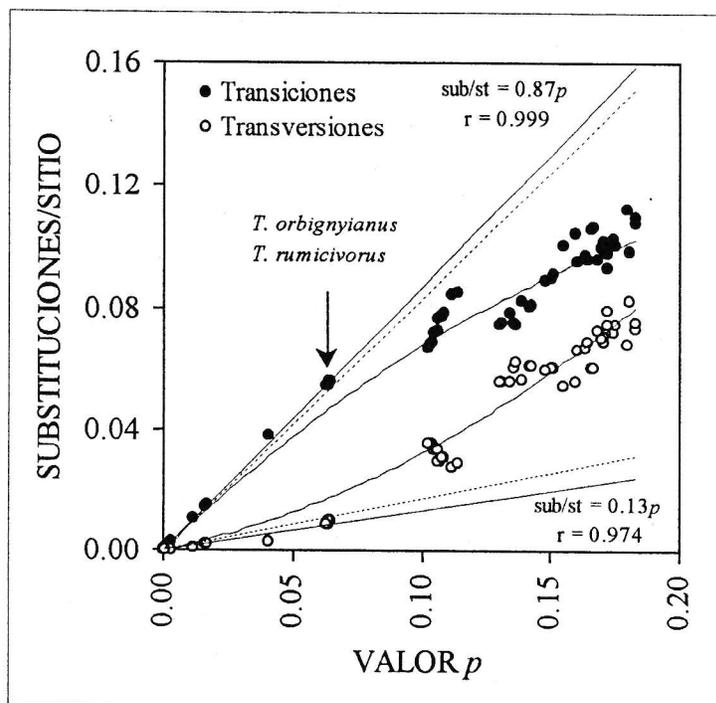


**Figura 10.** Curva de saturación en el gen citocromo *b*. La curva pierde su linealidad cuando se compara a *T. orbignyianus* con *T. rumicivorus* (0.05 ts/st; 0.009 tv/st) a una distancia  $p = 0.064$  sub/st, aproximadamente (ver los recuadros sombreados en la Tabla 6, página 56). La línea punteada representa la curva de regresión obtenida en el gen rRNA 12S (ver la Figura 11).

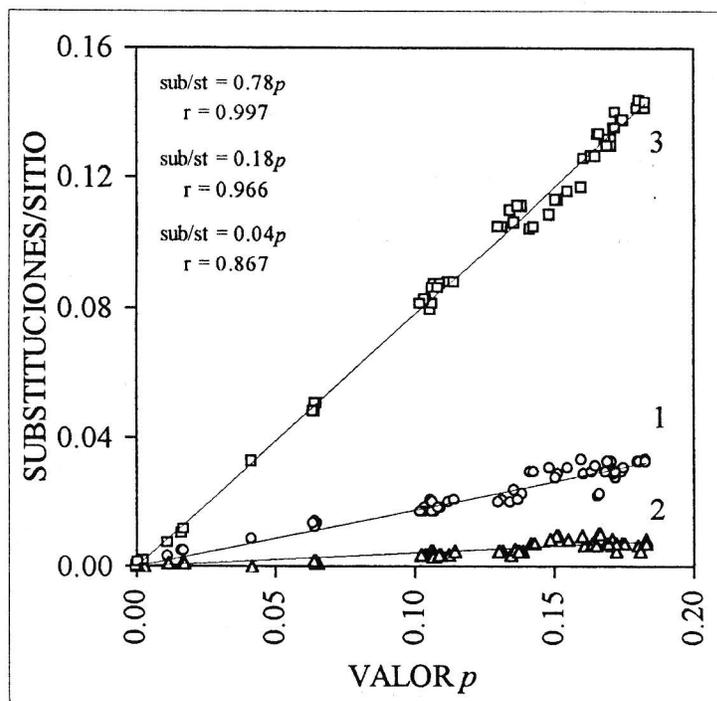


**Figura 11.** Curva de saturación en el gen rRNA 12S. La curva es más bien lineal, sin presentar un *plateau* producto de un efecto de saturación como en el gen citocromo *b*. No se consideraron los caracteres con deleciones o inserciones.

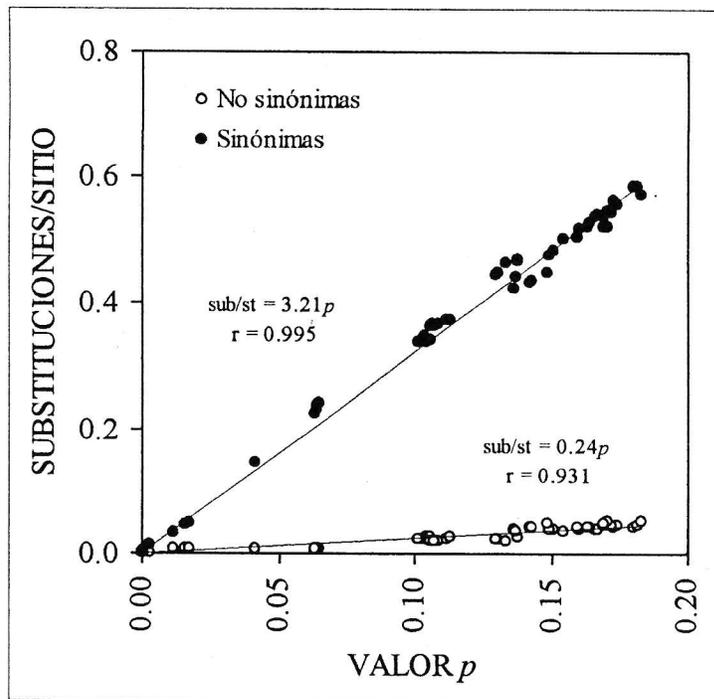




**Figura 13.** Tasa de transiciones y transversiones en el gen citocromo *b* en función de la divergencia  $p$ . La diferencias entre las tasas de estos dos tipos de sustituciones son menores en comparación con las encontradas en el gen rRNA 12S a altos niveles de divergencia  $p$ . Las líneas de regresión han considerado sólo los valores de  $p \leq 0.064$ . Las líneas punteadas representan al gen rRNA 12S (ver la Figura 11).



**Figura 14.** Substituciones totales en cada posición del codón del gen citocromo *b*. La tercera posición del codón denota una mayor tasa de cambio y acumula más substituciones al aumentar la divergencia entre las especies comparada con las otras dos posiciones.



**Figura 15.** Substituciones sinónimas y no sinónimas en el gen citocromo *b* en función de la divergencia  $p$ . La mayoría de los cambios al nivel de secuencia nucleotídica no provocan cambios en la composición aminoacídica del citocromo *b*.

#### d) Relaciones Filogenéticas

Considerando todos los taxa, el gen citocromo *b* presentó 286 (27.4%) sitios informativos bajo el criterio de parsimonia (APÉNDICE A, página 140). Con las secuencias del gen citocromo *b* y el criterio de parsimonia máxima, se obtuvo un árbol más parsimonioso de 526 pasos usando a Chionidae como grupo externo (Figura 16a). Con cada uno de los restantes análisis, parsimonia de transversiones, parsimonia ponderada 5/1 y 10/1, se obtuvo un árbol más parsimonioso de 178, 1,238 y 2,128 pasos, respectivamente; y en general, el conjunto de datos está más estructurado que si estuviera generado por simple azar [ $g_1 \leq -1.41$  ( $P < 0.001$ ); Figura 16a-d].

En las topologías generadas aparecen ambas especies de *Thinocorus* y *Attagis* recíprocamente como taxa hermanos, por lo tanto, ambos géneros son monofiléticos. Entre los grupos externos, *Pedionomus torquatus* es el grupo hermano de Thinocoridae y *Numenius americanus* se encuentra en una posición filogenética intermedia entre Chionidae y Pedionomidae (Figura 16). La misma topología fue reconstruida filogenéticamente a través del modelo de probabilidad máxima y el método de Neighbor-Joining (Figura 16e,f).

Bajo el criterio de parsimonia, los valores de "bootstrap" dentro del grupo interno son, en general, máximos (100), indicando una alta resolución de los nodos que conducen a los linajes *Attagis* y *Thinocorus*. El nodo que sostiene la monofilia de Thinocoridae presenta un rango de "bootstrap" de 81-92, probablemente un número menor de sitios define la rama basal de Thinocoridae. Por

otro lado, el nodo que sostiene la relación de hermandad entre Pedionomidae y Thinocoridae posee un rango de "bootstrap" de 64-86, observándose el valor más alto con parsimonia máxima (Figura 16a) y los valores intermedios con parsimonia ponderada 5/1 y 10/1 (Figura 16c,d). El valor de "bootstrap" más bajo se obtuvo con parsimonia de transversiones, indicando que las transiciones entre las secuencias del citocromo *b* definen en forma importante el nodo que une a Thinocoridae con su grupo hermano Pedionomidae (Figura 16b). Los valores de "bootstrap" en los árboles filogenéticos estimados por el modelo de probabilidad máxima y el método de Neighbor-Joining son casi en su totalidad máximos (100; Figura 16e,f), salvo el del nodo que agrupa a Pedionomidae junto con Thinocoridae (86; Figura 16e).

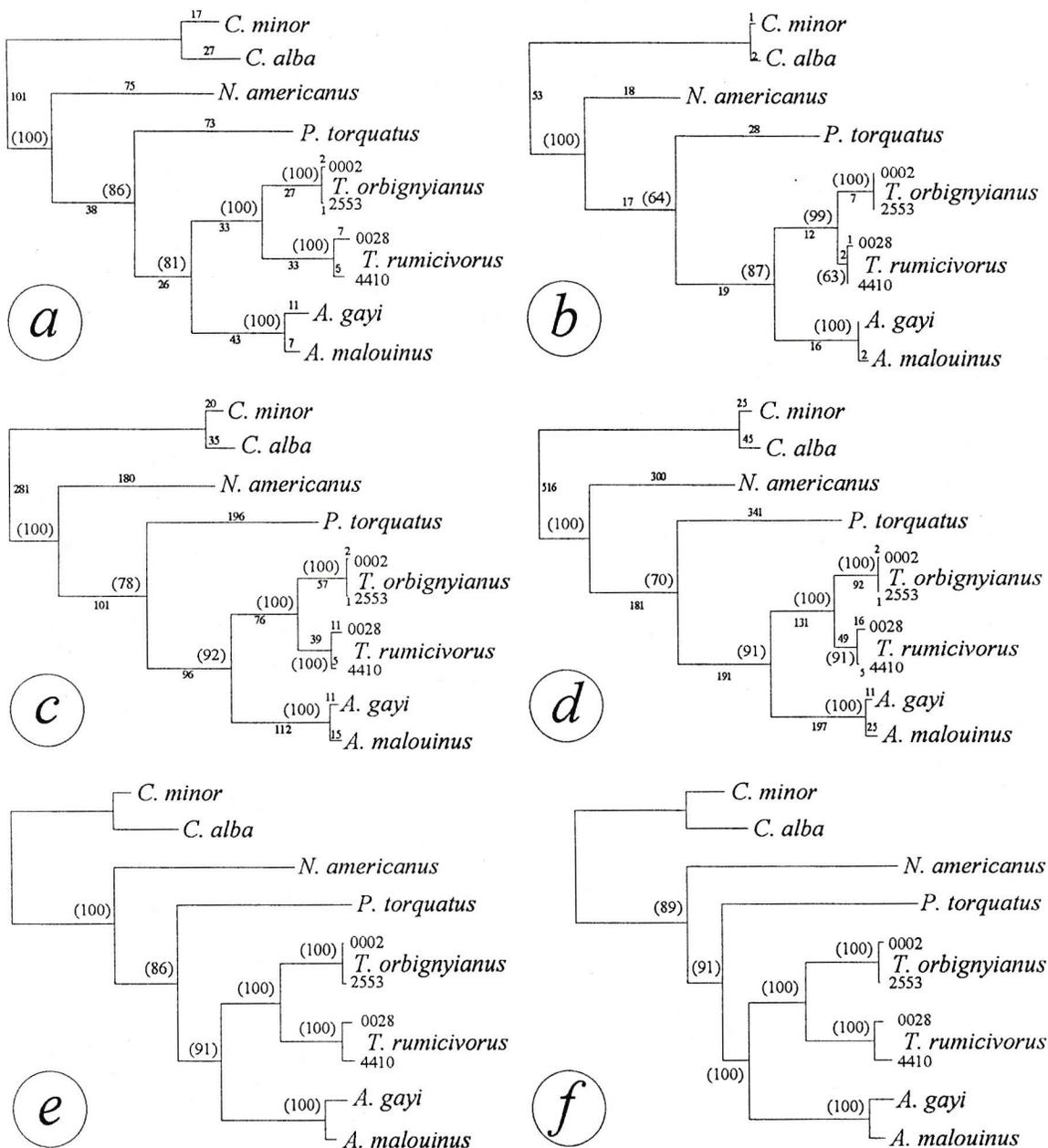
Considerando todos los taxa, las secuencias del gen rRNA 12S presentaron 89 sitios informativos de acuerdo al criterio de parsimonia sin incluir los intervalos (23.2% de un total de 384 sitios, ver el APÉNDICE B, página 148). El análisis de parsimonia máxima entregó solamente un árbol más parsimonioso de 193 pasos (Figura 17a) mientras que en el análisis de parsimonia de transversiones se obtuvieron 4 árboles igualmente parsimoniosos de 57 pasos (ver árbol de consenso estricto, Figura 17b). Esto muestra que la mayor parte de las substituciones que están definiendo cada nodo en el árbol obtenido con parsimonia máxima corresponde a transiciones. Se consiguió un árbol más parsimonioso, con una topología idéntica a la obtenida con parsimonia máxima, a través de parsimonia ponderada 5/1 y 10/1, de 273 y 408 pasos, respectiva-

mente (ver Figura 17c,d). Con el modelo de probabilidad máxima y el método de Neighbor-Joining se obtuvo la misma topología que el análisis con parsimonia (Figura 17e,f).

