Contents

Introducción general

Este libro ha sido pensado como uno de los tantos soportes posibles para las clases de sistemática de nivel básico y avanzado, además de servir de repaso a conceptos teóricos generales *pero* sobre la base empírica, y no como **reemplazo** de los libros básicos o avanzados sobre análisis filogenético.

¿Cómo está estructurado este manual?

El libro consta de 12 secciones que van desde manejo de caracteres, pasando por editores de matrices y árboles a búsquedas tanto para análisis de parsimonia y máxima verosimilitud (ML), como para análisis bayesiano. En todos los casos se presentan las técnicas, la metodología a seguir, los programas de cómputo a usar (y sus `comandos`), además de una serie de preguntas sobre la práctica o en general sobre la técnica. La literatura recomendada es una sugerencia de lecturas, desde el punto de vista de los autores, críticas, pero obviamente no cubre todos los artículos posibles; exploraciones constantes de revistas como *Cladistics*, *Systematic Biology*, *Zoologica Scripta* o *Molecular Phylogenetics and Evolution* y similares, actualizarían las perspectivas aquí presentadas. Al final se presenta un capítulo que trata sobre los programas usados, que se espera funcione como una guia rápida para el uso de los mismos pero que no reemplaza al manual.

A lo largo del libro se utiliza una tipografía consistente para indicar el nombre de los progra-

mas (v.g., TNT , Component), las instrucciones que deben ser escritas en los programas de línea de comando, por ejemplo:
> `mult=replic 10;` y las instrucciones que se acceden mediante un menú o un cuadro de dialogo en los programas de interfaz gráfica (v.g., **Analize/heuristics**).

El orden de los capítulos obedece a la estrategia de enseñanza de la UIS pero el manual puede ser seguido en otros órdenes, por ejemplo todo sobre caracteres, excluyendo alineamiento, seguido de búsquedas incluida la búsqueda del modelo, consensos y por último soporte y al final discutir alineamiento.
Usted podrá encontrar material adicional, los datos, algunos macros para los distintos programas y demás chismes en el sitio web del laboratorio de Sistemática & Biogeografía (LSB) de la UIS, en la dirección: http://tux.uis.edu.co/labsist.

Público objeto

Se espera que el usuario de este manual tenga conocimientos básicos, o que esté tomando un curso formal de sistemática filogenética a nivel de pre o posgrado. No se esperan características especiales en cuanto a dominio de computadores, pero el manejo de un editor de texto que permita grabar archivos sin formato es *muy* recomendable, además de manejar el entorno de línea de comandos, el cual es usado en una gran cantidad de programas. Los usuarios pueden trabajar en cualquier plataforma desde Linux a MacOSX, pasando por Windows; en general se citan los programas apropiados para cada plataforma.

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, en particular a la Escuela de Biología. A los estudiantes del programa de pregrado de la escuela de Biología de la UIS (Universidad Industrial de Santander) estudiantes profundización

a Viviana por reescribir el capítulo de búsquedas

.

Selección de caracteres

Introducción

En un análisis filogenético cladístico es necesario identificar y usar caracteres homólogos, de hecho, la importancia de los caracteres es tal que Hennig (1968) se refería a los especímenes estudiados como semaforontes (**o los que llevan caracteres**). Aún a pesar del papel central del concepto de carácter, la definición no es tan fácil.

Richards señala que el término **carácter** no está bien definido (Richards, 2003) y que su reconocimiento depende en gran parte del entrenamiento del taxónomo (Richards, 2002). Es por eso que la mayoría de las ocasiones se enfatiza en la importancia de un **análisis de caracteres** profundo y concienzudo (v.g., Hennig, 1968; Neff, 1986; Rieppel & Kearny, 2001)[1].

Las ideas de carácter y homología usadas aquí son independientes del tipo de caracteres usados, pero es mucho más sencillo presentar la discusión en términos de caracteres morfológicos. Más adelante se tratará directamente el tema de los caracteres moleculares.

Aunque no existe una fórmula mágica para reconocer caracteres homólogos, la principal idea es la similitud "especial", basada en la definición de homología como **similar por ancestría común** (Rieppel & Kearny, 2001; *contra* Kluge 2002, Grant & Kluge, 2004). Por similitud no debe entenderse solo el parecido general, sino que existe una correlación estructural y de

[1] Este análisis de caracteres también implica revisar las afirmaciones cuatitativas o cualitativas hechas, ver Wiens 2001

posición (la similitud y conjunción en el sentido de Patterson, 1981) del carácter en los taxa comparados.

Por ejemplo, los brazos humanos, las alas de los murciélagos y las patas de los caballos presentan una estructura ósea muy similar, con diversos huesos colocados en las mismas posiciones, y en general el miembro completo está en la misma posición con respecto al cuerpo en los tres taxa, aunque sus formas son muy diferentes.

Otro factor importante a tener en cuenta son los "grados" o niveles de generalidad de homología. Es decir, que una estructura es homóloga con otra en un cierto grado, pero no comparable con ella en otro. Por ejemplo, artrópodos y vertebrados comparten la cefalización y el tener miembros pareados. Comparar directamente esas estructuras no es apropiado, aunque es posible que sean homólogas a nivel molecular, donde los mismos genes controlan el desarrollo de estas estructuras, pero la larga historia independiente de cada linaje hace imposible una comparación de las estructuras como homologías, aunque no prohibe una comparación funcional.

Es importante recalcar que cuando alguien compara los caracteres de diferentes taxa, hace una inferencia fuerte sobre los caracteres: se trata del mismo carácter en los taxa; es decir, da una identidad histórica al carácter al hacerlo el mismo carácter por homología, aunque estén modificados los distintos estados (Hennig, 1968; Kluge, 2002). Esto es lo que le da soporte al uso de la congruencia de caracteres para descubrir las sinapomorfías que le dan identidad histórica a los grupos supraespecíficos.

La selección y observación de caracteres, no solo morfológicos, es un trabajo que sólo se aprende mediante el trabajo continuo con los datos derivados de los especímenes en el laboratorio y con una lectura crítica de la literatura sobre el grupo. Es importante que usted pueda reconocer cuándo los caracteres usados en una descripción, una clave o un análisis filogenético cumplen o no con el requisito de la identidad histórica.

Algunos libros de texto sistemática, presentan distintos criterios de reconocimiento de caracteres (por ejemplo Hennig, 1968; Wiley & Lieberman 2011), aunque no es posible plantear reglas estrictas o situaciones de casos perfectos, eso no es un motivo para suponer que los caracteres morfológicos carecen de base conceptual y por ello deben ser excluidos del análisis (*contra* Scotland et al., 2003).

Existen algunos criterios básicos aplicables en general a los caracteres: para cada carácter se reconocen diversos estados alternativos de ese carácter, los cuales son llamados estados de carácter o simplemente estados. Es posible que un carácter no sea aplicable a todos los organismos de estudio, pero dentro de los organismos donde es aplicable, los estados de un carácter deben dividir el universo en al menos dos grupos mutuamente excluyentes, cada uno de ellos reconocible por un estado de caracter.

Dado que se tratan los caracteres como identidades históricas, se debe ser cuidadoso con **NO** crear estados de carácter que sirvan como "cajas de basura". Por ejemplo, en el carácter "color: (a) rojo; (b) otro color", el estado (b) es ambiguo y puede contener individuos de diferentes colores, cuya única (falsa) similitud sea que no poseen el color rojo, pero no existe una identidad histórica defendible, es decir el NO color rojo se ha generado desde múltiples ancestros.

Todos los estados del carácter deben representar una unidad histórica, independientemente de si el estado es el apomórfico o el plesiomórfico. Siempre que encuentre un carácter donde uno de los estados está definido como negación (incluidas las ausencias), debe revisar cuidadosamente que el estado "negativo" indique claramente una unidad.

Cuando los caracteres solo tienen dos estados, no es necesaria ninguna suposición sobre la "dirección del cambio"; sin embargo, cuando hay más de dos estados, la dirección es una pregunta importante. Algunos caracteres simplemente no dan posibilidad de escoger una dirección particular (por ejemplo, las bases nucleotídicas), por lo cual son caracteres no

ordenados. Bajo una posición, uno puede asignar un posible orden a los caracteres que se leen como diversos grados de homología, sin asumir nada sobre el proceso evolutivo, por ejemplo, el caracter:
Pilosidad en la pata:

0. solo en el extremo anterior
1. hasta la mitad
2. todal a superficie
3. toda la pata y con presencia de pelos más largos en el extremo posterior

podría ordenarse desde 0 hasta 3 (hacerlo aditivo) para reflejar que existe un mayor grado de homología entre, por ejemplo, el estado 2 y 3, que 1 y 3. La otra posición no privilegiará ningún cambio con respecto a otro y la dirección se asignaría por la congruencia con otros caracteres (el carácter es no aditivo).
En otros casos, la identidad histórica es difícil de apreciar; por ejemplo, "transparentable con KOH: (a) sí, (b) no", suponiendo que el estado (b) no es problemático, el carácter como un todo parece ser más un artefacto de laboratorio que una propiedad heredable del organismo. En esa misma línea están caracteres como "número de componentes en PCA: (a) uno; (b) dos".
Al tratarse los estados de caracter como alternativas, un mismo organismo no puede poseer dos estados o más estados del mismo carácter: para nuestra visión de homología de las alas y los miembros anteriores, no pueden existir ángeles o centauros, con dos versiones diferentes del miembro anterior en el mismo organismo. Este es el criterio de "conjunción" de Patterson. sin embargo, hay que tener en cuenta que existen homologías seriadas que **contradicen** esta idea, no solo en organismos segmentados como anélidos y artrópodos, sino en otros donde la segmentación no es clara (e.g., hojas de las plantas, pelos de los mamíferos, etc.). El criterio

de conjunción de Patterson es un llamado al reconocimiento de las estructuras que se usan como caracteres en el análisis filogenético.

Técnicas

Use el dibujo al final de la práctica el cúal corresponde a la figura 1 en Sokal (1983). Los "organismos" son caminánculos, seres hipotéticos creados por J. Camin para estudios sobre clasificaciones en fenética.[2] A partir de los dibujos:

1. Elabore una pequeña guía morfológica de los organismos, de modo que pueda diferenciar las diferentes estructuras en los diferentes organismos (en buen romance significa poner nombres a sus organismos y ligar tales nombres a estructuras fácilmente reconocibles; el ejercicio más cercano en un análisis para separar por **morfos** sus organismos).

2. Elabore un listado de los diferentes caracteres de los organismos, reconozca al menos 5 caracteres únicos y 5 compartidos. Anote en una hoja separada los organismos y sus estados.