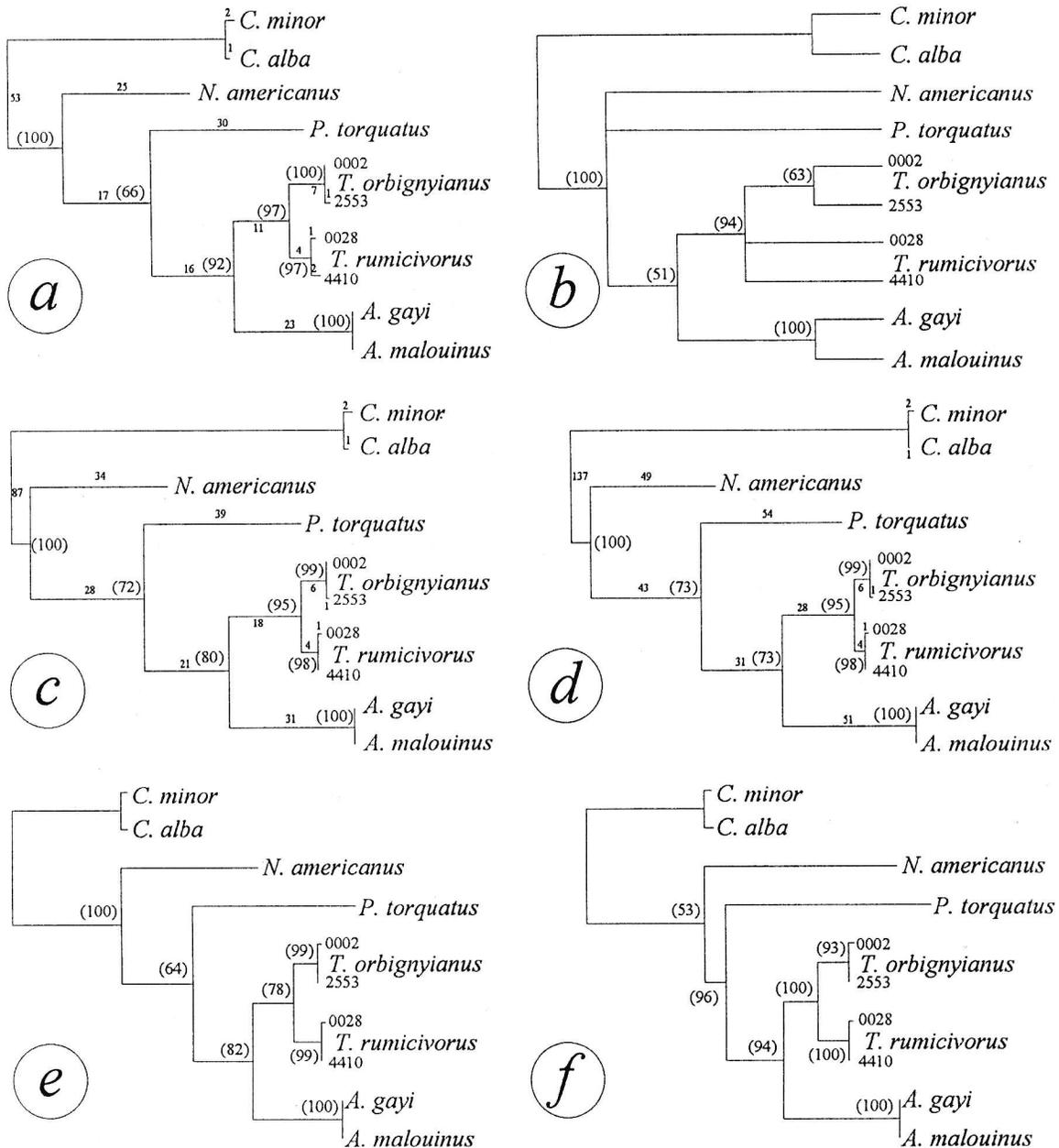
Con parsimonia máxima, los valores de "bootstrap" muestran un soporte sólido para la monofilia de *Thinocorus* y de *Attagis*, 97 y 100, respectivamente (Figura 17a). La monofilia de Thinocoridae se sostiene con un valor de "bootstrap" más alto (92) que el obtenido a partir de las secuencias del gen citocromo *b* (81), debido probablemente a un efecto de saturación en el gen citocromo *b*. La relación de Pedionomidae y Thinocoridae se sostiene con un valor de "bootstrap" de sólo 66 (Figura 17a). Finalmente, los valores de "bootstrap" con el modelo de probabilidad máxima y el método de Neighbor-Joining son, en general, menores que los obtenidos con las secuencias del gen citocromo *b* (Figura 17e,f).

Al utilizar las secuencias de los genes citocromo *b* y rRNA 12S concatenadas, se obtuvo solo un árbol más parsimonioso de 719 pasos en el análisis de parsimonia máxima (Figura 18a). La topología generada con parsimonia ponderada —5/1 y 10/1—, probabilidad máxima y el método de Neighbor-Joining, es la misma que se obtuvo considerando aisladamente las secuencias de los genes citocromo *b* y rRNA 12S (Figura 18). Además, al considerar la matriz completa de caracteres —1,452— se observan, en general, valores de "bootstrap" mayores que los conseguidos con los análisis de las secuencias de los dos genes por separado, ponderándose así los dos conjuntos de caracteres

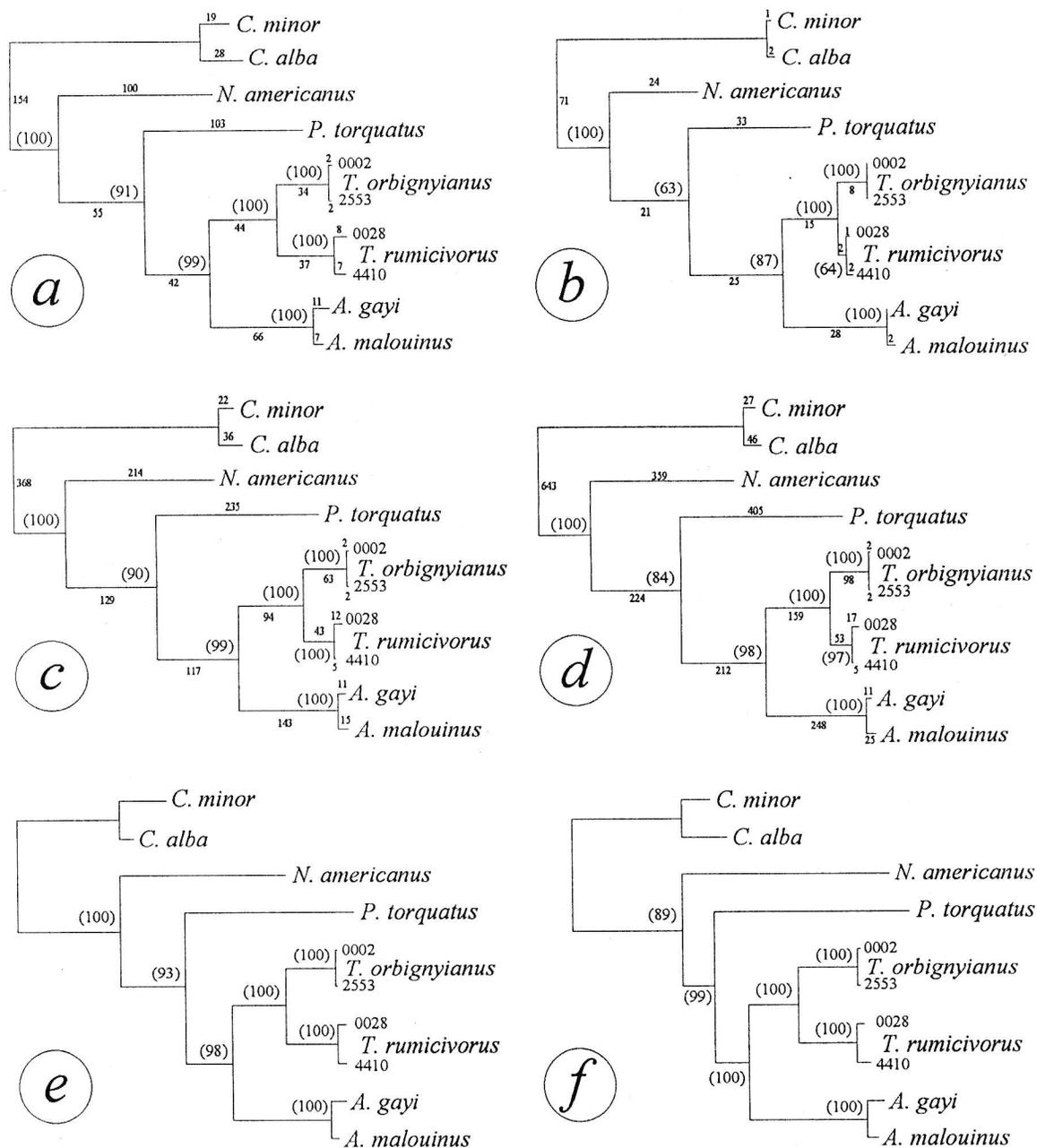
sobre todo en la parte basal del árbol (Figura 16, 17 y 18).



**Figura 16.** Relaciones filogenéticas de Thinocoridae basadas en las secuencias del gen citocromo *b*. *a*, parsimonia máxima (un árbol más parsimonioso [UAMP], largo del árbol [L] = 526 pasos, índice de consistencia [IC] = 0.722, índice de retención [IR] = 0.738,  $g_1 = -1.41$  [ $P < 0.001$ ]). *b*, parsimonia de transversiones (UAMP, L = 178, IC = 0.719, IR = 0.777,  $g_1 = -1.52$  [ $P < 0.001$ ]). *c*, parsimonia ponderada 5/1 (UAMP, L = 1,238, razón de f = 0.129,  $g_1 = -1.51$  [ $P < 0.001$ ]). *d*, parsimonia ponderada 10/1 (UAMP, L = 2,128, razón de f = 0.144,  $g_1 = -1.51$  [ $P < 0.001$ ]). *e*, probabilidad máxima (LnL<sub>0</sub> = -3,902.48 de 218 árboles examinados). *f*, árbol de "neighbor-joining" usando el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Los valores de "bootstrap" para cada uno de los nodos se indican entre paréntesis. En los análisis de parsimonia se indica también el largo de cada rama en función de números de pasos.



**Figura 17.** Relaciones filogenéticas de Thinochoridae basadas en las secuencias del gen rRNA 12S. *a*, parsimonia máxima (un árbol más parsimonioso [UAMP], largo del árbol [L] = 193 pasos, índice de consistencia [IC] = 0.760, índice de retención [IR] = 0.799,  $g_1 = -1.47$  [ $P < 0.001$ ]). *b*, árbol de consenso estricto utilizando parsimonia de transversiones (4 árboles retenidos, L = 57, IC de Rohlf = 0.500,  $g_1 = -1.27$  [ $P < 0.001$ ]). *c*, parsimonia ponderada 5/1 (UAMP, L = 273, razón de f = 0.050,  $g_1 = -1.73$  [ $P < 0.001$ ]). *d*, parsimonia ponderada 10/1 (UAMP, L = 408, razón de f = 0.015,  $g_1 = -1.79$  [ $P < 0.001$ ]). *e*, probabilidad máxima ( $\ln L_0 = -1,290.17$  de 218 árboles examinados). *f*, árbol de Neighbor-Joining usando el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Los valores de "bootstrap" para cada uno de los nodos se indican entre paréntesis. En los análisis de parsimonia se indica también el largo de cada rama en función de números de pasos.



**Figura 18.** Relaciones filogenéticas de Thinocoridae basadas en las secuencias de los genes rRNA 12S y citocromo *b*. *a*, parsimonia máxima (un árbol más parsimonioso [UAMP], largo del árbol [L] = 719 pasos, índice de consistencia [IC] = 0.732, índice de retención [IR] = 0.756,  $g_1 = -1.45$  [ $P < 0.001$ ]). *b*, parsimonia de transversiones (UAMP, L = 235, IC = 0.742, IR = 0.798,  $g_1 = -1.48$  [ $P < 0.001$ ]). *c*, parsimonia ponderada 5/1 (UAMP, L = 1,511, razón de f = 0.116,  $g_1 = -1.57$  [ $P < 0.001$ ]). *d*, parsimonia ponderada 10/1 (UAMP, L = 2,536, razón de f = 0.107,  $g_1 = -1.58$  [ $P < 0.001$ ]). *e*, probabilidad máxima ( $\ln L_0 = -5,229.00$  de 218 árboles examinados). *f*, árbol de Neighbor-Joining usando el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Los valores de "bootstrap" para cada uno de los nodos se indican entre paréntesis. En los análisis de parsimonia se indica también el largo de cada rama en función de números de pasos.

### e) Constancia en Tasas de Evolución Molecular y Calibración del Reloj Molecular

La prueba de largos de ramas (ver MATERIALES Y MÉTODO, sección d) Calibración del Reloj Molecular, página 36), rechazó la hipótesis de homogeneidad en el gen rRNA 12S, considerando las transiciones y transversiones en el modelo de dos parámetros de Kimura. Específicamente, *Numenius americanus* presentó una tasa de evolución molecular significativamente mayor que la tasa promedio de Struthioniformes (ratites) y Charadriiformes utilizando la secuencia de *Alligator mississippiensis* como grupo externo ( $Z = 2.12$ ,  $P < 0.05$ ; ver la Tabla 10). Sin embargo, al no considerar la secuencia de *N. americanus*, la prueba de largos de ramas no rechazó la hipótesis de homogeneidad en el gen rRNA 12S (Tabla 11). La misma situación no ocurre con la prueba de dos grupos, en donde no se rechaza la hipótesis de homogeneidad en las tasas de evolución molecular de Charadriiformes y Struthioniformes, con y sin *N. americanus* ( $P > 0.05$ ; solo se presentan los resultados de esta prueba sin considerar a *N. americanus*, ver la Tabla 12).

Después de corroborar la homogeneidad de las tasas de evolución para cada especie, es posible construir un árbol ultramétrico sin los taxa que presenten una tasa de evolución molecular significativamente diferente de la tasa promedio (*N. americanus*), y en donde los nodos hipotéticamente explicados por el mismo evento geológico se presentan a una misma distancia de los nodos terminales, es decir, en el mismo punto de una escala temporal (señalado en la Figura 19).

Por lo tanto, las distancias genéticas medidas en el gen rRNA 12S proporcionan, en general, una medida de divergencia constante en cuanto a la tasa de cambio o mutación molecular de Struthioniformes y Charadriiformes, sin presentar problemas mayores de saturación como en el caso del citocromo *b*. Si se adiciona a esta propiedad del gen rRNA 12S una referencia temporal independiente, como el rompimiento de un megacontinente, es posible calibrar un reloj molecular que permita estimar el tiempo de divergencia en unidades de tiempo absoluto de los nodos de un fenograma construido a partir de tales medidas de divergencia.

La altura del nodo común (nodo 18 en la Figura 19) para las ratites australianas, *Dromaius novaehollandiae* (emú) y *Casuarius casuarius* (casuario), y suramericanas, *Rhea americana* (suri) y *Pterocnemia pennata* (ñandú), es de  $0.0464 \pm 0.0083$  sub/st (recuadro superior en la Tabla 12). Considerando el tiempo de separación de Australia del resto del megacontinente datado en 38 ma (Kennett, 1980; Harwood, 1991) y la altura del nodo común de Thinocoridae y Pedionomidae ( $0.0470 \pm 0.0086$  sub/st, recuadro inferior en la Tabla 12), se estima una antigüedad de 39.5 ma para la separación de estas dos familias. Dada la homogeneidad en tasas de evolución molecular entre Struthioniformes y Charadriiformes, es válido utilizar esta calibración externa para estimar el tiempo de separación entre Pedionomidae y Thinocoridae.

Finalmente, con esta estimación temporal se calibraron los nodos internos de Thinocoridae considerando las transversiones y transiciones en los ge-

nes rRNA 12S y citocromo *b* y usando a Chionidae como grupo externo.

**Tabla 10.** Prueba de largos de ramas con las secuencias del gen rRNA 12S de carádridos y las cuatro especies de ratites.

Taxa	$\delta^a$	$s_\delta$	$Z^b$
<i>Chionis minor</i>	0.0162	0.0140	1.15
<i>Chionis alba</i>	0.0133	0.0137	0.97
<i>Numenius americanus</i>	0.0341	0.0160	2.12*
<i>Pedionomus torquatus</i>	0.0141	0.0132	1.07
<i>Thinocorus orbignyianus</i> (0002)	0.0040	0.0095	0.42
<i>Thinocorus orbignyianus</i> (2553)	0.0069	0.0099	0.70
<i>Thinocorus rumicivorus</i> (4410)	0.0020	0.0089	0.23
<i>Thinocorus rumicivorus</i> (0028)	0.0014	0.0088	0.16
<i>Attagis gayi</i>	0.0093	0.0101	0.92
<i>Attagis malouinus</i>	0.0093	0.0101	0.92
<i>Casuarius casuarius</i>	0.0290	0.0188	1.55
<i>Dromaius novaehollandiae</i>	0.0203	0.0194	1.04
<i>Rhea americana</i>	0.0325	0.0176	1.84
<i>Pterocpnesia pennata</i>	0.0288	0.0188	1.53
Distancia promedia desde la raíz	0.0829		

a: diferencia entre la distancia promedia y la distancia del nodo terminal correspondiente.  
 b: estadístico calculado según la ecuación (3), página 37. \*: significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 11.** Prueba de largos de ramas después de eliminar la secuencia de *Numenius americanus*.

Taxa	$\delta^a$	$s_\delta$	Z
<i>Chionis minor</i>	0.0197	0.0144	1.37
<i>Chionis alba</i>	0.0169	0.0141	1.20
<i>Pedionomus torquatus</i>	0.0158	0.0137	1.15
<i>Thinocorus orbignyianus</i> (0002)	0.0075	0.0099	0.75
<i>Thinocorus orbignyianus</i> (2553)	0.0103	0.0102	1.01
<i>Thinocorus rumicivorus</i> (4410)	0.0053	0.0092	0.57
<i>Thinocorus rumicivorus</i> (0028)	0.0043	0.0091	0.47
<i>Attagis gayi</i>	0.0106	0.0105	1.01
<i>Attagis malouinus</i>	0.0106	0.0105	1.01
<i>Casuarius casuarius</i>	0.0274	0.0186	1.47
<i>Dromaius novaehollandiae</i>	0.0175	0.0193	0.91
<i>Rhea americana</i>	0.0299	0.0173	1.73
<i>Pterocnemia pennata</i>	0.0263	0.0184	1.43
Distancia promedio desde la raíz	0.0798		

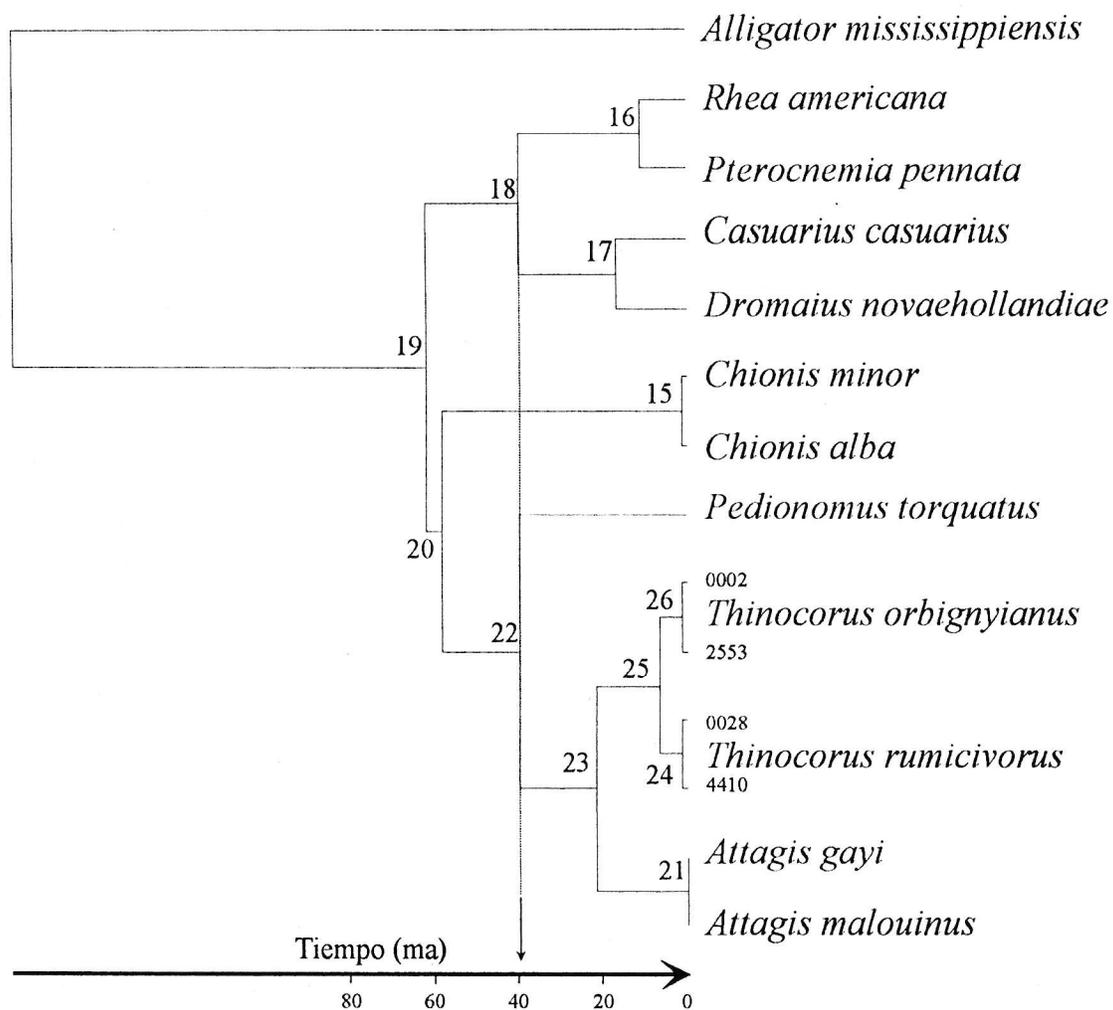
a: diferencia entre la distancia promedio y la distancia del nodo terminal correspondiente.

**Tabla 12.** Prueba de dos grupos con las secuencias del gen rRNA 12S de caráridos y las cuatro especies de ratites.

Nodo <sup>a</sup>	Grupos <sup>a</sup>	$b_A$	$b_B$	$\delta$	$s_{\delta}$	Z	$h^b$	$s_h$
15	<i>C. minor</i> > <i>C. alba</i>	0.0029	0.0001	0.0028	0.0028	1.00	0.0015	0.0015
16	<i>R. americana</i> < <i>P. pennata</i>	0.0107	0.0142	0.0036	0.0067	0.53	0.0125	0.0045
17	<i>C. casuarius</i> < <i>D. novaehollandiae</i>	0.0140	0.0239	0.0098	0.0090	1.09	0.0189	0.0056
18	nodo 17 > nodo 16	0.0492	0.0436	0.0056	0.0133	0.42	0.0464	0.0083
19	nodo 18 < nodo 20	0.0545	0.0910	0.0365	0.0241	1.51	0.0728	0.0092
20	nodo 15 > nodo 22	0.0713	0.0621	0.0091	0.0167	0.55	0.0667	0.0102
21	<i>A. gayi</i> > <i>A. malouinus</i>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
22	nodo 23 < <i>P. torquatus</i>	0.0432	0.0508	0.0077	0.0141	0.54	0.0470	0.0086
23	nodo25 < nodo 21	0.0226	0.0265	0.0038	0.0068	0.56	0.0245	0.0060
24	<i>T. rumicivorus</i> (4410) > <i>T. rumicivorus</i> (0028)	0.0020	0.0010	0.0010	0.0010	1.00	0.0015	0.0015
25	nodo 26 > nodo 24	0.0098	0.0057	0.0041	0.0039	1.06	0.0077	0.0033
26	<i>T. orbignyianus</i> (2553) > <i>T. orbignyianus</i> (0002)	0.0030	0.0001	0.0029	0.0029	1.00	0.0015	0.0015

a: Los números de los nodos corresponden a aquellos de la Figura 19.

b: Altura del nodo en el árbol linearizado. Se señala la altura para el nodo 18 y 22 (ver texto).



**Figura 19.** Árbol ultramétrico confeccionado a partir de las secuencias del gen rRNA 12S. Las distancias genéticas fueron calculadas de acuerdo al modelo de dos parámetros de Kimura utilizando transiciones y transversiones. Los números corresponden a aquellos de la Tabla 12.

**f) Estimación Temporal de los Nodos Internos de Thinocoridae**

En el gen rRNA 12S, ninguno de los métodos rechazó la homogeneidad en las tasas de evolución molecular de los taxa que conforman Thinocoridae considerando sólo las transversiones y a las dos especies de Chionidae como grupo externo ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, al considerar tanto las transversiones como las transiciones, en el gen rRNA 12S, el método de largos de ramas rechazó la homogeneidad en las tasas de evolución molecular. Específicamente, *Thinocorus orbignyianus* (individuo 0002) presentó una distancia desde la raíz menor de la esperada ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, el método de dos grupos no rechazó la homogeneidad de las tasas de evolución molecular como la prueba de largos de ramas ( $P < 0.05$ ). Después de haber eliminado la secuencia To 0002, ninguno de los dos métodos rechazó la homogeneidad en las tasas de evolución molecular considerando solo las transversiones así como las transversiones y transiciones conjuntamente. Posteriormente, se confeccionó el árbol ultramétrico correspondiente y se estimó la altura de cada nodo interno (ver la Tabla 13 ).

En relación con las secuencias del gen citocromo *b*, se evaluó el grado de homogeneidad de tasas de evolución entre las diferentes especies utilizando primero sólo las transversiones y luego las transversiones y las transiciones conjuntamente. Al considerar sólo las transversiones, la homogeneidad en las tasas de evolución no fue rechazada por ninguno de los dos grupos ( $P < 0.01$ ). De la misma forma considerando tanto las transversiones así como las transi-

ciones, ninguno de los dos métodos rechazó la homogeneidad en las tasas de evolución ( $P < 0.05$ ).

Al considerar las transiciones y las transversiones en las secuencias del gen rRNA 12S, y sobre la base de 39.5 ma de antigüedad del nodo Thinocoridae y Pedionomidae (nodo dos), el método de dos grupos estima un tiempo de separación entre *Attagis* y *Thinocorus* de  $20.8 \pm 3.8$  ma (nodo tres), y de  $7.1 \pm 2.2$  ma para la separación de las dos especies de *Thinocorus* (nodo cuatro, Tabla 13 y Figura 20a).

Con las secuencias del gen citocromo *b*, el método de dos grupos estima valores similares en cuanto a tiempos de separación entre los diferentes clados al interior de Thinocoridae (ver la Tabla 13). Sin embargo, esto ocurre cuando se consideran sólo las transversiones en el análisis. Este tipo de sustituciones probablemente no está tan saturado como es el caso de las transiciones el gen citocromo *b*. Cuando se consideran las transiciones en conjunto con las transversiones, el método de dos grupos estima un tiempo mayor de separación de *Attagis* y *Thinocorus*,  $31.0 \pm 2.7$  ma (nodo tres, Tabla 13 y Figura 20b). La razón radica probablemente en la subestimación de unidades de divergencia a nivel del nodo dos (Pedionomidae-Thinocoridae), dado que las transiciones sobrepuestas en los mismos sitios no están aportando a la magnitud de la divergencia entre estos clados (efecto de saturación). Como está señalado en la sección c) Efectos de Saturación y Tasas de Substituciones (página 61, ver también la Figura 10, página 64), la linealidad en cuanto a la acumula-

ción de sustituciones se pierde después de un nivel de divergencia presentado por el nodo que conduce a las dos especies de *Thinocorus*: *T. orbignyianus* y *T. rumicivorus* ( $p = 0.064$  sub/st). Por esta razón, se calibró un reloj molecular para el gen citocromo *b* con el tiempo de divergencia de estas dos especies, estimado en  $7.1 \pm 2.2$  ma por el reloj encontrado en el gen rRNA 12S (ver la parte superior de la Tabla 13). De esta manera, pudo estimarse el tiempo de divergencia de nodos más recientes (ver la parte inferior de la Tabla 13).

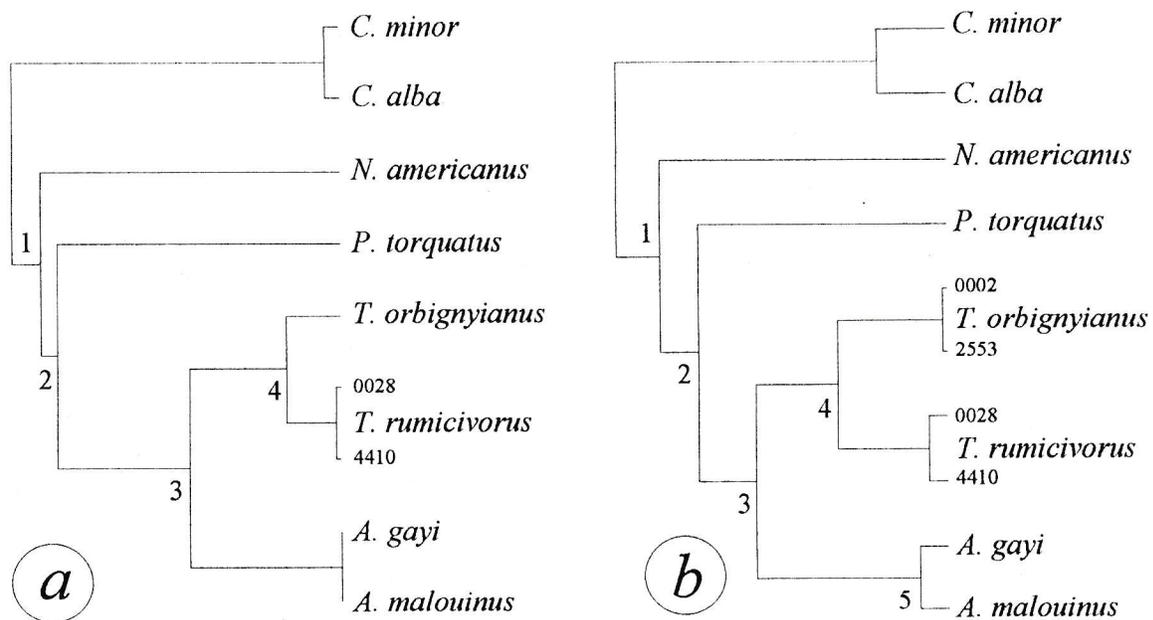
Sobre la base de esta última calibración, las dos especies de *Attagis*, *A. malouinus* y *A. gayi*, se habrían separado hace sólo  $1.8 \pm 0.7$  ma. Finalmente, el nodo que conecta los dos individuos de *Thinocorus rumicivorus* (4410, que proviene de Tierra del Fuego y 0028, que proviene de la costa central de Chile), tiene  $1.2 \pm 0.4$  ma de antigüedad.