3. Intercambie su listado (acompañado de la guía morfológica y los nombres de los organismos) con un compañero:

   (a) Trate de reconocer los caracteres que su compañero describió, y anote cúales organismos poseen esos caracteres.

   (b) En caso de ser necesario, re-escriba los caracteres de su compañero e indique la razón de sus cambios.

4. Compare la lista de caracteres por organismos que usted realizó con la que su compañero re-escribio.

[2] Copyright, Society of Systematic Biologists, se reproduce con permiso

Pregunta(s)

1. Haga un ejercicio crítico de los caracteres de sus compañeros:

   (a) ¿están bien definidos?

   (b) ¿hay implícita una transformación?

   (c) ¿usaron de la misma forma la similaridad?

2. Trate de localizar los motivos de sus aciertos y fallas cuando trabajó con los caracteres de su compañero. ¿Son esos motivos consistentes con la crítica a los caracteres?

3. Evalúe la crítica de su compañero a sus caracteres: ¿es posible reescribir los caracteres para mejorarlos? Si así lo cree, reescríbalos; en caso contrario, dé argumentos para desechar el carácter o para mantener su definición actual.

1. Haga un ejercicio crítico de los caracteres de sus compañeros:

(a) ¿están bien definidos?

(b) ¿hay implícita una transformación?

(c) ¿usaron de la misma forma la similaridad?

2. Trate de localizar los motivos de sus aciertos y fallas cuando trabajó con los caracteres de su compañero. ¿Son esos motivos consistentes con la crítica a los caracteres?

3. Evalúe la crítica de su compañero a sus caracteres: ¿es posible reescribir los caracteres para mejorarlos? Si así lo cree, reescríbalos; en caso contrario, dé argumentos para desechar el carácter o para mantener su definición actual.

Preguntas Generales

1. Use la literatura de la que disponga sobre un grupo en particular, trate de evaluar los caracteres presentes y hágase preguntas similares a las que realizó cuando examinó los caracteres de sus compañeros.

2. Si es posible, trate de usar y contrastar un análisis filogenético con una descripción tradicional del mismo grupo.

3. Pleijel (1995) argumentó que los únicos caracteres válidos son las presencias, por lo que todos los caracteres son una enumeración de presencia/ausencia (no hay **estados de carácter**), trate de identificar las posibles ventajas y falencias de esa aproximación.

4. Lea el artículo de Goloboff et al., 2006 e identifique la forma como se manejan los caracteres cuantitatívos. ¿usan un esquema similar al usado para los caracteres discretos?

1. Use la literatura de la que disponga sobre un grupo en particular, trate de evaluar los caracteres presentes y hágase preguntas similares a las que realizó cuando examinó los caracteres de sus compañeros.

2. Si es posible, trate de usar y contrastar un análisis filogenético con una descripción tradicional del mismo grupo.

3. Pleijel (1995) argumentó que los únicos caracteres válidos son las presencias, por lo que todos los caracteres son una enumeración de presencia/ausencia (no hay estados de carácter), trate de identificar las posibles ventajas y falencias de esa aproximación.

4. Lea el artículo de Goloboff et al., 2006 e identifique la forma como se mane-

Literatura recomendada

de Pinna (1991) [Ofrece una visión a la formulación de los caracteres].

Kluge, 2003 [Una crítica al uso de la **similitud** como criterio de selección de caracteres].

Neff, 1986 [Una normalización del análisis de caracteres].

Patterson, 1982 [La **verdadera prueba de homología**].

Platnick, 1979 [Un artículo clásico sobre la jerarquía -cladismo de patrón-, tanto de caracteres como de taxa].

Pleijel, 1995 [Una visión al manejo de caracteres, diferente a la ofrecida aquí].

Rieppel & Kearny, 2002 [Una visión crítica y extensa de la selección de caracteres, con ejemplos empíricos].

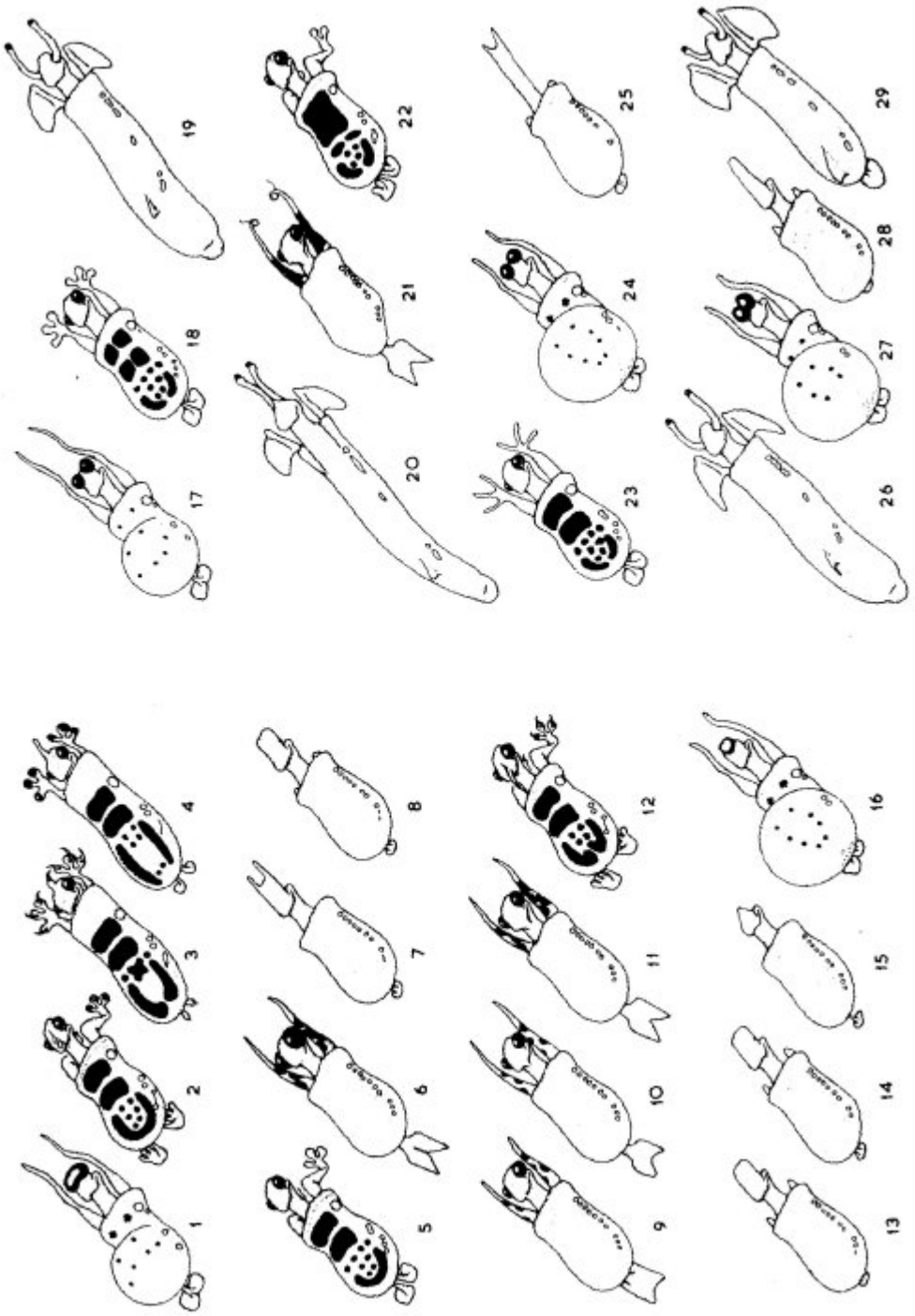


Figure 1.1: Los Caminículos, tomado de Sokal (1983)

Matrices de datos

Introducción

Una de las diferencias más importantes entre los trabajos taxonómicos con un enfoque **clásico** y los análisis filogenéticos es que estos últimos incluyen explícitamente una matriz de datos donde se puede evidenciar los caracteres examinados, y cómo fueron interpretados.

Básicamente, la matriz de datos es una lista tabulada de las observaciones realizadas de los caracteres en los distintos taxa. Para facilitar su lectura y su uso en programas de análisis filogenético, los caracteres y sus estados son codificados como números o como letras. Una vez construida, la matriz es el punto de partida para la búsqueda de árboles y la manera más sencilla con la que otros investigadores pueden recuperar la información recopilada durante el **análisis de caracteres**[1].

Tal y como se hizo en la práctica sobre selección de caracteres, lo que se busca es que el investigador sea consistente en la codificación de los caracteres, lo cual es importante en el manejo de caracteres inaplicables y no observados. Algunos autores los codifican de diferentes formas en la matriz (usualmente, con **-** y **?**) para facilitar la recuperación de información (puede encontrar una discusión más completa en Strong & Lipscomb, 1999), otros autores, y

[1] si desea puede ver nuestra visión ampliada en Miranda et al., 2004.

en general los programas, no reconocen diferencia entre unos y otros, mientras que programas como TNT o Poy pueden reconocer como un quinto caracter los eventos de in-del o gaps (Giribet & Wheeler, 1999).

Cuando se usan caracteres con múltiples estados, es necesario clarificar cuáles fueron usados como aditivos y cuáles como no aditivos, o en el caso de haber sido recodificados, como se hizo esa codificación. Si se han codificado como aditivos, se debe indicar el ¿por qué? de tal codificación e incluir los argumentos que muestren que los estados de carácter se hallan anidados entre sí.

Técnicas

Existen diferentes programas para manipular matrices de datos y árboles. Algunos de ellos permiten la interacción matriz-árbol (WinClada [2], Mesquite [3], MacClade [4], R [5] o Seaview), y otros solo utilizan matrices (NDE). En su mayoría estos programas sirven de plataforma para manejar programas que realizan el análisis filogenético como tal. Muchos de los programas que manejan matrices están diseñados básicamente para algún tipo particular de datos (por ejemplo, ADN) y aquellos que tienen un marco amplio se quedan cortos para manejar cierta clase de información (por ejemplo, no interpretan la codificación IUPAC para polimorfismos de ADN).