**Tabla 13.** Estimación temporal de los nodos internos de Thino-  
coridae a través del método de dos grupos utilizando las secuen-  
cias de los genes rRNA 12S y citocromo *b*. Las dos especies de  
Chionidae fueron utilizadas como grupo externo.

Nodo <sup>a</sup>	$h^b \pm$ error típico	Tiempo (ma)
rRNA 12S (transversiones y transiciones)		
1	$0.0788 \pm 0.0102$	$42.0 \pm 5.4$
2	$0.0741 \pm 0.0103$	$39.5 \pm 5.5$
3	$0.0390 \pm 0.0072$	$20.8 \pm 3.8$
4	$0.0134 \pm 0.0042$	$7.1 \pm 2.2$
Citocromo <i>b</i> (transversiones)		
1	$0.0313 \pm 0.0036$	$40.4 \pm 4.6$
2	$0.0306 \pm 0.0038$	$39.5 \pm 3.6$
3	$0.0165 \pm 0.0028$	$21.3 \pm 3.6$
4	$0.0046 \pm 0.0015$	$5.9 \pm 1.9$
Citocromo <i>b</i> (transversiones y transiciones)		
1	$0.0870 \pm 0.0062$	$46.0 \pm 3.3$
2	$0.0747 \pm 0.0057$	$39.5 \pm 3.3$
3	$0.0587 \pm 0.0051$	$31.0 \pm 2.7$
4	$0.0340 \pm 0.0042$	$7.1 \pm 0.9$
5	$0.0088 \pm 0.0021$	$1.8 \pm 0.7$
6	$0.0058 \pm 0.0017$	$1.2 \pm 0.4$

a: Los números de cada nodo se indican en la Figura 20.

b:  $h$  es la altura del nodo en el árbol ultramétrico.



**Figura 20.** Árboles ultramétricos. *a*, árbol reconstruido a partir de las secuencias del gen rRNA 12S. *b*, árbol reconstruido a partir de las secuencias del gen citocromo *b*. Las distancias genéticas fueron calculadas con el modelo de dos parámetros de Kimura y Chionidae fue utilizado como grupo externo.

Un problema plausible en la amplificación por PCR de genes mitocondriales, tales como el citocromo *b* o el rRNA 12S, es que los productos de la amplificación pueden ser confundidos con copias que residen en el DNA nuclear. Una forma de detectar la presencia de copias múltiples en los productos de amplificación es traducir las secuencias nucleotídicas a secuencias aminoácidas usando el código genético adecuado. Si aparecen mutaciones en el marco de lectura o codones de término adicionales, probablemente esta secuencia correspondería a un pseudogen residente en el núcleo. Por ejemplo, en Passeriformes se ha detectado a través de técnicas de clonamiento que el producto de PCR obtenido con partidores específicos para el gen citocromo *b* contuvo dos tipos de secuencias que diferían en un 10% aproximadamente (Arcander, 1996). Sin embargo, una copia presentó una mutación de cambio en el marco de lectura y un codón de término adicional. Por otra parte, en primates fue posible diferenciar entre pseudogenes del gen citocromo *b*, transferidos ancestralmente desde genes funcionales residentes en el DNA mitocondrial.

#### a) Citocromo *b*, rRNA 12S y Pseudogenes

## DISCUSIÓN

drial, basándose en este tipo de mutaciones después de haber traducido las secuencias nucleotídicas a secuencias aminoácidas (Collura y Stewart, 1995).

Al traducir las secuencias nucleotídicas obtenidas en las especies de Thnaccoridae, Pedionomidae, Scolopacidae y Chionidae, usando el código genético mitocondrial de mamífero, no se detectó ningún codón de término adicional o algún corrimiento en el marco de lectura. De modo que es muy factible que las secuencias obtenidas correspondan efectivamente al gen citocromo *b* del DNA mitocondrial (APÉNDICE A, página 140).

Por otro lado, las secuencias del gen rRNA 12S presentan el patrón característico de variación descrito para esta molécula. Si se comparan las secuencias obtenidas de este gen con las secuencias de aves, tales como las de ratites o *Gallus gallus*, u otros vertebrados, como *Alligator mississippiensis*, *Homo sapiens* o *Xenopus laevis*, se aprecian las mismas zonas conservadas y las mismas zonas variables entre todas ellas (APÉNDICE B, página 148). Esto indica o sugiere que las zonas conservadas están bajo las mismas restricciones moleculares probablemente en todos los vertebrados y que las secuencias obtenidas de este gen, en este estudio, corresponden al gen rRNA 12S que reside en el DNA mitocondrial.

## b) Problemas en la Reconstrucción Filogenética

La sistemática molecular debe considerar los patrones de sustituciones y las tasas de mutación en el DNA. Esto se traduce en el análisis de la composición de bases en cada posición del codón—si se trata de un gen que codifica para una proteína, como es el caso del gen citocromo *b*—, tasas de sustitución de los diferentes nucleótidos, porcentaje de divergencia y el número de transiciones y transversiones entre las secuencias examinadas. Esta información es de vital importancia para reconocer el sesgo en la composición de bases, el efecto de saturación y la divergencia no homogénea de ciertos linajes, factores que se consideran como obstáculos en la estimación filogenética a partir de secuencias nucleotídicas.

Por ejemplo, el sesgo en la composición de bases es causa de agrupamientos virtuales de especies que en realidad podrían estar relacionadas distintamente. Si existe suficiente sesgo en la composición de bases, los métodos de parsimonia favorecerán los cambios desde el estado del carácter—nucleótido— más común hacia el menos común en series de transformación recíprocas. De este modo, se favorece el cambio de A hacia G sobre el cambio de G hacia A si es que A es más común que G (Collins *et al.*, 1994). Por otro lado, las sustituciones sobrepuestas o mutaciones múltiples—efecto de saturación— en los mismos sitios pueden provocar problemas, dada la alta homoplasia de tales cambios. A su vez, las tasas de evolución molecular que no son homogéneas podrían dar cuenta de ramas demasiado extensas como resultado

de diferentes presiones selectivas y restricciones moleculares, existiendo una mayor probabilidad de mutaciones paralelas en estas ramas dando lugar eventualmente a agrupamientos que son artificiales y sin significado biológico (Lockhart *et al.*, 1994).

Aunque el gen rRNA 12S ha sido utilizado con éxito para la reconstrucción de relaciones filogenéticas en un amplio rango de niveles de divergencia (Sullivan *et al.*, 1995), las mismas restricciones funcionales complican los análisis filogenéticos, dado que la mayoría de los métodos de reconstrucción filogenética suponen que los caracteres considerados son independientes evolutivamente (Swofford, 1993). Obviamente, este supuesto es violado por las substituciones compensadoras o concertadas que ocurren en las regiones de hélice doble en esta molécula.

Todos estos factores pueden oscurecer el análisis filogenético, pero, una vez identificados, los resultados artificiales posibles pueden ser aminorados o compensados. Esto se consigue modificando el tipo de análisis e ideando esquemas de ponderación para cada gen en particular, eliminando sitios que no son informativos y no considerando caracteres en donde la señal filogenética es aleatoria. Todo esto con el fin de rescatar sólo los caracteres que son potencialmente informativos.

### c) Sesgo en la Composición de los Genes Citocromo *b* y rRNA 12S

La composición de nucleótidos en el gen citocromo *b* de las especies analizadas presentó un sesgo con bajas cantidades de guanina (G), sesgo que destaca al analizar cada posición del codón, en donde la tercera posición aparece con el sesgo mayor y más variable entre las especies (ver RESULTADOS, sección a) Composición de Nucleótidos en los Genes Citocromo *b* y rRNA 12S, página 42). Este sesgo en la composición del DNA mitocondrial que codifica proteínas ha sido asociado con el daño oxidativo y la tasa metabólica del linaje en cuestión (Martin, 1995). El daño del DNA por oxidación ha mostrado favorecer la inserción de los nucleótidos A y T. El resultado de esta preferencia es que, si G o C se dañan, habrá una transversión de C hacia A o de G a T. Si A o T son dañadas, habrá una transición de A hacia T o de T hacia A (Martin, 1995). Esto puede dar cuenta de la pasividad de G en la tercera posición (Figura 9, página 48). Esta observación es consistente con otros estudios realizados en aves y vertebrados en general (Kocher *et al.*, 1989), sugiriendo que existe, aparentemente, el mismo tipo de restricciones afectando la tercera posición del codón.

La segunda posición del codón muestra un exceso de nucleótidos T y C. Este sesgo en la segunda posición del codón podría estar directamente relacionado con la hidrofobicidad de la molécula (Naylor *et al.*, 1995). Veinticuatro de 26 residuos de aminoácidos hidrofóbicos tienen T o C en la segunda posición. Por lo tanto, el sesgo en la composición de bases para T y C en esta po-

sición del codón podría resultar de restricciones que mantienen los residuos hidrofóbicos en posiciones particulares de la proteína. Este patrón es evidente en el gen citocromo *b* de *Thinocoridae* y sus grupos externos (Figura 9, página 48).

Sin embargo, todas las especies de *Thinocoridae* y sus grupos hermanos, incluyendo los grupos externos, presentan en general la misma magnitud de sesgo en la composición de bases (Tabla 3, página 45). Además, al eliminar la tercera posición—posición del codón que presenta el sesgo mayor—de los análisis filogenéticos, se obtuvieron los mismos resultados en cuanto a la topología generada (ver más adelante). De modo que un artefacto producto de tal característica en el gen citocromo *b* es prácticamente nulo en términos de relaciones filogenéticas.

El sesgo en la composición de bases presentado por el gen rRNA 12S presenta una deficiencia en T y G y una alta cantidad de A, característica que comparten todas las especies estudiadas (Tabla 4, página 46). Se postula que la alta cantidad de A en las secuencias del gen rRNA 12S mantiene interacciones hidrofóbicas con las proteínas ribosomales, dado que esta base presenta la polaridad menor de las cuatro bases disponibles (Gutell *et al.*, 1985). Se ha descrito también un sesgo en la composición de bases diferente en las zonas de hebra simple comparado con el de las zonas de doble hebra (Springer *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1995). Sin embargo, este gen posee restricciones moleculares diferentes a las del citocromo *b*, en donde es necesario un esquema de

ponderación particular en función de su estructura secundaria y así contra-  
restar cualquier efecto que contribuya a ocultar la verdadera señal filogenéti-  
ca. Estos esquemas de ponderación están siendo recientemente implementa-  
dos para la reconstrucción filogenética en mamíferos, distinguiendo principal-  
mente sustituciones que ocurren en las zonas de hebra doble —las que invo-  
lucran mutaciones compensadoras—, de las que ocurren en los zonas de he-  
bra simple.

#### d) Tasas de Substituciones en los Genes Citocromo *b* y rRNA 12S

Varios factores influyen en las tasas de evolución molecular, y al parecer, más de un mecanismo domina el tipo de mutación a nivel nucleotídico en cada una de las posiciones del codón (Mindell *et al.*, 1996). La tasa de sustitución nucleotídica está determinada básicamente por la tasa de mutación y la probabilidad de fijación de estas mutaciones (Li y Graur, 1991).

La probabilidad de fijación de una mutación está determinada por los efectos *a posteriori* de tales mutaciones, es decir, si estas mutaciones corresponden al tipo deletores, que no tienen ninguna probabilidad de fijarse en una población, o mutaciones neutrales, las cuales aparecerían aleatoriamente a una cierta tasa probablemente constante. Entre los factores que determinan si ciertas mutaciones son neutrales o deletéreas, se encuentran las restricciones funcionales y estructurales de los productos de genes que codifican para una proteína o un RNA ribosomal y las diferencias en la presión de selección de estas mutaciones (Naylor *et al.*, 1995).

Las propiedades funcionales del citocromo *b* en el transporte de electrones y las restricciones moleculares a nivel aminoacídico han sido descritas en mamíferos. Por lo tanto, no es sorprendente que la distribución de aminoácidos variables en el citocromo *b* no sea aleatoria. Se ha observado una correlación entre regiones conservadas del citocromo *b* y los dominios estructurales o funcionales (Irwin *et al.*, 1991). Los dominios transmembranas han sido identificados como regiones relativamente de alta variabilidad, mientras que los cen-

tros de oxidación y reducción presentan aminoácidos altamente conservados

(Howell, 1989).

Estas restricciones moleculares son causa del patrón de sustituciones

que presenta *Thinocoridae* y sus grupos externos en cada una de las posición-

nes del codón del gen citocromo *b* (Tabla 8, página 58). La segunda posición

del codón es la más conservada y por esto ha sido considerada como una

fuerza de caracteres confiables para los análisis filogenéticos, dado que todos

los cambios en esta posición pueden alterar un aminoácido (Irwin *et al.*, 1991).

Por otro lado, se espera que la mayoría de las sustituciones se produzcan en

la tercera posición, es decir, que esencialmente sean del tipo silenciosas o si-

lónimas, producto de la degeneración en el código genético y de la presión

selectiva menor de acuerdo a las restricciones estructurales que afectan a esta

posición (Li y Graur, 1991). De hecho, el 92% de los cambios en el citocromo *b*

de *Passeriformes* ocurre en la tercera posición del codón, lo que confirma que

este gen evoluciona bajo tales restricciones funcionales (Edwards *et al.*, 1991).

En el caso del rRNA 12S, este gen posee una función primaria en la

síntesis de proteínas y muestra diferentes estructuras secundarias mantenidas

por apareamiento de bases, las que son esenciales para su integración en los

ribosomas (Noller, 1984). Por lo tanto, es de esperar que las regiones de la

molécula que mantienen una estructura de hélice doble tengan restricciones

moleculares diferentes a las regiones de hebra simple y que las tasas de subs-

tituciones sean determinadas por cambios compensadores en estas zonas. Se

hace necesario entonces desarrollar un esquema de ponderación específico para el gen rRNA 12S de las aves, con el fin de anular principalmente los efectos de la falta de independencia entre caracteres. Sin embargo, se necesita idealmente la molécula completa para determinar el modo de evolución de este gen como una sola unidad, dando lugar a una línea futura de estudio en la sistemática molecular de aves. Por esta razón es que, los resultados obtenidos en este estudio deben ser considerados con cautela y sólo como una aproximación inicial.