Los programas pueden leer uno o varios formatos de archivos, pero solo algunos programas

[2] `www.cladistics.com`

[3] `www.mesquite.org`

[4] el programa no corre en versiones de MacOS X superiores a 10.6 (desde Lion en adelante)

[5] R es uno de los programas para anális estadístico más versatiles del momento, además de ser gratuito permite la implementación de múltiples procesos de álculo, de tal manera que es posible realizar distintos tipos de operaciones y cálculos desde estadistica básica hasta análisis en evolución; sirve de plataforma para ape (Paradis et al., 2008), un módulo que permite distintas acciones con matrices y árboles `cran.r-project.org`

como Mesquite leen y escriben todos los formatos de datos; es importante revisar la compatibilidad de los programas para el manejo de archivos. En la mayoría de ellos es posible exportar entre los diferentes tipos de datos, o por lo menos entre los más usados. En general, la mayor parte de los programas trabaja bien con el formato NEXUS (Maddison, et al., 1997), tanto para exportar como para importar, aunque el formato es en ocasiones muy diferente y algunos programas pueden no identificarlo correctamente. El otro formato importante es el de Hennig86/NONA, pero en muchos programas, especialmente moleculares, su uso no está implementado.

Revise siempre la documentación del programa que desea usar y así podrá estar seguro si el programa que va a utilizar cumple con los requisitos que usted necesita y cual es el formato de las matrices.

Existen listas de programas para análisis filogenético que pueden ser consultadas en internet, por ejemplo:

`http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html`

o en

`http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/software/`

Técnicas

Abra el archivo de datos morfológicos para vertebrados **"datos.vertebrados.xls"** con un programa para hojas de cálculo y manuipule las matrices con WinClada , Mesquite o TNT para Windows:

1. Anote cuáles caracteres son multiestado y cuáles son binarios.

2. Identifique si hay o no caracteres aditivos.

3. A partir de los datos, construya una matriz nueva (en TNT para Windows use el menu **Data - edit data**).

4. Dado que los programas no cuentan con opciones de salvado automático, periódicamente salve la matriz.

5. Nomine los terminales y los caracteres y sus estados. Explore diferentes formas de llevar esa tarea a cabo.

6. Suponga que algunos autores consideran que las plumas son escamas modificadas. Aceptando esa información, recodifique la matriz y determine si el carácter es aditivo o no.

7. Seleccione el último carácter y colóquelo al principio de la matriz.

8. Introduzca un carácter nuevo en la posición 4.

9. Exporte la matriz en otros formatos, NEXUS si está usando WinClada , Hennig86/Nona si está usando Mesquite .

10. Verifique la compatibilidad de los datos, abriendo la matriz en el programa correspondiente.

11. Revise con un editor de texto los archivos que usted creó, trate de identificar cuáles son las partes claves del formato[6].

12. Abra una de las matrices moleculares en cada programa y con un editor de texto y trate de identificar en qué se diferencia de la matriz morfológica.

13. en R:

[6] Aunque en general no se usan los editores de texto, este paso es crítico para después ser capaz de rastrear los problemas que pueden tener las matrices de datos.

- Instale en su ordenador la versión más reciente de R ($\geq$ 3.00-11).
- Carge las bibliotecas ***ape*** y ***phangorn*** [7]:

  > `library(ape)`

  > `library(phangorn)`

- En caso de no tenerlas disponibles primero bajelas con la instrucción:

  > `install.packages(c(´´ape´´,´´phangorn´´), dependencies=T)` [8]

- Abra la matriz de datos en formato de texto simple y asignela a un objeto de R:

  > `datos <- read.table(´´matriz.txt´´)`

- Revise los nombres de las variables en la matriz con

  > `names(datos)`

- Revise los nombres de las terminales en la matriz con

  > `row.names(datos)`

- Abra la matriz de datos en formato `phylip` y asignela a un objeto de R:

  > `datos.Phylip <- read.phyDat(´´DNA1.phy´´, format=´´phylip´´, type=´´DNA´´)`

- Escriba en formato `Nexus` la matriz leida anteriomente:

  > `write.nexus.data(datos.Phylip,file=´´NuevaDNA1.nex´´)`

- Abra la matriz escrita con Winclada o Mesquite y revise la conversión.

[7] La biblioteca ***phangorn*** está diseñada para análisis filogenéticos que tiene como objetivo estimar árboles y redes, utilizando diferentes métodos como máxima verosimilitud, parsimonia, distancia y conjugación de Handamard. Requiere las bibliotecas "ape" y "rgl", y puede ser descargado desde `http://cran.r-project.org/web/packages/phangorn/index.html`

[8] La función ***install.packages("Nombre_paquete")*** permite hacer la descarga de los paquetes directamente del repositorio desde el entorno de R. También es posible hacer la descarga directamente de la pagina web e instalarlo desde cualquier directorio en el ordenador dando directamente la ruta a dicho sitio:
> `install.packages ("../usuario/R/Packages/Paquete.tar.gz")`
Tenga en cuenta que de este modo deberá descargar e instalar todas las dependencias requeridas por el paquete de manera independiente. El comando library() le permitirá cargar el paquete en el entorno de R para poder empezar a trabajar con todas sus utilidades.

14. En el directorio de datos existen dos matrices con distintos problemas **"problema1.txt"** y **"problema2.txt"**, intente abrir las matrices, busque y corrija el error.[9]

Dependiendo de la plataforma que trabaje, usted tiene disponible distintos programas. Mesquite y R son programas gratuitos y válidos para todas las plataformas pero en general las búsquedas no son eficientes, aunque le permiten trabajar con varios tipos de datos e inreractuar directa o indirectamente con programas como PAUP , TNT o PhyML . Sobre Windows usted cuenta con WinClada que funciona tanto en modo de manejo de edición de matrices (**windada**) como en modo de edición y manipulación de árboles; además, le permite hacer búsquedas con NONA, también puede usar la versión de Windows de TNT que tiene interface gráfica. Si usa Mac una opción es McClade , el cual funciona como Mesquite pero es más veloz y eficiente, aunque es muy factible que no lo pueda usar con la versión actual de Mac OS X.

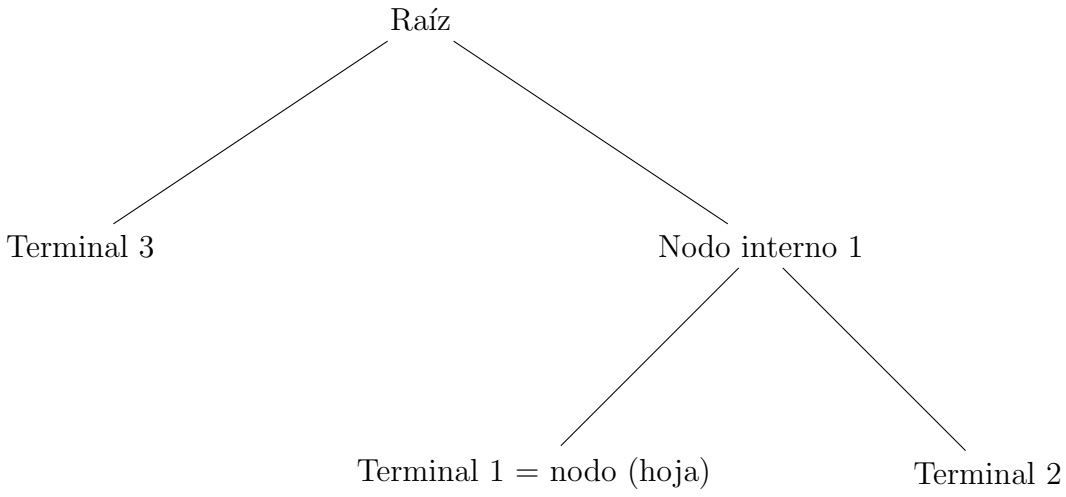
Revise la sección de Programas de cómputo para ver los comandos que utilizaría con un programa distinto a Winclada/NONA . En todos los casos familiarícese con los menús e instrucciones para abrir/cerrar y editar tanto matrices como árboles, tenga en cuenta que los manuales de los programas traen información adicional, por lo tanto su lectura es una muy buena opción.

[9] tradicionalmente, las terminaciones de los archivos son .ss en WinClada , .nex con Mesquite o MacClade , pero **debe** recordar que el formato no es la terminación del archivo.

Árboles

Introducción

Una vez finalizado un análisis filogenético, el resultado es un agrupamiento que tradicionalmente se dibuja como un árbol donde los taxa usados estan como *hojas* o *terminales* del árbol. Las diferentes ramas se unen en *nodos* o *componentes*. Así, el agrupamiento ((Terminal 1, Terminal 2), Terminal 3) puede representarse con el árbol:



Es importante diferenciar entre el **contenido** del nodo, que son los terminales que forman el nodo (el nodo interno 1 tiene dos terminales: 1 y 2), y la **información** del nodo, que es cómo están organizados estos terminales en terminos de grupos o clados anidados (Nelson, 1979). En general, para muchos autores un componente representa un grupo monofilético (i.e., definición *topológica* de monofilia).

En cladística, los árboles son también conocidos como **cladogramas** y el término es usado sin distinción. En cladística (pero no en otras metodologías) los cladogramas deben tener transformaciones de caracteres en nodos (nodos soportados), en caso de no tener transformaciones, el nodo no está soportado o es un nodo de longitud cero, es decir, es un artefacto de los programas usados para obtener los árboles (véase Coddington & Scharff, 1994; Goloboff, 1998). El número de transformaciones es un estadístico importante que hay que tener en cuenta y se usa como criterio para seleccionar entre diferentes cladogramas, se escoge la topología que sugiere el menor número de transformaciones. En los métodos estadísticos generalmente es importante la longitud de las ramas, esta suele representarse como una probabilidad o frecuencia de transformaciones y suelen presentarse los árboles con una escala que muestra la longitud de ramas; sólo la dimensión que va de las ramas a los terminales tiene importancia en ese caso, el "ancho" del árbol se usa para acomodar los diferentes terminales usados. En los cladogramas, las dimensiones no tienen ningún significado especial.

Técnicas

Una forma de expresar los árboles en formato de texto (por ejemplo para usar con programas o para el resumen de un artículo) es la notación de paréntesis, donde los paréntesis limitan los nodos; dependiendo de los autores o los programas, los grupos hermanos son separados por espacios, comas o símbolos de suma, por ejemplo (a (b c)), es equivalente a (a+(b+c)) y a (a, (b, c)), tenga en cuenta que en los árboles filogenéticos el orden de los terminales, sin cambiar la topología, no altera el contenido del árbol, por ejemplo (a (b c)) es exactamente igual a ((c b) a) y a ((b c) a).

Existen diferentes programas para manipular y generar árboles; la mayoría de ellos permiten interacción matriz-árbol, mientras que otros solo utilizan árboles. En general, los programas de análisis filogenético permiten manipular árboles en un esquema gráfico rudimentario. Al-

gunos programas permiten guardar información adicional a la topología en el mismo árbol como la longitud de la rama que conduce al nodo o terminal o una etiqueta. Los programas que pueden trabajar independientemente de la matriz suelen estar diseñados para la impresión o exportación gráfica de los árboles, soportando cambios de topología, longitudes y etiquetas de las ramas, pero no transformaciones de caracteres.

Dependiendo de la plataforma que trabaje, usted tiene disponible distintos programas: Mesquite , R [1] y Figtree [2] son válidos para todas las plataformas (adicionalmente son gratuitos). Mesquite es muy lento si su máquina es lenta (requiere de la máquina virtual de Java). Sobre Windows usted cuenta con WinClada (requiere la matriz de datos), su interfaz de impresión requiere mucha práctica (no es intuitiva). Otras alternativa, si usa Linux, pueden ser NJPlot o GNUplot . Para la impresión final del árbol para publicación, una opción puede ser R , que aunque es poco intuitivo al iniciar, logra resultados fianles de mejor calidad que otros programas.

En general, la manipulación de arboles se activa con un men'u (en WinClada **Edit/Mouse**, en FigTree directamente como barra de herramientas en la ventana; en Mesquite se usa el menú de herramientas de la ventana de edici'on de TreeView). Las acciones se realizan al seleccionar con el ratón la rama (WinClada) o arrastrando las ramas (para moverlas en Figtree). M'as que comandos, en esta práctica es importante manipular el ratón.

1. Desde WinClada+NONA , Mesquite o TNT

   (a) Revise los archivos de datos con editor de texto y con le programa seleccionado abra una matriz de datos que contenga tanto datos como árboles.

   (b) Establezca la forma de obtener información sobre los árboles, en un principio los

[1] `cran.r-project.org`

[2] tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/

costos o longitud del árbol.

(c) Cambie de posición algunos nodos o terminales de la topología, y observe cómo cambia la longitud del cladograma y los estados asignados a los nodos o la forma como los caracteres son mapeados, pruebe también moviendo ramas completas.

2. En Mesquite y TNT (para Windows) usted puede mover ramas completas; en TNT (para Windows) use el menu **Trees - view** y seleccione con el botón izquierdo del rat

'on el clado a mover (el clado queda marcado en rojo), señale con el ratón el destino usando el botón derecho.

3. Desde WinClada o TNT (para Windows), haga una búsqueda de cladogramas para la matriz de vertebrados que contruyó en la práctica de matrcies, use los par'ametros por omisión (menú **Analize** / **heuristics**, **traditional search**).

4. En Mesquite o Figtree :

(a) Cambie el orden de los terminales sin cambiar la topología (las relaciones entre terminales) del árbol.

(b) Coloque etiquetas en los nodos, y salve el árbol.

(c) Revise ese archivo en un editor de texto para determinar cómo se colocaron tanto las etiquetas como las longitudes.

(d) Abra el árbol con longitud de ramas.

5. En Mesquite o WinClada abra el archivo **"datos.conarbol.dat"**:

(a) Indique la cantidad de árboles presentes y la longitud de los mismos.

(b) Examine las agrupaciones obtenidas e identifique los caracteres que soportan los nodos.

(c) Mapee los caracteres en los árboles usando distintos tipos de optimizaciones: en WinClada ACCTRAN (=fast), DELTRAN (=slow) y no ambigua, En TNT (para Windows) (**Optimize** > **Character** > **Reconstructions** y seleccione un solo árbol y algunos caracteres) y en Mesquite : Dollo e Irreversible (C-S); revise cómo cambian las optimizaciones en los distintos nodos.

(d) Revise de nuevo el efecto en la longitud de los árboles de las siguentes modificaciones:

i. Cambie la raíz del árbol.

ii. Cambie de posición nodos y terminales.

iii. Seleccione un nodo y colapselo.

6. R :

(a) Lea el archivo con árboles **"arbol.r.tre"** use las instrucciones:

> `library(ape); arbol <- read.tree(''arbol.r.tre'')`

(b) Grafique el objeto arbol use las instrucciones, que por defecto dibuja el árbol con longitud de ramas o como un filograma:

> `plot(arbol)` o

> `plot.phylo(arbol)`

(c) Para graficar el árbol sin incluir la longitud de ramas use las instrucciones:

> `plot(arbol,use.edge.length=FALSE)`

(d) Para asignar las longitudes de las ramas como rótulos de los nodos y graficarlos use las instrucciones:

> `arbol$node.label<-arbol$edge.length`

> `plot(arbol,show.node.label=TRUE)`

(e) Para graficar el árbol con título de gráfica, colores de ramas y tipo cladograma use las instrucciones:

```
> plot(arbol, type="cladogram",main="Árbol 1", edge.col=c("red","blue","cyan"))
```

(f) Para obtener la longitud del árbol, lea la matriz de datos **"matriz.r.phy"** a un objeto que se llame *MatrizDatos* y use la función *parsimony()* :

```
> parsimony(arbol,MatrizDatos)
```

Pregunta(s)

(a) **Al hacer una búsqueda por defecto ¿Usted y sus compañeros obtienen las mismas topologías y los mismos caracteres que soportan los grupos?.**

(b) **Al cambiar la aditividad/no aditividad de un caracter ¿Cambia esto la forma como se mapean? Haga este ejercicio para varios caracteres, tanto binarios como multiestado.**

(c) **Si cambia la raíz, ¿cambia la longitud? ¿Por qué cree que se presenta el resultado que obtuvo? ¿Es (y por qué) una ventaja o una desventaja?**

(d) **Examine sus caracteres y cambie su aditividad-no aditividad. ¿Cambia esto la forma como mapean? Haga este ejercicio para varios caracteres, binarios y multiestado.**

(e) **Si cambia la raíz, ¿cambia la longitud? ¿Por qué cree que se presenta el resultado que obtuvo? ¿Es (y por qué) una ventaja o una desventaja?**

(f) **Dibuje el siguiente cladograma:**
(Lampreas (Tiburones (Esturión Teleósteos) (Celacanto (Peces-pulmonados (Anfibios (Mamíferos (Tortugas (Lagartos (Cocodrilos Aves)))))))))

(g) **Si la raíz esta colocada entre Aves y Cocodrilos, ¿cómo es la topología resultante?**

(h) **Convierta la topología dibujada a notación de paréntesis.**

Preguntas Generales

Aparte de no tener un análisis explícito, existe una gran diferencia entre los árboles filogenéticos actuales y sus "equivalentes" usados por algunos taxónomos (por ejemplo, Haeckel, Romer, etc.) ¿Es usted capaz de descubrirla? Clave: intente dibujar alguno de esos árboles al estilo actual.

Literatura recomendada

Page & Holmes, 1998 [El capítulo 2 esta dedicado a los árboles y presenta muy buenas ilustraciones, También puede consultar la página de docencia de Rod Page (`taxonomy.zoology.gla.ac.uk/teaching/index.html`)].

Búquedas mediante parsimonia

Introducción

Un discusión constante en sistemática es como seleccionar cladogramas, por ejemplo, Hennig (1968) plantea relaciones mediante la agrupación por sinapomorfias, no es muy explícito a lo que refiere la obtención del cladograma. Camin & Sokal (1965) posiblemente fueron los primeros en sugerir el uso de la *parsimonia* como un posible método para hacer esta selección; desde entonces el cladograma seleccionado es aquel que minimiza la cantidad de transformaciones, es decir *el cladograma más parsimonioso*. Posteriormente, esta técnica fue generalizada usando diferentes tipos de optimización: unas de las mas conocidas e implementadas son: *la optimización de Wagner y la optimización de Fitch* (Wagner, 1961; Kluge & Farris, 1969; Farris, 1970; Farris et al., 1970; Fitch, 1971).

La búsqueda del cladograma mas parsimonioso es más compleja a mediada que se agregan terminales, por ello los algoritmos para búsquedas exactas solo son viables con pocos terminales (aprox. 20-30), después de este número el espacio de árboles es tan grande que es imposible una búsqueda exacta (dado que es un problema NP-Completo). Por esta razón se utilizan búsquedas heurísticas que permiten obtener respuestas generalmente cercanas al óptimo global, y pese a que estas soluciones no proporcionan con certeza la solución óptima, se obtienen resultados difíciles de superar.

La forma más sencilla de elaborar cladogramas es usando el algoritmo de Wagner: como el or-

den de entrada de los taxa afecta la topología, se realiza una aleatorización de tal secuencia de entrada (Dayo, 1969), la cual puede estar seguida de permutaciones de ramas. Sin embargo, este ultimo paso para matrices muy grandes consume gran cantidad de tiempo; esto se debe repetir múltiples veces para evitar caer en "óptimos locales". Con este método es posible una solución optima incluso para matrices de 80 a 100 terminales. Problemas mas grandes requieren nuevas estrategias, algunas de ellas derivadas de la cristalización simulada, aceptando momentáneamente cladogramas subóptimos para iniciar desde ellos la permutación de ramas. Otros utilizan combinaciones bien sea entre búsquedas exhaustivas o entre búsquedas sobre reducciones de la matriz.

Una nueva ventana para las matrices cada vez más grandes (por ejemplo matrices moleculares con más de 1000 terminales), es tratar de identificar el acuerdo entre distintas réplicas de búsquedas parciales, en vez de buscar la solución óptima (e.g. Farris et al., 1996; Farris, 1997; Goloboff, 1997b; Goloboff & Farris, 2001).

En terminos de programas de computo, la mejor opción para programas gratuitos es TNT ; este es el programa más completo para análisis cladístico, usted lo encuentra disponible para Windows/DOS, MacOSX y Linux, es bastante rápido, además de tener implementado ratchet y las nuevas búsquedas. NONA otra posible opción puede manejarse como buscador con WinClada (para Windows), es buena idea que se familiarice con estos programas y la línea de comandos, las búsquedas son más eficientes desde la línea de comandos. PAUP* tambien está disponible como ejecutable en varias plataformas (Windows, Mac[1] y Linux). PAUP* no solo usa parsimonia sino distancias y máxima verosimilitud, aunque para parsimonia es menos versátil que TNT . TNT está diceñado para búsquedas exhaustivas en matrices grandes, la velocidad y sistema de macros son sorprendentes; pero, por lo menos hasta el momento, no hace búsquedas mediante ML.