### e) Problemas de Saturación

En el gen citocromo *b*, *Thinocoridae* presenta transiciones que son apro-

ximadamente cinco veces más frecuentes en promedio que las transversiones,

similar a la norma encontrada en otros vertebrados (Li y Graur, 1991). Dado

que las transiciones se acumulan a través del tiempo, la razón  $t_s/t_v$  decrece

debido a una superposición de transiciones en muchas posiciones, introdu-

ciendo cada vez más transversiones en estos sitios (ver la sección la c) Efectos

de Saturación y Tasas de Substituciones, página 61). El gráfico de transiciones y

transversiones en el gen citocromo *b*, se aproxima a un *plateau* a medida que

aumenta la divergencia de las secuencias, demostrando que existe una ten-

dencia hacia la saturación en *Thinocoridae* (Figura 10, página 64). Si se desea

disminuir el grado de homoplasia entre las secuencias comparadas y a la vez

calibrar un reloj molecular, las distancias genéticas entre los taxa deberían es-

tar idealmente bajo la región del *plateau* en la relación no lineal de  $p$  con el

tiempo.

El mismo gráfico para el gen rRNA 12S muestra una relación más bien

lineal entre este tipo de sustituciones (Figura 11, página 65), evidencia que da

cuenta de que el gen citocromo *b* evoluciona definitivamente más rápido que el

gen rRNA 12S. Es así como el gen citocromo *b* puede ser más eficiente que el

gen rRNA 12S para determinar divergencias tempranas en un árbol filogenéti-

co.

Un factor que puede explicar la rápida saturación en el citocromo *b* es la

cantidad de leucina en la secuencia aminoacídica. Leucina es uno de los aminoácidos más comunes en el DNA mitocondrial (Irwin *et al.*, 1991). La abundancia de leucina en el citocromo *b* ha sido determinada y reconocida como un problema en los análisis de reconstrucción filogenética. La razón es que existen seis tripletes que codifican para leucina, de los cuales cuatro tienen C y dos tienen T en la primera posición, mientras cuatro tripletes poseen A y G y dos tripletes poseen C y T en la tercera posición. Dado que existe una probabilidad mayor de sustituciones silenciosas en la primera y tercera posición, estas sustituciones podrían acumularse rápidamente y así contribuir con información de alta homoplasia via mutaciones múltiples o sobrepuestas (Irwin *et al.*, 1991). Por esto a menudo en los análisis filogenéticos a partir de genes que codifican para proteínas, la tercera posición es descartada.

Sin embargo, dado que la segunda posición del codón en el citocromo *b* favorece T y C como consecuencia de restricciones hidrofóbicas (Naylor *et al.*, 1995), la segunda posición tenderá a cambiar solamente entre T y C. Esta restricción sobre las sustituciones en la segunda posición indica que, aparentemente incluso a niveles bajos de divergencia, la segunda posición del codón podría estar eventualmente sujeta al efecto de saturación. De modo que el solo hecho de que sea conservada no necesariamente implica certeza desde el punto de vista de la estimación filogenética.

## f) Análisis Filogenético

Antes de llevar a cabo un análisis filogenético, es útil probar si la señal filogenética del conjunto de datos generado a partir de secuencias nucleotídicas es claramente distinguible de un conjunto de datos generados aleatoriamente. La prueba de árboles aleatorios mide la cantidad de sesgo en la distribución de frecuencias de largos de árboles. Mientras más alto sea este sesgo, mayor será la cantidad de señal filogenética en los datos. Un sesgo hacia la izquierda se indica con un valor negativo del estadístico  $G$ . Sin embargo, estas pruebas no revelan la naturaleza de la señal, por lo tanto, han sido criticadas como innecesarias. Además, se ha encontrado que solamente unos pocos nodos bien definidos puedan dar cuenta de un valor significativo de  $G$  (Huelsenbeck, 1991). No obstante, un valor que no es significativo sugeriría que el conjunto de datos es completamente aleatorio y no debería usarse para un análisis filogenético. De este modo, la prueba sigue siendo valiosa.

El conjunto de datos generados a partir de los genes citocromo *b* y rRNA 12S, presentaron distribuciones con un sesgo significativo hacia la izquierda, de modo que al menos es posible descartar que la señal filogenética utilizada para la reconstrucción de los árboles sea eventualmente aleatoria.

Los métodos de reconstrucción filogenética, tales como el de parsimonia, el de probabilidad máxima o el de distancia utilizados en este estudio, difieren en sus supuestos sobre la evolución del DNA. Estos supuestos, como la independencia de caracteres, están implícitos en los análisis. No obstante y en

general, la independencia entre caracteres es violada en genes como el rRNA 12S o citocromo *b*, debido a las restricciones moleculares de sus productos y se hace necesario el uso de modelos de ponderación entre caracteres.

La parsimonia es a veces preferida dado que necesita menos supuestos acerca de la evolución de los caracteres si se compara con el modelo de probabilidad máxima, en donde variables como la razón de transversiones y transiciones, composición de nucleótidos o tasas de evolución diferencial entre caracteres están explícitas en el análisis (Cracraft y Helm-Bychowski, 1991). Por otro lado, el método de probabilidad máxima está basado en modelos de evolución molecular explícitos (Sidow y Wilson, 1991) y así corrige para cambios superpuestos. No obstante, una desventaja de este método es que los supuestos específicos pueden o no ser apropiados.

Todos los métodos presentan ventajas y desventajas que deberían ser recordadas en el momento de interpretar los árboles generados. Por ejemplo, los métodos de parsimonia han mostrado ser inconsistentes si no existe homogeneidad en las tasas de evolución molecular (Zharikh y Li, 1993).

Es así como se justifica el uso de más de una aproximación al momento de resolver un problema filogenético, de modo que la congruencia en las topologías generadas por diferentes métodos de reconstrucción filogenética, podría incrementar la certeza de tal estimación.

Aunque los genes mitocondriales citocromo *b* y rRNA 12S presentan una modalidad de cambio diferente, producto de restricciones estructurales des-

gales —dada su funcionalidad—, se obtuvo la misma topología para la filogenia de *Thinocoridae* a través de tres métodos diferentes de reconstrucción filogenética, en donde cada método mantiene premisas distintas. Esto sugiere una alta consistencia en lo que se refiere a los métodos de estimación filogenética y a su vez solidez en las relaciones filogenéticas de las especies que componen a *Thinocoridae* y sus grupos hermanos, es decir, desde una perspectiva histórica ambos genes ofrecen la misma secuencia de eventos de separación entre las especies examinadas.

Otra medida que indica una alta solidez en la estimación de la filogenia obtenida, es que prácticamente todos los nodos del árbol generado están soportados con altos valores de "bootstrap", la mayoría con los valores máximos de 100 (Figura 16, página 74).

Las tasas diferenciales de transiciones y transversiones en *Thinocoridae* son evidentes. Las transiciones son en promedio aproximadamente cinco veces más frecuentes que las transversiones en el citocromo *b*. Para mantener objetividad, se han utilizado las razones ts/tv como criterio para ponderar estas sustituciones inversamente a sus frecuencias relativas. La idea de ponderar caracteres en el método de parsimonia, nace de estudios de simulación en donde este método mostró ser mucho más efectivo que la parsimonia máxima —no ponderada—, sobre todo si es que no existen tasas de divergencia homogéneas entre los taxa (Hillis *et al.*, 1994).

Se han restringido los análisis filogenéticos en *Thinocoridae* solamente a

transversiones (transiciones pesadas a cero), a las razones 5/1 y 10/1 (ts/tv) y a la primera y segunda posición del codón, sobre la premisa que estos tipos de caracteres son más conservados y así es más probable de que sean filogenéticamente informativos (Irwin *et al.*, 1991). Todos estos esquemas de ponderación vía parsimonia fueron utilizados para construir los árboles de *Thinocoridae* a partir de las secuencias nucleotídicas del gen citocromo *b*. Como resultado se obtuvieron las mismas topologías con los mismos clados dentro de *Thinocoridae*. De este modo, la topología generada parece robusta con los datos de dos genes mitocondriales y puede ser usada como estructura base para probar hipótesis evolutivas.

## g) Congruencia con la Hibridación de DNA

Ningún conjunto de datos en el campo filogenético de las aves ha inspirado tanto interés como los estudios de Sibley y Ahlquist, quienes entregaron mediciones de distancia generadas a través de comparaciones de hibridaciones interespecíficas de copias únicas de DNA (Shields y Strauss, 1975). Los árboles filogenéticos contruidos y las edades absolutas de varios linajes de aves —estimadas sobre la base de una serie de suposiciones biológicas y geológicas— desafiaron un sinnúmero de ideas convencionales en torno a las relaciones filogenéticas de las aves. Entre ellas destacan la relación de Pedionomidae de Australia con *Thinocoridae* de Suramérica.

Como consecuencia de la publicación de estos resultados, surgió un gran número de críticas relacionadas con la certeza estadística, la heterogeneidad de tasas de evolución molecular en los diferentes linajes bajo el supuesto de un reloj molecular, y el uso de matrices de distancias incompletas. Se han hecho nuevos análisis de las matrices de distancia, se han creado nuevas matrices al azar a través de los métodos de acuchillamiento de datos, se han utilizado algoritmos que suponen un reloj molecular, otros que no lo suponen y se han buscado finalmente las áreas de consenso resultantes. En general, se obtuvieron árboles distintos a los originales, sin embargo, algunas relaciones filogenéticas permanecieron inmutables, incluyendo la alianza de *Pedionomidae* con *Thinocoridae* (Harshman, 1994).

Es así como una segunda aproximación, como lo es la reconstrucción

filogenética a partir de secuencias nucleotídicas, que posee una metodología de análisis con premisas diferentes, proporciona un punto de referencia independiente y valioso en el ámbito molecular para probar los resultados a partir de la hibridación de DNA.

El árbol filogenético obtenido a partir de secuencias nucleotídicas de DNA mitocondrial es congruente con la hipótesis de trabajo, la cual surge de la interpretación de los resultados de la hibridación de DNA. *Attagis y Thinocorus* son monofiléticos, siendo Pedionomidae el grupo hermano de Thinocoridae. De tal modo que, en principio, al menos a niveles de divergencia de 10 y 50 ma, es de esperar que los métodos de reconstrucción filogenética a partir de secuencias nucleotídicas muestren en la mayoría de los casos la misma topología generada a partir de comparaciones de copias únicas de DNA, dado que la naturaleza de la divergencia presentada por los distintos clados, es en general la misma, es decir, mutaciones al nivel de DNA.

Sin embargo, algunas diferencias pueden surgir a niveles de divergencias demasiado pequeñas, en donde la magnitud de los  $\Delta T_{50H}$  es sobrepasada por la de su error. Por otro lado, a niveles de divergencias demasiado extensas, las copias únicas de DNA pueden también estar sujetas a los efectos de excesiva homoplasia a través de mutaciones sobrepuestas, produciendo así agrupamientos ilegítimos. Finalmente, si las distancias generadas entre los nodos por los métodos fenéticos de reconstrucción filogenética son muy discretas, es posible que se formen clados en función del orden de los taxa en la

matriz de datos. No obstante, estas fuentes de error pueden ser detectadas por métodos como el acuchillamiento de datos o rearreglos del orden de entrada de los taxa en el análisis.

Sin duda la hibridación de DNA posee sus limitaciones como cualquier otra aproximación, siendo materia de investigación actual el saber en qué niveles de divergencia será propicio su uso y cual es el error asociado a las estimaciones de distancia resultantes. La aproximación alternativa que puede resolver estas interrogantes proviene de las secuencias nucleotídicas de DNA, en donde es factible contrastar los resultados obtenidos por ambas técnicas optimizando el uso de distintos genes en función de la divergencia entre los taxa examinados.

## h) Reloj Molecular

Una de las características que distingue al DNA mitocondrial, y que justifica su uso en estudios filogenéticos, es su alta tasa de evolución molecular. Una de las primeras estimaciones de su tasa de evolución molecular fue de  $1-2 \times 10^{-8}$  sub/s/año, o alrededor del 2% de divergencia entre secuencias por ma (Brown *et al.*, 1979). Esto significa una tasa de cinco a diez veces más rápida que la del DNA nuclear, característica que compartirían supuestamente todos los vertebrados. Sin bien estas calibraciones clásicas fueron propuestas para mamíferos, específicamente en primates, se aceptó que las aves tenían la misma tasa de mutación según estudios realizados en gansos canadienses (Anser y Branta), los cuales se basaron en registros fósiles para determinar tiempos absolutos de separación entre diferentes especies (Shields y Wilson, 1987).

Sin embargo, con el incremento de secuencias de organismos que difieren notablemente en relación con sus patrones de historias de vida o hábitos termales, como ectotermos y endotermos, se mostró en realidad que el reloj molecular del DNA mitocondrial en vertebrados es altamente variable dependiendo del linaje en cuestión (Martin y Palumbi, 1993). Un caso de extrema lentitud de la tasa de cambio del DNA mitocondrial proviene de estudios recientes realizados en tiburones. Sobre la base de secuencias del gen citocromo *b* y del gen citocromo oxidasa I, 13 especies de escualos tendrían tasas de siete a ocho veces más lentas que las de primates o ungulados (Martin *et al.*,

1992). Esto sugiere la necesidad de calibraciones específicas para cada taxa y gen examinado.

Al respecto, se han propuesto varias hipótesis en relación con los factores que pudieran estar determinando la tasa de mutación en los diferentes linajes. Tales factores incluyen la tasa metabólica (Martin y Palumbi, 1993), el tiempo generacional (Li *et al.*, 1987), alta reproducción celular al nivel de líneas germinales (Wu y Li, 1985), y la eficiencia de reparación del DNA o la fiabilidad existente en su replicación (Britten, 1986).

En el caso de las aves, es posible que existan restricciones adicionales en la evolución molecular debido a que mantienen una alta temperatura corporal, en donde se propone que sólo un número limitado de proteínas plausibles sería viable en este ambiente celular, dando lugar a bajas tasas de fijación de mutaciones en el DNA mitocondrial (Mindell *et al.*, 1996).

Las pruebas para constancia de tasas en el gen rRNA 12S en *Thnococtidae* y sus grupos externos no fueron, en general, significativas usando transversiones y transiciones (ver la sección e) Constancia en Tasas de Evolución Molecular y Calibración del Reloj Molecular, página 77). Adicionalmente, el gen rRNA 12S no posee aparentemente problemas mayores de saturación como el gen citocromo *b*. Por otro lado, existe evidencia de tasas constantes halladas para este gen en artiodáctilos y salamandras, lo que ha resultado en calibraciones que permiten estimar tiempos de separación entre las especies de estos linajes y proponer así filogenias en el más amplio contexto (Caccone *et al.*, 1994 y

Kraus y Miyamoto, 1991).