[1]debe revisar la compatibilidad con las últimas versiones de Mac OS X, ya que el programa no se ha actulizado en los últimos años

Técnicas

El algoritmo de Wagner es la base para las búsquedas actuales. Para evitar el problema del orden de entrada de los datos, los taxa se seleccionan al azar (RAS[2]), la mayor parte de los programas actuales tienen esta opción: inician con una **semilla** determinada para el generado de número aleatorio y aseguran que la búsqueda sea exactamente igual a otra que tenga el mismo de inicio (semilla del generador de números seudo-aleatorios). Una vez construido un cladograma, este suele ser sometido a permutación de ramas para mejorar su calidad. Básicamente se toma un nodo (subárbol) y es eliminado del cladograma principal, luego se prueba si al unirlo en diferentes lugares del cladograma principal disminuye la longitud con respecto al cladograma original. Se puede permutar ramas de varias formas; las más comunes son unir el nodo a las diversas ramas del cladograma principal (subpoda y replantado, SPR por sus siglas en Inglés), o intentar otros puntos de unión dentro del subárbol y cambiar la topología (bisección y reconexión de árboles, TBR). En general, la mayor parte de los programas utilizan TBR, puesto que el tiempo de permutación entre ambas técnicas es casi igual y TBR es mucho más eficiente.

- Con NONA/Winclada, TNT, POY y PAUP*

  Construya una tabla (Apéndice 1) donde pueda registrar la información de tiempos de búsqueda, número de cladogramas y costo del mejor cladograma, para cada una de las siguientes búsquedas:

  1. Búsquedas por omisión

     Ejecute el archivo datos.chica.dat siguiendo los comandos:

     – NONA/Winclada

[2]En algunos escenarios se peude comenzar con un árbol al azar que será mejor punto de inicio que un árbol de Wagner, ver Goloboff (2014).

File/File open

Heuristic Search

- TNT

  > `proc nombre_archivo;`

  > `mult;`

- POY

  > `read( 'nombre_archivo')`

  > `build()`

  > `swap()`

- PAUP*

  > `set criterion=parsimony`

  > `exec nombre_archivo`

  > `hsearch`

Pregunta(s)

- **¿Qué tipo de información puede obtener cuando carga el archivo de datos?**
- **¿Cúal es la búsqueda por omisión en cada programa utilizado?**

2. Búsquedas modificadas

   Con el archivo el datos `datos.chica.dat` realice las siguientes búsquedas, modificando los comandos que sean necesarios.

   El manual de cada programa especifica los comandos a modificar para hacer dichas búsquedas como por ejemplo: Para búsquedas con NONA , el comando más usado es mult* para las búsquedas iniciales, max* para permutar ramas (requiere

árboles) y nix* para ratchet. En TNT también se puede usar mult; la permutación de ramas es con bbreak. En PAUP* debe definir el criterio de búsqueda: parsimonia usando set criterion=parsimony, y la búsqueda con hsearch tanto para árboles de Wagner como para permutar ramas; en este último caso use hsearch start=current.

Para los archivos de macros de TNT use la instrucción run seguida del nombre del archivo; en este caso pauprat.run y los parámetros run pauprat.run 10 5; TNT usa pesos de 1 y 2 en el archivo de salida, pauprat.

Pregunta(s)

- **Utilice un manejador gráfico que le permita visualizar la tendencia en los datos obtenidos.**
- **¿Encontró alguna tendencia en términos de tiempos o costos, al aumentar el número de replicas?**

3. Búsquedas con RACHET

Utilizando el mismo archivo.dat, realice las siguientes búsquedas:

En problemas más complejos de 100 o más terminales, se requiere utilizar técnicas más sofisticadas para obtener resultados satisfactorios. La más sencilla es el rastrillo o piñón (*ratchet* en ingl'es) (Nixon, 1999; Quickle, 2001), la cual es una forma simple de implementar una cristalización simulada. El método consiste en usar un árbol ya elaborado (por ejemplo con Wagner + TBR), perturbar la matriz de datos (con eliminación o repesado de caracteres), permutar las ramas del árbol para obtener el óptimo de la nueva matriz, volver la matriz a su estado original y buscar el árbol óptimo con permutado de ramas (todo ese proceso es

una iteración, la cual se repite **n** veces). El rastrillo es eficiente usando solo unos pocos árboles por iteración y permutando una cantidad intermedia de caracteres (entre 10-25%), en general, mejora drásticamente el ajuste de los cladogramas en las primeras iteraciones (Nixon, 1999).

Para producir nuevas mejoras en el ajuste de cladogramas con números mayores a 500 terminales, los métodos más eficientes parecen ser la "deriva de árboles", que es una implementación más explícita de la cristalización simulada (es decir aceptar soluciones ligeramente subóptimas con una determinada probabilidad, y a medida que el análisis avanza, se disminuye la probabilidad de aceptación de los subóptimos), y la fusión de árboles, que utiliza lo mejor de diferentes soluciones. Una revisión completa de estos métodos se puede consultar en Goloboff (1999).

Pregunta(s)

- **¿Cúal es y que hace el comando que permite hacer búsquedas con la técnica RACHET en cada programa?**
- **¿Cada búsqueda o réplica es independiente de otra?**
- **¿Hay algún efecto en el resultado al hacer varias búsquedas continuas con el mismo número de réplicas o es suficiente una sola búsqueda con múltiples replicas? Realice búsquedas adicionales con parámetros diferentes que le permitan responder estas preguntas. Utilice un manejador grafico donde pueda visualizar la tendencia de los datos obtenidos.**

- Análisis Filogenético en R, Bibliotecas y dependencias

1. Instale en su ordenador la versión más reciente de R ($\geq$ 3.00-11).

2. Carge, y de ser necesario instale, la biblioteca ***"phangorn"***

   > `install.packages ("phangorn", dependencies=TRUE)`

   > `library (phangorn)`

3. Lectura del alineamiento o matriz y formato de escritura

   (a) Cargue el alineamiento o la matriz llamada chars2.txt y defina los argumentos requeridos para que esta pueda ser leída.

   (b) Escríbala como formato NEXUS utilizando el nombre primates.nex:

   > `primates <- read.phyDat ("chars2.txt", format="phylip", type="DNA")`

   > `write.nexus.data (primates, file="primates.nex")`

   (c) Revise la matriz primates.nex con un editor de texto, identifique las particularidades del formato en R y si este archivo es similar al generado por winclada.

La función *read.phyDat()* permite leer diferentes tipos de caracteres como "DNA", "AA", "CODON" o "USER", este último es definido por el usuario. Posteriormente, el vector denominado primates es escrito en otro formato diferente al formato phyDat; la función *write.nexus.data()* escribe un archivo formato NEXUS a partir de un vector de secuencias. Los argumentos de una función pueden ser consultados con el comando *args(Nombre_función)* o con el comando de ayuda *?Nombre_función*.

Pregunta(s)

- **¿Qué otras funciones en otras bibliotecas permiten leer y/o escribir archivos tipo Nexus, Fasta, Phylip, Clustal, Sequential e Interleave?**

4. Topologías iniciales

   Estime la matriz de distancia, realice el análisis de agrupamiento y grafique para un posterior análisis.

```
> dm <- dist.dna (as.DNAbin(primates))
> treeUPGMA <- upgma (dm)
> treeNJ <- NJ(dm)
> plot (treeUPGMA, main="UPGMA", cex = 0.8)
> plot (treeNJ, "unrooted", main="NJ", cex = 0.5)
```

   La función ***dist.dna()*** permite obtener una matriz de distancias por pares de secuencias de ADN, bajo un modelo evolutivo determinado. Actualmente es posible estimar esta matriz bajo 11 modelos evolutivos diferentes, además permite estimar la varianza entre distancia y el valor de gamma. Existen varios método de agrupamiento por distancia para obtener la topología inicial, entre ellos los algoritmos UPGMA (=Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), WPGMA (=Weighted Pair Group Method with Averaging), NJ (Neighbor Joining) y UNJ (Unweighted Neighbor Joining); en este caso las funciones ***upgma()*** y ***NJ()*** permiten construir árboles de distancia bajo sus características específicas, los cuales pueden ser visualizados con la función ***plot()*** .

```
> treeRAM <- random.addition(primates, method="fitch")
```

```
> plot (treeRAM, main="UPGMA", cex = 0.8)
```

La función ***random.addition()*** , permite definir los árboles iniciales de los cuales parte el análisis de parsimonia.

Pregunta(s)

- **¿En que difiere cada árbol obtenido?**
- **¿En que consiste el método de FICHT y el método de SANKOFF?**
- **¿Que hacen los algoritmos de agrupamiento UPGMA, WPGMA, NJ y UNJ?**
- **¿En que consiste el método de construcción de árboles de random.addition?**

5. Parsimonia y optimización

A partir de la matriz de dataos primtes.nex y las topologías construidas, calcule la longitud de los árboles y obtenga el árbol de menor costo o score.

```
> parsimony (treeUPGMA, primates)
> parsimony (treeNJ, primates)
> parsimony(treeRAM, primates)
```

La función ***parsimony()*** permite obtener el árbol de menor longitud utilizando el algoritmo del método SANKOFF o de FITCH, en este caso es una busqueda por omisión dado que no se especifican los argumentos.

Optimice cada topología obtenida en el punto C, utilizando el método de optimización por omisión, optimización por SPR y optimización por NNI. Registre sus resultados en el Apéndice 2.

6. Optimización por omisión

```
> optParsUPGMA <- optim.parsimony (treeUPGMA, primates)

> optParsNJ <- optim.parsimony (treeNJ, primates)

> optParsRAM <- optim.parsimony (treeRAM, primates)
```

7. Optimización con rearreglo de ramas específico

```
> optParsUPGMA_SPR <- optim.parsimony (treeUPGMA, primates, rearrangements="SPR")

> optParsUPGMA_NNI <- optim.parsimony (treeUPGMA, primates, rearrangements="NNI")
```

La función optim.parsimony() intenta encontrar el o los árboles mas parsimoniosos utilizando los métodos de rearreglos NNI y SPR.

Pregunta(s)

- **¿En que difieren los métodos de rearreglos NNI, SPR y TBR?**
- **¿Cuales son los argumentos por omisión de las funciones *parsimony()* y *optim.parsimony()*?**

8. Parsimonia usando Rachet

Utilice el método Rachet en parsimonia para hacer las búsquedas del o los árboles de menor costo. Complete la tabla del Apéndice 3 creando nuevas líneas de código para hacer las búsquedas con los árboles obtenidos en el proceso anterior, use los siguientes parámetros para las búsquedas.

9. Búsqueda con Rachet utilizando los árboles iniciales y optimizando con el método de rearreglos NNI.

```
> pratchet(primates, start=treeUPGMA, method="fitch", maxit=100, k=5, trace=1,
all=FALSE, rearrangements="NNI")
```

10. Búsqueda con Rachet utilizando los árboles iniciales y optimizando con el método de rearreglos SPR.

```
> pratchet(primates, start=treeUPGMA, method="fitch", maxit=100, k=5, trace=1,
all=FALSE, rearrangements="SPR")
```

11. Búsqueda con Rachet utilizando los árboles optimizados con NNI y optimizando con el método de rearreglos NNI.

```
> pratchet(primates, start=optParsUPGMA_NNI, method="fitch", maxit=100, k=5,
trace=1, all=FALSE, rearrangements="NNI")
```

12. Búsqueda con Rachet utilizando los árboles optimizados con NNI y optimizando con el método de rearreglos SPR.

```
> pratchet(primates, start=optParsUPGMA_NNI, method="fitch", maxit=100, k=5,
trace=1, all=FALSE, rearrangements="SPR")
```

13. Búsqueda con Rachet utilizando los árboles optimizados con SPR y optimizando con el método de rearreglos NNI

```
> pratchet(primates, start=optParsUPGMA_SPR, method="fitch", maxit=100, k=5,
trace=1, all=FALSE, rearrangements="NNI")
```

14. Búsqueda con Rachet utilizando los árboles optimizados con SPR y optimizando con el método de rearreglos SPR

```
> pratchet(primates, start=optParsUPGMA_SPR, method="fitch", maxit=100, k=5,
trace=1, all=FALSE, rearrangements="SPR")
```

pratchet() hace búsquedas usando el método de Rachet, estas búsquedas son hechas a partir de un árbol inicial ya sea optimizado o no, aunque es preferible

partir de un óptimo ya dado. También puede iniciar haciendo una búsqueda para obtener el árbol o los árboles de partida, aplicar el método de rachet y óptimizar.

Pregunta(s)

- **¿Hay diferencias entre las búsquedas con rachet en términos de costos o tiempo?**
- **Escriba y ejecute la línea de código que le permitiría realizar una búsqueda con: 70 iteraciones en Rachet, Metodo SANKOFF, rearreglo SPR, Sin especificar el árbol inicial.**

Preguntas Generales

- **De los diferentes programas usados, ¿Cúal estima usted que es el óptimo? Explique las razones de su selección.**
- **¿Cúal cree usted que sería(n) el(los) criterio(s) para seleccionar entre los diferentes programas?**
- **Elabore una tabla usando sus resultados y los de sus compañeros. Para cada matriz, ¿En qué clase de búsqueda se obtuvo el mejor resultado?, ¿cúal fue el tiempo en que se obtuvo dicho resultado?**
- **Dado que con una técnica heurística existe el riesgo de no obtener el árbol más corto ¿Cómo justificaría usted la búsqueda realizada?**

Un última recomendación, en este laboratorio solo se utilizaron algunos tipos de búsquedas posibles y algunos de los posibles comandos para cada programa. Trate de encontrar

otros comandos de búsqueda en estos programas u otros parámetros para los comandos usados en la práctica.

Número de réplicas	árboles retenidos/réplica
5	1
5	100
10	1
10	100
100	1
100	100

Número de Búsquedas continuas	Número de réplicas/Búsqueda	Número iteraciones en RACHET
1	5	50
1	5	100
1	10	50
1	50	50
5	1	5
20	1	5

Pesaje de caracteres

Introducción

Cuando se habla de pesaje de caracteres en cladística, se refiere a que algunos caracteres sugieren más información que otros. El tema es controversial; la idea de pesaje es central en autores como NANCY NEFF , mientras que para autores como Kluge (1997) es regresar a la subjetividad de la época de la taxonomía clásica, al imponer a la filogenia un prejuicio de "cómo" es la evolución; otros autores (por ejemplo, Goloboff, 1993, 1995) defienden el uso de pesado, argumentando que es claro tras un análisis filogenético que diferentes caracteres poseen distintos niveles de información; lo cual se hace evidente al multiplicar cualquier cuantificador de homoplasia del carácter por el peso inicial que se le asignó, en la lógica de pesaje sucesivo (buscar cita farris y kluge 1969).

Existen dos formas de hacer pesado de caracteres y una tercera que es un criterio de búsqueda, que no es excluyente del pesaje de caracteres. El primero es el pesado *a priori*, antes de empezar el análisis. En la actualidad su forma más común es disminuir el peso del tercer codón en los análisis moleculares. Aunque se han propuesto muchas formas de encontrar a partir de los caracteres un peso inicial, quienes practican pesado del tercer codon no están muy preocupados e insisten que lo importante es diferenciar un tipo de codon de los otros (Swofford et al., 1996), por ejemplo:

"Third codon positions of mt protein-coding genes are known tobe saturated, or nearly

so, at deep phylogenetic levels ... . We therefore examined the effect of downweighting third positions by either assigning zero weight or employing transversion parsimony." cite Springer2001

" Omission of the 3rd codon positions of the protein- coding genes from the analysis was justified due to significant base composition heterogeneity. Base composition heterogeneity can cause species to group by compositional similarity rather than evolutionary history (Lockhart et al., 1994).

In addition, sequence saturation of the 3rd codon positions of these genes (as was detected in Guzik et al. (2005) and Strugnell et al. (2005) can also produce spurious phylogenetic signal (e.g. Phillips Penny, 2003) and therefore removing these data from the analyses will have also removed some noise. This is likely to be of greater importance in the deeper divergences and more distant relationships where there has been a greater length of time for saturation to accumulate. " cite Strugnell2014

En el pesado *a posteriori* el peso se asigna basándose en un análisis inicial de los datos; se estima la *confianza* del carácter, usando por ejemplo, el índice de consistencia, o el de retención, y con base en esos pesos se reinicia el análisis (Farris, 1969). En general es el esquema de pesaje más usado. El pregunta clave aquí es: ¿cómo se hace este primer análisis? Y después, ¿cómo se termina?. Otro de los problemas de esta forma de pesado radica en la comparación de los cladogramas, puesto que diferentes juegos de pesos pueden producir diferentes respuestas que no son comparables (a nivel de los estadísticos de ajuste, como longitud).

La tercera forma de "pesado" no es ni *a priori*, ni *a posteriori*, ya que en realidad es un criterio de búsqueda. Esta forma es conocida como pesado implícito (Goloboff, 1993). Este procedimiento utiliza la confianza del carácter (con una función cóncava de homoplasia) y utiliza ese valor como criterio óptimo (en vez de la longitud pesada); el problema de este

método, de hecho el de cualquier método, es cómo escoger entre las diferentes funciones. El pesado sucesivo es muy popular para "reducir" la cantidad de árboles más parsimoniosos (Carpenter, 1988), aplicación que no es correcta ya que es una metodología con su propia lógica, definir los pesos de acuerdo al comportamiento en las búsquedas previas, por lo que los resultados no tienen que coincidir con los de pesos iguales, ni en topología ni en número de soluciones (implícito en Goloboff, 1995).

Para iniciar las rondas de pesado, Farris (1969) propuso comenzar basándose en la compatibilidad de caracteres (caracteres que no se contradicen entre sí). En la actualidad la forma más común es iniciar con un árbol de pesos iguales. Kjer et al. (2001, 2002) propusieron comenzar con el mejor resultado de varios árboles producto de *bootstrap* (u otro método que produzca pseudoréplicas). Para detener el procedimiento, Farris (1969) propuso esperar hasta que los resultados fueran autoconsistentes, es decir que se produjeran los mismos árboles (y por lo tanto los mismos pesos). Como la autoconsistencia puede verse afectada por el hecho de tener gran cantidad de árboles óptimos, es importante asegurarse de limitar el número de iteraciones. Kjer et al. (2001, 2002) proponen no iterar y solo mantener los pesos dados por los árboles de las pseudoréplicas.

Farris (2001) trató de solucionar simultaneamente ambos problemas. Propuso comenzar con un árbol donde se ha hecho *jackknife* con probalidad de 0.5, restaurar luego todos los caracteres y comenzar a partir de los estadísticos del árbol producto de la permutación e iterar; el proceso se repite varias veces. Farris argumenta que si los pesos son independientes del punto inicial, las diferentes réplicas producirán aproximadamente los mismos resultados (los resultados se muestran como un árbol consenso de la mayoría de las diferentes réplicas).

El método de Goloboff es prácticamente igual a parsimonia tradicional. Es importante recalcar que aunque Goloboff veía su método como un refinamiento de pesado sucesivo, este pesaje se puede usar igualmente en coordinación con pesado implícito. La forma común de

pesado implícito es usar una función cóncava de la forma $\frac{k}{k+h}$, donde k es la constante de concavidad y h la homoplasia del carácter. Cuanto mayor sea la constante de concavidad, menos diferencia habrá entre los caracteres muy homoplásicos y los poco o no homoplásicos.

5.1 Materiales

Matriz de datos (datos.pesado.dat).

5.2 Métodos

En PAUP* :

(1) Abra la matriz en PAUP* y realice una búsqueda.

(2) Repita la búsqueda pesando diferencialmente el tercer codon.

Compare los resultados con los de la matriz sin pesado diferencial.

(3) Coloque todos los pesos iguales y realice una búsqueda con pesado sucesivo, itere un máximo de 10 veces. Chequee si los pesos se estabilizaron revisando la longitud de los arboles usando

> `pscores;` .

Tanto en TNT (o PIWE) como en PAUP* :

(4) Con los caracteres con pesos iguales, active los pesos implícados con k=1, y haga una búsqueda.

(5) Revise el soporte de los nodos usando *jackknife* (use pocas réplicas, máximo 100).

(6) Repita desde (4) con valores de k de 3, 6 y 10.

5.2.1 Programas

PAUP* , TNT , PIWE .

5.2.2 Comandos

En PAUP* se pueden definir juegos de caracteres usando el código X - .\ N, donde X es el número del carácter donde se empieza y N el número de posiciones en los que se vuelve a aplicar la opción. Por lo tanto la instrucción

> `weights 3:all;` todos los caracteres tendrán peso de 3 y con

> `weights 1: 3 - .\ 3;` cada tercer carácter, a partir del carácter 3 será pesado con 1. Usted puede chequear esto usando

> `cstatus full=yes;` que le mostrará el peso de todos los caracteres y deben verse en la secuencia 3 3 1 3 3 1...

PAUP* también tiene implementado una opción para tomar pesos a partir de los árboles en memoria. Esa opción es

> `reweight` , en la que se pueden modificar el tipo de pesado, qué valor se va a utilizar y la escala de los pesos. ¡Use la ayuda en línea para manipular estos valores!