Si se hubiese empleado la calibración tradicional de 2% de divergencia por ma (Shields y Wilson, 1987), se obtendría un tiempo de separación para las ratites australianas de sólo seis ma considerando las transversiones y transiciones en el gen rRNA 12S. Si se utiliza la calibración de 0.14%/ma para transversiones solamente (Caccone *et al.*, 1994 y Kraus y Miyamoto, 1991), la separación tendría sólo 12 ma de antigüedad. Estas estimaciones obviamente son biológicamente insostenibles. De modo que *a priori* el reloj molecular de ratites y tinocóridos debería ser más lento, si se supone que el mismo evento geológico fue responsable de la separación de estos dos grupos mayores de aves y la existencia de homogeneidad en las tasas de evolución molecular.

Si consideramos sólo las transversiones en el gen rRNA 12S y 38 ma para la separación de las ratites australianas de las suramericanas, como consecuencia de la separación de Australia del resto del megacontinente, obtenemos una tasa de 0.043%/ma, la que es 3.3 veces más lenta que la propuesta para mamíferos y salamandras (0.14%/ma; Kraus y Miyamoto, 1991 y Caccone *et al.*, 1994). Si consideramos las transiciones y las transversiones conjuntamente, obtenemos una tasa de 0.297%/ma, tasa que 1.2 veces más lenta que la encontrada en salamandras (0.35%/ma; Caccone *et al.*, 1994). Sin embargo, es necesario advertir el bajo número de pares de bases consideradas para estas aseveraciones (408 pb para el gen rRNA 12S), siendo imperioso la secuen-

ción del gen completo para obtener una calibración más confiable. No obstante, estas tasas de evolución del DNA mitocondrial más lentas ya han sido sugeridas para siete ordenes de aves en los genes 12S y 16S usando el método de árboles ultramétricos y basándose en la separación de megacontinentes (Hedges *et al.*, 1996).

En general, los datos provenientes de las secuencias nucleotídicas de *Thrinorhynchus* son consistentes con una tasa de evolución molecular —del DNA mitocondrial y nuclear— relativamente más lenta en las aves y en donde la alta temperatura corporal parece representar un papel preponderante en lo que se refiere a restricciones moleculares. No obstante, los vertebrados que poseen una alta tasa metabólica tienden a tener tasas más altas de evolución molecular, presumiblemente por la alta producción de radicales de oxígeno que significa a la vez un daño mayor de la molécula de DNA (Martin y Palumbi, 1993).

Sin embargo, las tasas más lentas de evolución molecular observadas en las ratas con un gran tamaño corporal, comparadas con las de pequeños mamíferos, o las tasas lentas de ectotermos como las tortugas y las aves que son endotérmicas, no se ajustan bien con las predicciones de este tipo de hipótesis. Estas contradicciones aparentes no serán aclaradas hasta que existan grandes cantidades de secuencias y datos fisiológicos disponibles para estudios comparativos.

**i) Deriva y Paleoclima de Continentes Australes y la Orogénesis Andina**

La estimación temporal de eventos de divergencia a partir de datos de secuencias nucleotídicas requiere genes que evolucionen a una tasa relativamente constante. Aparentemente, los métodos de árboles ultramétricos muestran que el gen rRNA 12S es una molécula que evoluciona a una tasa constante entre *Struthioniformes* y *Charadriiformes*. Además, este gen no parece estar saturado como el gen citocromo *b*, dado que es una molécula que evoluciona lentamente en relación con la divergencia del grupo. Es posible entonces, usar este marcador molecular para estimar los tiempos de divergencia de cada nodo en los árboles generados a partir de secuencias nucleotídicas de *Thinocoridae*. Sin embargo, es necesario al menos un punto de referencia independiente, en términos de tiempo absoluto, que permita calibrar el reloj molecular en este gen mitocondrial.

Un punto calibrado con precisión es de vital importancia para una estimación confiable de los tiempos de divergencias a partir de datos moleculares. Comúnmente, los registros fósiles han proporcionado evidencia independiente para estimar el tiempo mínimo de divergencia entre diferentes linajes (por ejemplo en tiburones, Martín *et al.*, 1992). Sin embargo, las características estructurales del esqueleto de las aves hacen que el registro fósil sea pobre comparado con el de mamíferos o el de anfibios. No obstante, la evidencia sobre la base de datos moleculares a partir de linajes que han evolucionado independientemente, como es el caso de las aves y mamíferos, sumado a las

hipótesis de sus paleodistribuciones, hace posible consolidar una visión amplia de la diversificación de estos grupos de vertebrados (Hedges *et al.*, 1996). A una menor escala, dos grupos mayores de aves, como las ratites y los tinocóridos, pueden entregar patrones cladogenéticos que reflejen conjuntamente los eventos geológicos mayores ocurridos en los paleocontinentes australes, que en general, son responsables de la diversificación de la biota del hemisferio sur:

Cuando se considera la tectónica de placas junto con los cambios en los niveles de los océanos, la mayor parte de los rompimientos de continentes ocurridos en los últimos 250 ma pertenecen al periodo del Mesozoico y principalmente al Cretácico. Por lo demás, el rompimiento de Pangea ha sido citado comúnmente como un factor determinante en la biogeografía histórica de organismos del Mesozoico (Hedges *et al.*, 1996). Por ejemplo, la evidencia a partir de secuencias de DNA en relación con grupos mayores de anfibios como *Archaeobatrachia*, *Neobatrachia*, *Bufoidea* y *Ranoidea*, muestra la relación que existe con las grandes masas continentales: Laurasia, Gondwana, Suramérica y África, respectivamente (Hay *et al.*, 1995). La radiación de algunos invertebrados marinos como los braquiópodos, ha sido explicada por la división del megacontinente Gondwánico debido a la penetración de mares epicontinentales, específicamente entre Australia y la Antártica (Mackinnon, 1987). La distribución geográfica actual de organismos con una movilidad prácticamente nula a una escala continental, como *Onychophora*, es otra evidencia clara de even-

tos vicariantes por la división de paleocontinentes (Monge-Najera, 1995). De tal modo que las explicaciones del tipo vicariante, son comúnmente utilizadas para dar cuenta de eventos de especiación y diversidad en un amplio rango de complejidad orgánica.

Existe evidencia abundante para la interconexión de Australia con la Antártica. Las reconstrucciones hipotéticas de paleocontinentes muestran que Australia estuvo conectada a la porción este de la Antártica y no se separó hasta mediados o fines del Eoceno, esto es hace 40 ma, aproximadamente (Kennett, 1980). Antes de la disyunción de Australia, la circulación oceánica era longitudinal, con corrientes marinas dirigidas hacia el norte a través de la costa oeste de Suramérica y la costa este de Australia y la Antártica. Estas condiciones oceanológicas mantenían un clima del tipo subtropical en la Antártica y, a escala global, las temperaturas eran mucho más altas que las registradas en la actualidad (Kvasov y Verbitski, 1981). Sobre la base de evidencia terrestre y marina, se sugiere que en este periodo hubo un calentamiento global sostenido y se estima una temperatura de 16 °C en las aguas superficiales oceánicas del continente Antártico (Clarke y Johnston, 1996). Por otro lado, los registros fósiles de anfibios y reptiles del Triásico inferior hallados en las montañas transantárticas sugieren un clima mucho más temperado que el actual en estas latitudes (Barrett *et al.*, 1968; Elliot *et al.*, 1970). Estas evidencias, muestran al continente Antártico como un lugar apto para sostener una gran diversidad de flora y fauna subtropicales.

Posterior al rompimiento, Australia continuó alejándose de Gondwana hacia el norte y el paleoclima de lo que es hoy el continente Antártico comenzó a enfriarse, encontrándose las primeras evidencias de formaciones de hielo continentales y marinas a fines del Eoceno, esto es hace 35 ma (Mackinnon, 1987; Clarke y Johnston, 1996). Como consecuencia de la separación de Australia, se origina una corriente de aguas frías o Corriente Circular del Sur, que determina la formación del casquete de hielo este en la Antártica (Kvasov y Verbitski, 1981).

Estos eventos climatológicos provocan una serie de cambios en la vegetación de austral de Suramérica. Más aún, la Antártica comienza a convertirse en una región inhabitable dado su paulatino enfriamiento. Sin embargo, los sedimentos de la Isla Rey Gorge muestran la presencia de bosques deciduos y coníferas para el intervalo Eoceno-Mioceno. Esta flora aparentemente estuvo dominada por gymnospermas y fagáceas. Adicionalmente, se postula que una parte importante de la Península Antártica estuvo poblada de bosques hasta fines del Mioceno, esto es hasta hace siete ma, aproximadamente (Hill y Scriven, 1995).

Dado que la formación de hielo sobre el continente antártico no fue homogénea, puede esperarse o suponerse que la fauna y flora de la región este de la Antártica fue desplazándose y moviéndose hacia el oeste a medida que el hielo cubría esta región del continente, quedando restringida en las áreas montañosas Trasantárticas, Estrecho de MacMurdo, Sierras de Jones, Sierras

de Ellsworth, o a la región de la Península Antártica y también en islas subantárticas del Mar de Ross.

La región oeste de la Antártica ha sido considerada como centro de diversificación de muchos organismos, en particular de marsupiales y algunas especies de fagáceas (Case, 1988, 1989). Además, se maneja la hipótesis de que la Provincia Zoogeográfica Weddelliana —zona oeste—, fue una fuente importante de novedades evolutivas durante el Cretácico tardío y el Cenozoico (Case, 1988, 1989). Por otro lado, grandes masas de hielo existieron también en la zona oeste de la Antártica a comienzos del Mioceno. No obstante, los registros fósiles de flora, en rocas sedimentarias del Terciario medio de esta región, indican que estas capas de hielo debieron haber estado confinadas sólo a terrenos elevados o grupos de islas (Denton *et al.*, 1971).

Posteriormente, el paso Drake comienza a formarse desde el Mioceno temprano (23 ma), consiguiéndose el aislamiento oceanográfico completo de la Antártica en el Mioceno medio, hace 14-12 ma (Kvasov y Verbitski, 1981; Clarke y Johnston, 1996). Durante la formación del paso Drake, ocurrieron grandes eventos catastróficos, producto de transgresiones marinas que ocuparon áreas extensas en el este de Suramérica (Kvasov y Verbitski, 1981). Debido a estas transgresiones marinas, hubo una disminución de espacio disponible para la vegetación y esto explicaría probablemente el aumento de las paleotemperaturas oceánicas registradas para este período (Clarke y Johnston, 1996).

La abertura del Estrecho de Drake provocó que las aguas de la Co-

riente Circular del Sur, que antes fluían por la costa oeste de Suramérica, se desviarán por este estrecho y conformarán finalmente la Corriente Circumpolar actual. El cese de aportes de aguas cálidas a las costas antárticas, resultó en la formación del casquete de hielo oeste en el continente, hace 14-11 ma (Kvasov y Verbitski, 1981). Paralelamente, las transgresiones marinas en el este de Suramérica se retiraron con la subsecuente reducción de humedad en las regiones interiores, aumentando así el gradiente de temperaturas (Axelrod, 1979).

Posteriormente, en el Mioceno superior y Plioceno —aproximadamente hace 5 ma—, Suramérica experimentó procesos tectónicos que se manifestaron en el levantamiento del cordón andino (Uliana y Biddle, 1988), estableciéndose finalmente las zonas desérticas de Suramérica y la formación de la flora altoandina actual (Solbrig, 1976). A la vez, se registraron para este período una serie de glaciaciones mayores en la zona austral del continente sudamericano, estimándose la antigüedad de este evento en 7-4.6 ma (Mercer y Sutter, 1982).

Esta sucesión de eventos geológicos como rompimientos y deriva de continentes, introgresiones marinas y las múltiples glaciaciones ocurridas durante el Cenozoico, muestran a los continentes australes —Australia, la Antártica y Suramérica—, como escenarios biogeográficos profusamente perturbados en donde la biota sin duda fue fragmentada como consecuencia de cambios ambientales de gran escala. Frente a este escenario austral y considerando la

estimación temporal de cada nodo en el cladograma de *Thinocoridae*, es posible deducir un modelo hipotético que puede explicar cada evento cladogenético en la filogenia de este grupo de *Charadriiformes*.

### **j) Modelo de Especiación Para Thinocoridae**

La distribución geográfica actual de Thinocoridae y Pedionomidae, y la evidencia de su relación filogenética a partir de los genes citocromo *b* y rRNA 12S, sugiere que el factor causal de la separación de estas dos familias es ciertamente el rompimiento y deriva de Australia del resto de Gondwana. Sin embargo, las evidencias que rechazan categóricamente una hipótesis de dispersión posterior a este rompimiento, son la distribución actual de las ratites, su filogenia sobre la base de secuencias nucleotídicas del gen rRNA 12S y la magnitud de su divergencia.

Aunque el porcentaje de divergencia entre las ratites australianas y las sudamericanas (de 11.3% en el gen rRNA 12S) es levemente menor que la existente entre Pedionomidae y Thinocoridae (13.6%) la prueba para la constancia de tasas de mutación, a través de los métodos de árboles ultramétricos, muestra que estos dos grupos presentan la misma tasa de evolución molecular. Probablemente con un mayor número de secuencias, la varianza pueda disminuir y la discrepancia entre las divergencias de Struthioniformes y Charadriiformes pueda ser significativa, como consecuencia de una tasa menor real en Struthioniformes producto de su mayor tamaño corporal y una tasa metabólica menor de la esperada para Charadriiformes como Thinocoridae. De modo que estos resultados deben ser considerados como preliminares a una verdadera calibración de un reloj molecular. Como dato anexo que fortalece lo observado en el gen rRNA 12S, existe la misma magnitud de divergencia entre las ratites

australianas y sudamericanas, comparado con Pedionomidae y Thinocoridae en el gen citocromo *b* (Haddrath y Baker, datos no publicados). Es así como se espera que estos dos grupos de aves hayan sido influidos por la misma historia geológica en relación con el rompimiento inicial de Australia y su separación de la Antártica.

Si se reconstruye la distribución geográfica de cada ascendiente hipotético del árbol filogenético de Thinocoridae, debemos suponer que inicialmente el ancestro de Pedionomidae y Thinocoridae habitó la región sudeste de Australia y noroeste de la Antártica. Este supuesto es parcialmente sustentado por la distribución actual de Pedionomidae, familia que habita específicamente las estepas de Nueva Gales del Sur y el oeste de Victoria en Australia. Sin embargo, la distribución actual de Thinocoridae está lejos de ser la región noroeste de la Antártica.

Por otra parte, la evidencia palinológica indica que taxa como asteráceas y gramíneas, que destacan en las formaciones de tundras modernas, existieron durante el Oligoceno en la región del Mar de Ross (Hill y Truswell, 1993). Esto muestra que un ambiente propicio para el antepasado de Thinocoridae en esta región es totalmente plausible.