En TNT el pesado implícito se activa utilizando

> `piwe=N;` donde N es el valor de concavidad a usar. Con PAUP* se activa usando

> `pset Goloboff=yes gk=(N-1);` . Nótese que escribimos N-1, pues PAUP* comienza con 0 y suma uno (técnicamente es como comenzar desde 1). PIWE usa directamente pesado implícito, y se cambia el valor de concavidad con la instrucción

> `conc N;` . Tanto en TNT como en PAUP* el límite es de 32000 (lo cual es prácticamente equivalente a parsimonia lineal); en PIWE el valor máximo es 6. Además

TNT y PAUP* usan todos los valores decimales, por lo cual es recomendable recurrir a alguna medida de soporte para los nodos, con lo que se evita la sobre-resolución. A diferencia de PIWE o PAUP* , TNT usa una función a minimizar (el inverso de la usada en PIWE : $\frac{h}{k+h}$); para comparar los reportes del ajuste de los dados en PIWE y PAUP* , pida el ajuste usando

> `fit*;` . En PIWE simplemente escriba

> `fit;` y en PAUP*

> `pscores gfit=yes;` .

Además, TNT permite definir su propia función de concavidad usando

> `piwe [A B C...;` , donde A es el fit para 0 pasos extra, B para 1, C para 2 y asi sucesivamente.

5.3 Preguntas

5.3.1 Práctica

Compare sus resultados (topologías y caracteres en los nodos) con todos los métodos de pesado utilizados. ¿En qué se parecen y en qué se diferencian los resultados?

Usted debió definir una forma de pesado del tercer codon. Defienda su esquema de pesado y compárelo con el de sus compa neros.

Dados los resultados que encontró al medir el soporte de los nodos, ¿cree usted que hay sobreresolución en los datos usados?

5.3.2 Generales

Escriba un ensayo corto (de media página) donde presente su posición con respecto al pesado de caracteres. ¿Esta a favor o en contra? ¿por qué? ¿Cuáles son las ventajas y problemas que ofrece su posición?, ¿El pesaje contradice la lógica de agrupamiento por homologías?

5.4 Literatura recomendada

Farris, 1969 [La idea original de pesar usando la información derivada de los cladogramas].

Goloboff, 1995 [Una defensa de pesado implícito].

Goloboff et al., 2008 [Un análsis empírico que muestra que pesaje es un mejor predictor que parsimonia lineal].

Kluge, 1997 [Un ataque a todas las formas de pesado].

Modelos de evolución

Introducción

En sistemática molecular se enfrenta un conjunto de datos distinto a los caracteres morfológicos: un mismo tipo de estados (ACGT/GAP) se encuentra repetido a lo largo de toda la matriz de datos, paraeste tipode datos moleculares, existen aproximaciones estadísticas, dado que el origen de muchos de los análisis filogenéticos moleculares se originan en biología molecular o en genética de poblaciones. Bajo la estimación estadística se asume que un modelo genera las secuencias de ADN y a partir de tal modelo se estima qué tanto se ajustan los datos a las hipótesis filogenéticas. Este procedimiento se conoce como **máxima verosimilitud** (*maximum likelihood* en la literatura en inglés).

En los modelos moleculares se asigna tanto la probabilidad de transformar una base cualquiera en otra base, incluida esa misma base, como las frecuencias de bases en el equilibrio. El cálculo de esas probabilidades está influenciado por diferentes parámetros como por los criterios de selección; en principio, los parámetros deberían ser estimados a partir de losdatos de los datos, aunque algunos autores usaron en un inicio parámetros predefinidos.

El modelo con el menor número de parámetros es conocido como JC o JC69, por los autores y el año en que fue propuesto (Jukes y Cantor, 1969), en este modelo se asume que la probabilidad de una base para transformarse en otra es siempre la misma y que la frecuencia de las bases es igual. A partir de este modelo se pueden agregar más parámetros que hacen

más complejo el modelo en diferentes direcciones, ya sea al diferenciar entre los tipos de base (ya sea químicamente AG-CT, o cada una por separado), diferenciar las probabilidades basados en la proporción de cada base, tener o no en cuenta o la variación dada por cada sitio al asumir que algunos sitios son más propensos a cambiar que otros (función Γ) y, finalmente, si existe o no un reloj molecular.

La información básica se puede consultar en citar Felsenstein () Swofford et al. (1996) es una referencia básica para comprender el desarrollo de los distintos modelos. Page & Holmes (1998) ofrecen un capítulo ilustrativo sobre el tema. La idea general de modelos también se aplica para la evolución proteíca, pero dado que casi siempre se tiene tanto la secuencia de aminoácidos como la nucleotídica, esta última es la preferida al explotar más directamente la información (al menos a nivel de variación).

Dado que los valores de las probabilidades de los datos son muy pequeñas, y que es más fácil sumar los logaritmos que multiplicar los números iniciales, para facilitar se utiliza el negativo del logaritmo natural de la verosimilitud, que es el valor tradicionalmente reportado por los programas así como en la literatura.

Debido al aumento en el número de los parámetros, los modelos puedan explicar mejor los datos, lo que no implica que los modelos sean ***más*** realistas, por lo que la selección de un modelo no puede basarse en el aumento neto dle valor de verosimilitud, sino si la mejora es (o no es) estadísticamente significativa, dado el número de parámetros usados en el modelo.

Existen dos aproximaciones básicas para este problema. Dado que la mayor parte de los modelos son una especialización de otros modelos más sencillos, es decir son modelos anidados, en los cuales el modelo más sencillo es sólo un caso especial del modelo más complejo, se puede hacer una prueba jerárquica de verosimilitud (hLRT[1]) que compara la proporción

[1]

$$\delta = -2ln\frac{Max[L_0(modelo - nulo|datos]}{Max[L_1(modelo - alternativo|datos]} = 2(lnL_0 - lnL_1) \tag{6.1}$$

en la que se incrementa la verosimilitud al agregar el parámetro; se asume una distribución χ^2 para la proporción, tomando el número de parámetros extra como los grados de libertad. El problema de esta prueba es que no es claro si la distribución χ^2 es válida, y solo permite comparar modelos anidados; la prueba es un tanto conflictiva al comparar GTR con GTR+I o GTR+Γ; se asume que la forma como se agregan los parámetros no sesga el resultado, lo cual no es válido; usted puede revisar esta afirmación usando programas como JModelTest o PAUP* .

Otra forma de selección del modelo óptimo está basada en la medida de la información, usando el criterio de Akaike[2], o la cantidad de información bayesiana[3]. En estos casos se calcula cuanta información contiene el modelo dados los parámetros de este. La ventaja es que se puede hacer la comparación entre modelos sin tener que tomar una secuencia particular y sin importar si los modelos están anidados.

Para los cálculos, se puede usar JModeltest , o PAUP* , o R + ape + PhyML o JModeltest + PhyML .

JModeltest es un programa de Java por lo que funciona de la misma forma en todas las plataformas de computo, la salida es en modo de texto / tablas dentro del mismo programa; el programa le permite mayor control sobre la forma de iniciar el cálculo, tanto desde el árbol de inicio hasta la forma de implementar el test jerárquico, desde JC hacia GTR (*forward*) o en sentido contrario (*backward*); puede usar hasta 203 modelos y de manera automática corre los análisis en múltiples procesadores, lo que hace más eficiente que PAUP* o R , además puede ejecutarlo en modo de texto, con modelos diferenciales lo que facilita su uso en clusters de computadores; es posible que obtenga distintos modelos dependiendo de la forma como estructure su análisis. R en conjunto con ***ape*** y PhyML puede realizar el cálculo del mejor modélo de evolución molecular y graficar los resultados.

[2]AIC= -2lnL + 2N, donde lnL es el ajuste del modelo reportado y N el número de parámetros libres

[3]BIC=-2lnL + Nlnn, donde lnn, es el logaritmo natural de la longitud de la secuencia

Técnicas

Par obtener el modelo con programas como PAUP* o R debe tener un archivo de datos con las secuencias alineadas, revise la práctica de alineamiento con POY;

En JModeltest2 + PhyML

1. Abra en un editor la matriz de datos **"DNA1.phy"**. Revise las principales características del formato PHYLIP
2. Abra la matriz de datos en el programa JModelTest .
3. Calcule los valores de likelihood (likelihood scores), a partir de un árbol base de BIONJ .
4. Calcule el valor de AIC (criterio de elección del modelo de mayor ajuste a la matriz). El valor de AIC será mejor cuanto más **pequeño** sea.
5. Revise la salida de AIC y anote cual es el modelo de mayor ajuste para la matriz de datos, asi como los parámetros de este modelo.
6. Repita el análisis a partir del cálculo de criterio bayesiano (BIC). Compare sus resultados, tanto para AIC como para BCI con los obtenidos por sus compañeros.
7. Repita 3 pero use una búsqueda de FIXED BIONJ+JC y evalue el resultado del test jerárquico. ¿Existe alguna diferencia entre los modelos sugeridos por cada enfoque?
8. Repita desde 3 con un árbol base de ML optimizado y evalue el modelo. ¿Existe alguna diferencia?

En R+ape+PhyML

1. Abra R y revise si instalada la biblioteca ***ape*** , en caso de no tenerla, instalela.

2. Coloque como directorio activo el directorio donde tenga los datos y PhyML

3. Cree un archivo con las instrucciones:

cargamos la libreria ***ape***

```
> library(ape) ##
```

leemos datos alineados en formato tipo phylip

```
> DNA <- read.dna(''alineado.phy'')
```

listado de tamaño de las secuencias

```
> table(unlist(lapply(DNA, length)))
```

##Test de modelos de evolución con ***ape***

cargamos la libreria ape

```
> library(ape)
```

con phymltest probamos 28 modelos en phyml

ape + R hacen todo el proceso

en linux cambie a

execname = "./phyml", si es local o

##

execname = "phyml", si es global

##

en windows

##

```
> modelo<-phymltest(''alineado.phy'', format = ''sequential'', itree = NULL,exclude
= NULL, execname = ''phyml.exe'', append = FALSE) ##
```

use format = "interleaved" si aplica a su matriz

##

con print puede revisar los valores de AIC

##

> `print(modelo)` ##

con summary puede tener un resumen de los valores del test jerárquico

##

> `summary(modelo)` ##

grafique con 'plot' los valores de AIC

##

> `plot(modelo, main = 'test de modelos para ML, usando PhyML')`

4. Compare el modelo sugerido por AIC y por el test jerárquico.

5. Cargue cada instrucción por línea de comandos desde un editor de texto y si tiene todas las instrucciones escritas en un archivo **"modelos.R"**, puede usar este archivo y ejecutar todas las instrucciones desde la línea de comandos:

   > `R -f modelos.R`

Tanto JModeltest como R+ape usan PhyML para el cálculo de los valores de likelihood; los dos programas permiten evaluar el modelo de una manera más amigable que la línea de comandos y tener o una salida gráfica (R+ape) o una salida de texto facilmente leible.