Con posterioridad a la separación de Australia (38 ma) y la formación del casquete de hielo este, el ancestro de Thinocoridae y en general la paleobiota antártica se refugió en la Provincia Zoogeográfica Weddelliana, aprovechando la gran diversidad de ambientes que pudieron haber estado presentes en luga-

res de baja altitud y cercanos a la costa pacífica de la Antártica. Esta provincia zoogeográfica puede explicar el avance hacia Suramérica de *Thinocoridae*, si es que se la considera como un corredor costero ininterrumpido hacia la Península Antártica y la zona austral de Suramérica.

Los eventos geológicos ocurridos a fines del Oligoceno (23-20 ma), tales como las transgresiones marinas en el este de la zona austral de Suramérica producto de un calentamiento global (ver gráfico de paleotemperaturas en Clarke y Johnston, 1996) o el inicio de la apertura del Estrecho Drake, podrían explicar una disyunción de la paleodistribución del ancestro de *Thinocoridae* en algún punto próximo a la Península Antártica o el extremo austral de Suramérica. Probablemente, el alza de la temperatura en este período, pudo haber provocado un recogimiento de los ambientes de tundra o estepa hacia zonas elevadas de la cadena montañosa del Arco de Escocia en la Península Antártica, o un repoblamiento de comunidades boscosas en el área. La consecuencia de esta discontinuidad en el ambiente del antepasado de *Thinocoridae* habría provocado el evento cladogenético que resultó en la divergencia de cada uno de los ancestros de *Attagis* y *Thinocorus*.

Probablemente, *Attagis* quedó restringida a la zona más fría, dado que los representantes actuales de este género permanecen en las zonas más elevadas en la Cordillera de los Andes (*Attagis gayi*) y restringida a la región más austral de Suramérica (*Attagis malouinus*). En cambio, *Thinocorus* muestra una tendencia más métrica hacia la calidez, habitando actualmente cerca de la

costa (*Thinocorus rumicivorus*) y en zonas no tan elevadas en la Cordillera de los Andes (*Thinocorus orbignyianus*), aunque la distribución de este género es bastante amplia abarcando también zonas frías.

En Australia, las condiciones de aridez y un clima más bien templado para el hábitat de *Pedionomus torquatus*, sugieren que el uso de este tipo de ambientes es un rasgo ancestral y la condición fría en *Attagis* corresponde a un rasgo derivado en la historia filogenética del grupo. Probablemente esta condición aparece como novedad evolutiva que permite el uso de nuevos ambientes. No obstante, para probar esta hipótesis son necesarios estudios ecofisiológicos que permitan identificar y determinar por qué y cómo se mantiene la distribución actual en estos dos géneros de Thinocoridae.

Después del alza en las paleotemperaturas de fines del Oligoceno y comienzos del Mioceno, la temperatura vuelve a bajar a los niveles del período anterior y las introgresiones marinas ocurridas principalmente en Suramérica se retiran. Esto podría interpretarse como un descenso en los niveles de los océanos circundantes y una restauración de la continuidad del hábitat para Thinocoridae. Es probable que en este período los dos géneros hayan superpuesto sus rangos de distribución, próximos a o en la Suramérica austral.

Finalmente, la glaciación oeste de la Antártica (14-11 ma) como consecuencia de la abertura del Estrecho Drake, cubrió gran parte o todo el continente de hielo, desplazando la fauna y flora hacia lugares que no tuvieran hielo en Suramérica. En esta época Thinocoridae habitó al menos en la región aus-

tral de Suramérica y la extensión hacia el norte de su rango de distribución dependió de la disponibilidad de áreas abiertas y cubiertas con vegetación del tipo tundra o estepa. Este tipo de ambiente pudo estar localizado cerca de la costa o en zonas elevadas del extremo sur de la Cordillera de los Andes, la cual iniciaba su levantamiento final.

Otro evento geológico importante posterior en la zona austral de Suramérica corresponde a una gran glaciación a fines del Mioceno, entre 7 y 4.6 ma (Mercer y Sutter, 1982). Este evento probablemente fragmentó nuevamente el rango de distribución de la fauna y flora en el extremo austral de Suramérica, afectando específicamente el linaje *Thinocorus*, lo suficiente como para que este taxon presentara un evento de especiación que dio lugar a la aparición de *T. orbignyianus* y *T. rumicivorus*. Además, el levantamiento del Cordón Andino junto con la expansión del ambiente de tundra ofreció un nuevo corredor por donde las cuatro especies de *Thinocoridae* se habrían dispersado hacia el norte. Esto explicaría el patrón de distribución actual de las especies de *Thinocoridae* en la Cordillera de los Andes (ver la Figura 1, página 4).

Al considerar la calibración en el gen rRNA 12S, la estimación de los tiempos absolutos de cada nodo concuerda con el modelo presentado anteriormente. La edad de los nodos *Pedionomidae-Thinocoridae* (39.5 ma), *Attagis-Thinocorus* (21.3-20.8 ma) y *T. orbignyianus-T. rumicivorus* (7.4-5.9 ma), se ajusta con la separación de Australia de la Antártica (38 ma), el calentamiento global e introgresiones marinas de fines del Oligoceno (23 ma) y la gran glacia-

### **k) Perspectivas de Investigación Futura**

Los árboles filogenéticos confeccionados a partir de caracteres neutros, como las secuencias nucleotídicas de DNA, proporcionan una estructura básica sobre la cual es posible proyectar los diferentes estados de un carácter en particular y falsificar hipótesis acerca de su evolución a través del tiempo. Por ejemplo, la hipótesis de que el carácter X fue influido por el carácter Y es falsificada si X se desarrolla antes que Y.

Sin duda, la filogenia de *Thinocoridae* ofrece una estructura sólida para investigar el modo de evolución de caracteres morfológicos, ecofisiológicos o conductuales. Esta aproximación podría responder, no sólo interrogantes ligadas a la misma evolución del carácter, sino también predecir las paleoecomorfologías de los ancestros hipotéticos y así completar el escenario filogenético histórico de las especies consideradas.

Por otra parte, la certeza de los árboles filogenéticos generados puede ser aumentada con el uso de modelos de evolución molecular específicos para cada gen en particular. La creación de estos modelos permite el desarrollo de esquemas de ponderación cada vez más sofisticados que optimizan el uso de la información filogenética disponible en las secuencias nucleotídicas de determinados genes.

El gen rRNA 12S ha resultado ser útil para investigar relaciones filogenéticas de origen Gondwánico, como es el caso de *Thinocoridae* y su grupo hermano *Pedionomidae*. Sin embargo, es necesario desarrollar un modelo de

evolución molecular para este gen y así restringir el análisis sólo a regiones que resulten ser más informativas dependiendo del problema filogenético examinado. Actualmente existen programas para ordenadores que son capaces de estimar la estructura secundaria de genes ribosomales, como el 12S. Sin embargo, es necesario a la vez contar con una filogenia bien establecida para decidir en función de uno u otro plegamiento de la molécula. No obstante, la falta de secuencias del gen rRNA 12S disponibles para estudios comparativos ha aplazado el desarrollo de estos modelos en las aves.

La filogenia de *Thinocoridae* es robusta dado el bajo número de especies que conforman este grupo de aves y la claridad de su patrón cladogenético, en donde la magnitud y disposición de las distancias entre los nodos no permiten agrupamientos alternativos. Por lo tanto, este grupo de *Charadriiformes* ofrece un marco filogenético apropiado para el desarrollo de modelos de evolución molecular de genes ribosomales como el 12S.

Finalmente, los estudios filogenéticos en otros grupos de aves con distribuciones intercontinentales en el hemisferio sur, como la de *Thinocoridae* y *Pedionomidae*, podrían incrementar la certeza de hipótesis de especiación por vicarianza debido a eventos geológicos como deriva de continentes, introgresiones de mares epicontinentales y glaciaciones ocurridas en los paleocontinentes australes. La escala de estudio que puede abordar la sistemática molecular es tal que, en principio, la evolución de las biotas puede ser examinada por esta disciplina, incluyendo la fauna y flora de grandes regiones biogeográ-

ficas.

## CONCLUSIONES

1. La filogenia de Thinocoridae, basada en las secuencias nucleotídicas de los genes mitocondriales citocromo *b* y rRNA 12S, es congruente con la primera hipótesis de trabajo. *Attagis* y *Thinocorus* son monofiléticos y el grupo hermano de Thinocoridae es Pedionomidae. Por lo tanto, la primera hipótesis de trabajo no es rechazada.
2. El árbol filogenético resultante presenta una alta certeza estadística en correspondencia con el conjunto de datos. En general, los valores de "bootstrap" son máximos (100). Además, la misma topología fue generada por tres métodos diferentes de reconstrucción filogenética en donde cada uno de ellos supone premisas diferentes para dar cuenta de la divergencia entre las secuencias examinadas.
3. Ambos genes mitocondriales, citocromo *b* y rRNA 12S, sujetos a diferentes restricciones moleculares, entregan la misma topología cuando se consideran separadamente o conjuntamente en el análisis.

4. Los eventos cladogenéticos en la filogenia de *Thinocoridae* son consecuencia de perturbaciones de gran escala que determinan efectos vicariantes a lo largo de la historia evolutiva de este grupo de aves. Tales eventos incluyen deriva de continentes, grandes introgresiones marinas, glaciaciones y eventos orogénicos ocurridos durante el Terciario en los últimos 40 ma. Por lo tanto, la segunda hipótesis nula no es rechazada.

5. La calibración del reloj molecular en el gen rRNA 12S, más la homogeneidad en las tasas de evolución molecular de *Struthioniformes* y *Charadriiformes*, sugiere que este gen evoluciona a una tasa menor que la descrita en mamíferos y salamandras. La calibración tradicional sería insostenible en términos biogeográficos. Sin embargo, es necesario obtener una mayor cantidad de secuencias nucleotídicas para probar esta hipótesis con un grado mayor de certeza.

## BIBLIOGRAFÍA

**Ahlquist, J. E., Bledsoe, A. H., Sheldon, F. H., and C. G. Sibley.** 1987. DNA hybridization and avian systematics. *The Auk*, **104**: 556-63.

**Arctander, P.** 1996. Comparison of a mitochondrial gene and a corresponding nuclear pseudogene. *Proc. R. Soc. Lond. B.* En prensa.

**Axelrod, D.** 1979. Desert vegetation, its age and origin. *In: Arid Land Resources*, Goodin J. R. and Northington D. K. eds. International center for arid and semi-arid land studies, Texas Tech University, Lubbock, Texas.

**Barret, P., Baillie, R., and E. Colbert.** 1968. Triassic amphibian from Antarctica. *Science*, **161**: 460-62.

**Bock, W. J. and A. McEvey.** 1969. Osteology of *Pedionomus torquatus* (Aves: Pedionomidae) and its allies. *Roy. Soc. Victoria, Proc.*, **82**: 187-232. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.

**Bonaparte, C.-L.** 1853. Classification ornithologique par séries. *Acad. Sci. (Paris), Comptes Rendus*, **37**: 641-47. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.

**Britten, R. J.** 1986. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science*, **231**: 1393-98.

**Brown, J. H. and A. C. Gibson.** 1983. Biogeography. Ediciones C. V. Mosby Company. USA.

**Brown, W. M., George, M., and A. C. Wilson.** 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1967-71.

**Cabot, E. L. and A. T. Beckenbach.** 1989. Simultaneous editing of multiple nucleic acid and protein sequences with ESEE. *Comp. Appl. Biol. Sci.*, **5**: 233-34.

**Caconne, A., Milinkovitch, M. C., Sborboni, V., and J. R. Powell.** 1994. Molecular biogeography: Using the Corsica-Sardinia microplate disjunction to calibrate mitochondrial rDNA evolutionary rates in mountain newts (*Euproctus*). *J. Evol. Biol.*, **7**: 227-45.

**Carroll, R. L.** 1988. Vertebrate Paleontology and Evolution. Ediciones W. H. Freeman and Company.

**Case, J. A.** 1988. Paleogene floras from Seymour Island, Antarctic Peninsula. *Geol. Soc. Am. Mem.*, **169**: 523-30. *In*: Hill, R. S. and L. J. Scriven. 1995. The angiosperm-dominated woody vegetation of Antarctica: a review. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **86**: 175-98.

**Case, J. A.** 1989. Antarctica: the effect of high latitude heterochroneity on the origin of the Australian marsupials. *In*: Hill, R. S. and L. J. Scriven. 1995. The angiosperm-dominated woody vegetation of Antarctica: a review. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **86**: 175-98.

**Cicero, C. and N. K. Johnson.** 1995. Speciation in sapsuckers (*Sphyrapicus*): III. Mitochondrial-DNA sequence divergence at the cytochrome *b* locus. *The Auk*, **112**: 547-63.

**Clarke, A. and I. A. Johnston.** 1996. Evolution and adaptive radiation of Antarctic fishes. *Tree*, **11**: 212-18.

**Collins, T. M., Wimberger, P. H., and G. J. P. Naylor.** 1994. Compositional bias, character-state bias and character-state reconstruction using parsimony. *Syst. Biol.*, **43**: 482-96.

**Collura, R. V. and C. -B. Stewart.** 1995. Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids. *Nature*, **378**: 485-89.

**Cracraft, J. and K. Helm-Bychowski.** 1991. Parsimony and phylogenetic inference using DNA sequences: Some methodological strategies. Pages 184-220 *in*: Phylogenetic Analysis of DNA sequences (M. M. Miyamoto and J. Cracraft eds.). Oxford Univ. Press, NY.

**Croizat, L., Nelson, G. J., and D. E. Rosen.** 1974. Centers of origin and related concepts. *Syst. Zool.*, **23**: 265-87.

**Chapman, F. M.** 1926. The Distribution of Bird-Life in Ecuador. A Contribution to a Study of the Origin of Andean Bird-Life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **LV**: 189-90.

**De Schauensee, R. M.** 1982. A Guide to the Birds of South America. Intercollegiate Press, Inc. USA. 498 páginas.

- Dean, A. D. and J. E. Greenwald.** 1995. Use of filtered pipet tips to elute DNA from agarose gels. *BioTechniques*, **18**: 980.
- Denton, G. H., Armstrong, R. L., and M. Stuiver.** 1971. The late Cenozoic glacial history of Antarctica. *In: The Late Cenozoic Glacial Ages*: 267-306. Turekian, K. K. ed. New Haven, Yale Univ. Press.
- Desjardins, P. and R. Morais.** 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J. Mol. Biol.*, **212**: 599-634.
- Edwards, S. V., Arctander, P., and A. C. Wilson.** 1991. Mitochondrial resolution of a deep branch in the genealogical tree for perching birds. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **243**: 99-107.
- Elliot, D., Colbert, E., Breed, W., Jensen, J., and J. Powell.** 1970. Triassic tetrapods from Antarctica: Evidence for continental drift. *Science*, **169**: 1197-202.
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, **17**: 368-76.
- Felsenstein, J.** 1992. PHYLIP: Phylogenetic inference package, version 4.0. University of Washington, Seattle.
- Fiedd, K. G., Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Ghiselin, M. T., Raff, E. C., Pace, N. R., and R. A. Raff.** 1988. Molecular phylogeny for the animal kingdom. *Science*, **239**: 748-53.
- Fürbringer, M.** 1888. Untersuchungen zur Morphologie und Systematik der Vögel. II. Allgemeiner Theil. Van Holkema, Amsterdam. 875 páginas. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.
- Gadow, H.** 1893. Vögel. II. Systematischer Theil. *In: Dr. H. G. Bronn's Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs*, **6**. 303 páginas. C. F. Winter, Leipzig. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.
- Garrod, A. H.** 1877. Notes on the anatomy and systematic position of the genera *Thinocorus* and *Attagis*. *Proc. Zool. Soc. London*, 1877: 413-18.
- Goodall, J. D., Johnson, A. W., and R. A. Philippi.** 1951. Las Aves de Chile. Su Conocimiento y sus Costumbres. Volumen II. Establecimientos Gráficos Platt. Buenos Aires. 445 páginas.
- Graybeal, A.** 1994. Evaluating the phylogenetic utility of genes: A search for genes informative about deep divergences among vertebrates. *Syst. Biol.*, **43**: 174-93.

**Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C., and H. F. Noller.** 1985. Comparative anatomy of 16-S-like ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acids Res.*, **32**: 155-215. *In*: Springer, M. S., Hollar, L. J., and A. Burk. 1995. Compensatory substitutions and the evolution of the mitochondrial 12S rRNA gene in mammals. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 1138-50.

**Harshman, J.** 1994. Rewaving the Tapestry: What can we learn from Sibley and Ahlquist (1990)? *The Auk*, **111**: 377-88.

**Harwood, D. M.** 1991. Cenozoic diatom biogeography in the southern high latitudes: Inferred biogeographic barriers and progressive endemism. *In*: Geological Evolution of Antarctica (Thomson, M. R. A., Crame, J. A., and Thomson, J. W., eds.), pages 667-73, Cambridge University Press.

**Hay, J. M., Ruvinsky, I., Hedges, S. B., and L. R. Maxson.** 1995. Phylogenetics relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. *Molec. Biol. Evol.*, **12**: 928-37.

**Hayman, P., Marchant, J., and T. Prater.** 1986. Shorebirds. An Identification Guide to the Waders of the World. Houghton Mifflin Company, Boston. 412 páginas.

**Hedges, S. B.** 1994. Molecular evidence for the origin of birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 2621-24.

**Hedges, S. B., Parker, P. H., Sibley, C. G., and S. Kumar.** 1996. Continental breakup and the ordinal diversification of birds and mammals. *Nature*, **381**: 226-29.

**Helm-Bychowski, K. and J. Cracraft.** 1993. Recovering phylogenetic signal from DNA sequences: Relationships within the corvine assemblage (Class Aves) as inferred from complete sequences of the mitochondrial DNA cytochrome-*b* gene. *Mol. Biol. Evol.*, **10**: 1196-214.

**Higgins, D. G., Bleasty, A. J., and R. Fuchs.** 1991. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. Ms submitted to *CABIOS*.

**Hill, R. S. and E. M. Truswell.** 1993. Nothofagus fossils in the Sirius Group, Transantarctic Mountains: Leaves and Pollen and their climatic implications. *In*: Hill, R. S. and L. J. Scriven. 1995. The angiosperm-dominated woody vegetation of Antarctica: a review. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **86**: 175-98.

**Hill, R. S. and L. J. Scriven.** 1995. The angiosperm-dominated woody vegetation of Antarctica: a review. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **86**: 175-98.

**Hillis, D. M. and C. Moritz.** 1990. An overview of applications of molecular systematics. *In*: Molecular Systematics, D. M. Hillis and C. Moritz eds. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.

**Hillis, D. M., Huelsenbeck, J. P., and C. W. Cunningham.** 1994. Application and

accuracy of molecular phylogenies. *Science*, **264**: 671-77.

**Howell, N.** 1989. Evolutionary conservation of protein regions in the protonmotive cytochrome *b* and their possible roles in redox catalysis. *J. Mol. Evol.*, **29**: 157-69.

**Huelsenbeck, J. P.** 1991. Tree-length distribution skewness: An indicator of phylogenetic information. *Syst. Zool.*, **40**: 257-70.

**Huxley, T. H.** 1867. On the classification of birds; and on the taxonomic value of the modifications of certain of the cranial bones observable in that class. *Zool. Soc. London, Proc.*, 1867: 415-72.

**Irwin, D. M., Kocher, T. D., and A. C. Wilson.** 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene in mammals. *J. Mol. Evol.*, **29**: 157-69.

**Kennett, J. P.** 1980. Paleoceanographic and biogeographic evolution of the southern oceans during the Cenozoic, and Cenozoic microfossil datums. *Palaeogeograph., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, **31**: 123-52. In: Zinsmeister, W. J. 1987. Cretaceous paleogeography of Antarctica. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **59**: 197-206.

**Kimura, M.** 1980. A simple model for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**: 111-20.

**Kimura, M.** 1986. DNA and the neutral theory. *Phil. Trans. R. Soc. London. B*, **312**: 343-54.

**Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., and A. C. Wilson.** 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6196-200.

**Krajewski, C. and J. W. Fetzner Jr.** 1994. Phylogeny of cranes (Gruiformes: Gruidae) based on cytochrome *b* DNA sequences. *The Auk*, **111**: 351-65.

**Kraus, F. and M. M. Miyamoto.** 1991. Rapid cladogenesis among the pecoran ruminants: Evidence from mitochondrial DNA sequences. *Syst. Zool.*, **40**: 117-30.

**Kumar, S., Tamura, K., and M. Nei.** 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 1.0, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.

**Kvasov, D. D. and M. Verbitski.** 1981. Cause of antarctic glaciation in the Cenozoic. *Quaternary Research*, **15**: 1-164.

**Li, W. -H., Tanimura, M., and P. M. Sharp.** 1987. An evaluation of the molecular clock hypothesis using mammalian mtDNA sequences. *J. Mol. Evol.*, **25**: 330-42.

- Li, W. -H. and D. Graur.** 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Lilljeborg, W.** 1866. Outline of a systematic review of the class of birds. *Zool. Soc. London, Proc.*, 1866: 5-20.
- Llewellyn, L. C.** 1974. Recent observations on the Plains-wanderer, with a review of its past and present status. *Emu*, **75**: 137-42.
- Lockhart, P. J., Steel, M. A., Hendy, M. D., and D. Penny.** 1994. Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, **11**: 605-12.
- Lowe, P. R.** 1923. Notes on the systematic position of *Ortyxellus*, together with some remarks on the relationships of the Turnicomorphs and the position of the seed-snipe (Thinocoridae) and Sandgrouse. *Ibis*, **65**: 276-99.
- Mackinnon, D. I.** 1987. The influence of Australasian-Antarctic plate tectonics and palaeoceanographic development on the morphology and inferred life habits of New Zealand neogene brachiopods. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **58**: 63-73.
- Maclean, G. L.** 1969. A Study of SeedSnipe in Southern South America. *Living Bird*, **8**: 33-80.
- McDowall, R. M.** 1978. Generalized tracks and dispersal in biogeography. *Syst. Zool.*, **27**: 88-104.
- Martin, A. P.** 1995. Metabolic rate and directional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 1124-31.
- Martin, A. P., Naylor, G. J. P., and S. R. Palumbi.** 1992. Rates of mtDNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*, **357**: 153-55.
- Martin, A. P. and S. R. Palumbi.** 1993. Protein evolution in different cellular environments: Cytochrome *b* in sharks and mammals. *Mol. Biol. Evol.*, **10**: 873-91.
- Mathews, G. M. and T. Iredale.** 1921. Orders Casuarii to Columbae. A manual of the birds of Australia, volumen 1. H., F., and G. Witherby, London. 279 páginas. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.
- Mayr, E. and D. Amadon.** 1951. A classification of recent birds. *Amer. Mus. Novitates*, **1496**. 42 páginas. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.

- Mercer, J. H. and J. F. Sutter.** 1982. Late Miocene-earliest Pliocene glaciation in southern Argentina: Implications for global ice-sheet history. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **38**: 185-206.
- Mindell, D. P., Knight, A., Baer, C., and C. J. Huddleston.** 1996. Slow rates of molecular evolution in birds and the metabolic rate and body temperature hypothesis. *Mol. Biol. Evol.*, **13**: 422-26.
- Mitchell, P. C.** 1905. On the anatomy of limicoline birds; with special reference to the correlation of modifications. *Zool. Soc. London, Proc.*, 1905: 155-69.
- Monge-Najera, J.** 1995. Phylogeny, biogeography and reproductive trends in the Onychophora. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **114**: 21-60.
- Naylor, G. J. P., Collins, T. M., and W. M. Brown.** 1995. Hydrophobicity and phylogeny. *Nature*, **373**: 565-66.
- Noller, H. F.** 1984. Structure of ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **53**: 119-62. In: Springer, M. S., Hollar, L. J., and A. Burk. 1995. Compensatory substitutions and the evolution of the mitochondrial 12S rRNA gene in mammals. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 1138-50.
- Olsen, G. J., Matsuda, H., Hagstrom, R., and Overbeek, R.** 1994. fastDNAm1: A tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.*, **10**: 41-48.
- Olson, S. L. and D. W. Steadman.** 1981. The Relationships of the Pedionomidae (Aves: Charadriiformes). *Smithsonian Contributions to Zoology*, **337**. 25 páginas.
- Philippi, R. A.** 1964. Catálogo de las Aves de Chile con su Distribución Geográfica. *Investigaciones Zoológicas Chilenas*, volumen XI. Universidad de Chile, Santiago. 179 páginas.
- Platnick, N. I. and G. Nelson.** 1978. A method of analysis for historical biogeography. *Syst. Zool.*, **27**: 1-16.
- Rand, D. M.** 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Tree*, **9**: 125-31.
- Ridley, M.** 1993. *Evolution*. Publicaciones Científicas Blackwell. USA.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., and H. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-91.
- Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The "Neighbor-Joining" method: A method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**: 406-25.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor LA. Press, Plainview, NY.

**Sanger, P., Nicklen, S. A., and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-67.

**Seebohm, H.** 1888. The geographical distribution of the family Charadriidae, or the plovers, sandpipers, snipes, and their allies. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.

**Sharpe, R. B.** 1891. A review of recent attempts to classify birds; an address delivered before the Second International Ornithological Congress... 1891. Budapest. 90 páginas. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.

**Shields, G. F. and N. A. Straus.** 1975. DNA-DNA hybridization studies of birds. *Evolution*, **29**: 159-66.

**Shields, G. F. and A. C. Wilson.** 1987. Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *J. Mol. Evol.*, **24**: 212-17.

**Shufeldt, R. W.** 1891. Contributions to the comparative osteology of Arctic and sub-Arctic waterbirds. Part IX. *J. Anat. Physiol.*, **25**: 509-25. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.

**Sibley, C. G., Corbin, K. W., and J. E. Ahlquist.** 1968. The relationships of the seed-snipe (Thinocoridae) as indicated by their egg white proteins and hemoglobins. *Bonn. Zool. Beitr.*, **19**: 235-48.

**Sibley, C. G. and J. E. Ahlquist.** 1972. *A Comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*. Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History. Yale University.

**Sibley, C. G. and J. E. Ahlquist.** 1983. The phylogeny and classification of birds based on the data of DNA-DNA hybridization. *In: Current Ornithology 1*: 245-92 (R. F. Johnston ed.). New York and London, Plenum Press.

**Sibley, C. G., Ahlquist, J. E., and B. L. Monroe Jr.** 1988. A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies. *The Auk*, **105**: 409-23.

**Sibley, C. G. and J. E. Ahlquist.** 1990. *Phylogeny and Classification of Birds. A Study in Molecular Evolution*. Yale University Press, New Haven and London.

**Sidow, A. and A. C. Wilson.** 1991. Compositional statistics evaluated by computer simulations. Pages 129-46 *in: Phylogenetic Analysis of DNA sequences* (M. M.

Miyamoto and J. Cracraft eds.). Oxford Univ. Press, NY.

**Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., and P. Flook.** 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **87**: 651-701.

**Solbrig, O.** 1976. The origin and floristic affinities of the South American temperate desert and semidesert regions. *In: Evolution of Desert Biota*, Goodall D. W. ed. University Texas Press, Austin, Texas.

**Springer, M. S., Hollar, L. J., and A. Burk.** 1995. Compensatory substitutions and the evolution of the mitochondrial 12S rRNA gene in mammals. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 1138-50.

**Stresemann, E.** 1927-34. Aves. *In: W. Kükenthal and Th. Krumbach eds. Handbuch der Zoologie*, 7. Berlin. 899 páginas. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.

**Stresemann, E. and V. Stresemann.** 1966. Die Mauser der Vögel. *J. Orn.*, **107**, Suppl. 448 páginas. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.

**Sullivan, J., Holsinger, K. E., and C. Simon.** 1995. Among-site rate variation and phylogenetic analysis of 12S rRNA in sigmodontine rodents. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 988-1001.

**Swofford, D. L.** 1993. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.0. Illinois Natural History Survey, Champaign.

**Takezaki, N., Rzhetsky, A., and M. Nei.** 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 823-33.

**Uliana, M. and K. Biddle.** 1988. Mesozoic-Cenozoic paleogeographic and geodynamic evolution of southern South America. *Rev. Brasileira Geoc.*, **18**: 172-90.

**Venegas, C. y J. Jory.** 1979. Guía de Campo para las Aves de Magallanes. Publicaciones del Instituto de la Patagonia. Serie Monografías, 11. Punta Arenas, Magallanes. 253 páginas.

**Verheyen, R.** 1961. A new classification for the non-passerine birds of the world. *Inst. Roy. Sci. Natur. Belgique, Bull.*, **37**. 36 páginas. *In: A comparative Study of the Egg White Proteins of Non-Passerine Birds*, C. G. Sibley and J. E. Ahlquist, Bulletin 39. Peabody Museum of Natural History, Yale University.

**Wetmore, A.** 1960. A classification for the birds of the world. *Smithson. Misc. Coll.*, **139**: 1-37.

**Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D., and M. Stoneking.** 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Lin. Soc.*, **26**: 375-400.

**Wu, C. -I. and W. -H. Li.** 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1741-45.

**Zharkikh, A. and W. -H. Li.** 1993. Inconsistency of the maximum-parsimony method: The case of five taxa with a molecular clock. *Syst. Biol.*, **42**: 113-25.

## APÉNDICE A

Secuencias del gen citocromo *b*. Cada sitio está enumerado del 1 al 1,044. Los puntos representan igualdad de nucleótidos respecto a la primera secuencia que corresponde a la de *Chionis minor*.













## APÉNDICE B

Secuencias del gen rRNA 12S. Los sitios están enumerados del 1 al 408 incluyendo los intervalos. Los puntos representan igualdad de nucleótidos respecto a la primera secuencia que corresponde a la de *Chionis minor*.