En PAUP* :

1. Abra la matriz de datos **"DNA1.nex"**.

2. use

   > `help automodel;` para obtener ayuda sobre la instrucción y las opciones en uso.

3. construya un árbol tal y como lo hizo en la sección use un árbol de NJ con distancia de Jukes -Cantor como inicio:

> `set criterion=dist;`

> `dset distance=JC;`

> `hsearch;` Este es el árbol de inicio para hacer los cálculos para la selección del modelo.

4. use

   > `automodel` para hacer una búsqueda por defecto

5. use

   > `automodel AIC=yes AICc=no BIC=no modelset=j3 lset=AIC invarSites=no gammaRates=no;` para hacer una búsqueda con el equivalente a 3 modelos en jmodeltest , compare los resultados con la búsqueda anterior.

6. Calcule el valor de AIC para 4 diferentes modelos: JC, K80, GTR y uno de su elección. El valor de AIC será mejor cuanto más **pequeño**.

7. Para los mismos modelos y el escogido por el hLRT en JModelTest , calcule el criterio de información bayesiano. Compare sus resultados, tanto para AIC como para BIC con el de sus compañeros, y determine cúal es o son los mejores modelos para esos criterios. Ordene los modelos del mejor al peor.

Pregunta(s)

- **¿Es el modelo escogido por el criterio de Akaike igual al escogido en el test jerárquico? ¿Usted esperaría que lo fuesen?**
- **¿Es igual el resultado en las distintas exploraciones realizadas? ¿Usted esperaría que fuesen iguales ó desiguales?**
- **¿Son iguales los resultados en AIC y BIC?**
- **De usar los tres programas ¿usted espera la misma respuesta?**

Preguntas Generales

- **¿Cómo se relaciona el concepto de caracteres homólogos usado en los primeros laboratorios, con el concepto de los modelos?**
- **¿Prefería usted usar siempre el mismo modelo (por ejemplo, JC)? Argumente su respuesta**

6.1 Literatura recomendada

Posada & Crandall, 2001 [presentan de manera completa cómo seleccionar modelos basándose en la maximización del ajuste].

Programas de c'omputo

Hoy en d'ia los an'alisis filogen'eticos usan decenas, cientos a miles de terminales y de caracteres, por lo que se requiere gran cantidad de c'alculos. Aunque es posible hacerlos a mano, esto se hace imposible para m'as de 10 taxa y una veintena de caracteres. Esta secci'on busca familiarizar al estudiante con los programas m'as comunes, aparte de los usados durante las distintas pr'acticas. Es casi un truismo que la selecci'on de programas depende de la(s) plataforma(s) utilizada(s), el problema a resolver, y en menor grado de los fondos disponibles. Dado que "por unos pocos d'olares" se puede tener un repertorio apropiado de programas, la condici'on central a tener en cuenta es la **velocidad**. La **facilidad de manejo** en la gran mayor'ia de casos es secundaria; aunque la curva de aprendizaje puede ser lenta y tortuosa, las habilidades ganadas hacen que los an'alisis en el largo plazo sean m'as faciles de ejecutar; a eso se suma la posibilidad de manejar "lenguajes" por casi todos los programas. Es posible que al final del aprendizaje todo

sea asunto de un par de instrucciones, una vez que ha perfeccionado sus habilidades y que posee archivos de instrucciones preajustadas a sus gustos y necesidades.

A.1 Editores de matrices y manejadores de b'usqueda

A.1.1 WinClada

Autor: Nixon, 2002.

Plataforma: Windows 9x o superior. [Funciona MUY bien en wine dentro de Linux].

Disponibilidad: Shareware (30 días de prueba), tiene un costo de US 50.00.

http://www.cladistics.com

El programa require de NONA para realizar las b'usquedas (PIWE / Hennig86 son deseables, pero no obigatorios).

Bajo Windows, este es uno de los programas m'as 'utiles, tanto para principiantes como para iniciados. El programa tiene dos entornos para manejar matrices y 'arboles. El manejo e impresi'on de 'arboles permite que se tengan im'agenes listas para publicaci'on con pocos pasos y sin necesidad de retoque posterior. Tiene un par de "conflictos" con el manejo de im'agenes que pueden ser inc'omodos; adem'as, el usuario debe tener presente que el

programa puede numerar (taxa, caracteres y 'arboles) desde cero (la manera l'ogica para los programadores), o desde uno, por lo que se debe tener cuidado al escribir el texto y referenciar la gr'afica.

WinDada **Matrix**: Le permite cambiar algunos aspectos de la matriz (crearlas, cambiar tama no, salvarlas, fusionarlas).

Edit: Lo m'as importante es que permite que los datos sean o no modificables. Adem'as, permite adicionar polimorfismos.

Terms/Chars: Estos men'u le permiten modificar cosas espec'ificas de terminales y caracteres, tales como nombre y orden, seleccionarlos, borrarlos, adicionar.

View: Opciones de presentaci'on. Adem'as, puede ver estad'isticos de los caracteres, aditivos, activos, pasos m'inimos y m'aximos; y le permite intercambiar modo num'erico o IUPAC (para DNA).

Output: Le permite exportar en formatos diferentes, o informaci'on variada sobre los caracteres.

Key: Si tiene los caracteres nominados, funciona como clave interactiva.

Analize: Tiene diferentes entradas para b'usquedas y c'alculo de soporte. En **heuristics**, es posible configurar la cantidad m'axima de 'arboles a retener, la cantidad de 'arboles por cada r'eplica ('arbol de Wagner+TBR) (i.e. estrategias NONA/PAUP) y otros detalles de la b'usqueda, como especificar una

semilla para los n'umeros aleatorios (0 es el tiempo interno de la computadora). En **ratchet**: se puede modificar la cantidad de iteraciones de ratchet, el n'umero de 'arboles a retener por iteraci'on y el n'umero de b'usquedas de ratchet, bien sean secuenciales o simult'aneas. Mientras que con **bootstrap/jackknife/CR with NONA** permite manipular las diferentes opciones para hacer soporte con remuestreo. Recuerde borrar todos los 'arboles antes de ejecutar la b'usqueda de remuestreo.

CPanel Para llenar la matriz.

Mode: Cambia el modo de acceso de los caracteres.

Winclados Para manejar el 'arbol. En general, la mayor parte de estas acciones son accesibles desde la barra de herramientas con el rat'on.

Las teclas F2-F12 tienen (con y sin SHIFT) diversas funcionalidades de visualizaci'on, como engrosar/adelgazar el ancho de las ramas, expandir/contraer la longitud, moverse entre 'arboles.

Trees: opciones para visualizar y manipular el 'arbol sin modificar su topolog'ia (forma, consensos, ir a un 'arbol determinado).

Nodes: Para ver frecuencias de nodos, desafortunadamente su funcionalidad es muy inestable, y a veces produce resultados inesperados.

HashMarks: Para ver las transformaciones en los nodos.

Edit/Mouse modes: Modifica las acciones posibles del rat'on para modificar el 'arbol, como mover nodos, colapsarlos, cambiar la ra'iz.

Diagnoser: Para mapear caracteres.

A.1.2 MacClade & Mesquite

Autores: Maddison & Maddison, 2005.

Plataforma (McClade): Macintosh (MacOS X, PPC y Classic 68k. Esta 'ultima funciona bien con emuladores como BasiliskII)

Plataforma (Mesquite): Cualquiera, requiera Java virtual machine.

Disponibilidad (McClade): Descontinuado pero puede acceder desde el sitio de los autores para el programa que funciona en OS X (hasta 10.6):

http://macclade.org/index.html.

Disponibilidad (Mesquite): Gratuito.

http://mesquiteproject.org.

MacClade es un programa cuyas cualidades gr'aficas son impresionantes, su interfase es agradable, sencilla y no transmite miedo a los novatos. Dadas sus magnificas propiedades gr'aficas, es **muy** recomendable para la edici'on de 'arboles y matrices, pero principalmente para la optimizaci'on de caracteres, la cual permite distintos tipos de cambio de los mismos (v.g., Dollo,

ACTRAN, DELTRAN) y adicionalmente tiene una caracter'istica 'unica de mapeo, el "equivocal ciclying" [Maddison & Maddison, 1992].

En MacClade la edici'on de los datos y el manejo de los 'arboles se llevan a cabo en dos interfaces separadas para 'arboles y matrices, las cuales son accesibles en la ventana **Windows**. Dado que Macclade esta diseñado para ser igualmente funcional con datos morfol'ogicos y moleculares, existen m'ultiples herramientas de edici'on.

Data Editor En esta interfaz se construye y edita la matriz. Sus ventanas son:

Edit: se pueden duplicar caracteres o taxa, editar bloques de comandos que corran directamente en PAUP.

Utilities: se pueden buscar secuencias particulares dentro de la secuencia total, reemplazar caracteres por otros, reemplazar datos ausentes por *gaps* y viceversa, importar alineamientos desde el *genbank* y finalmente se puede lograr que la matriz hable por si sola ¡s'i, que hable! Un lector autom'atico lee en forma descendente los taxa de su matriz facilit'andote un poco el trabajo (puede usar de hecho ingl'es brit'anico, si esto lo hace m'as feliz).

Characters: permite adicionar caracteres, incluir los estados, ver una lista de los caracteres que se han incluido, determinar el formato de los caracteres

que est'an en la matriz (si son prote'inas, nucle'otidos, o est'andar, que es el definido para simbolog'ia de n'umeros en las casillas); tambi'en permite determinar el tipo de cambio que se permitir'a para los caracteres (cuando se est'a haciendo una optimizaci'on), el peso de los caracteres.

Taxa: permite hacer cosas semejantes a **characters**, pero para el manejo de los taxa, incluir taxa nuevos, crear listas de taxa o reordenarlos.

Display: finalmente esta ventana maneja toda la configuraci'on gr'afica de la matriz, el tipo de letra, su tamaño, el color de los caracteres, el ancho de columna, etc.

La última ventana en el men'u es **Windows**, el cual permite moverse entre las interfaces de los datos y el 'arbol y llamar a una caja de herramientas que por omisi'on siempre est'a presente en la parte inferior izquierda de la ventana. Esta caja ofrece herramientas como llenar estados, expandir columnas, cortar, entre otras. En esta ventana **notes about trees** y **note file** permiten incluir comentarios acerca de los 'arboles y sobre la matriz.

Tree Window Esta interfaz maneja y modifica los 'arboles y posee las ventanas b'asicas del **data editor**, no obstante, incluye otras nuevas, espec'ificas para el mapeo de caracteres y manejo de los 'arboles. Solo se describen aquellas nuevas ventanas:

Trees: Esta ventana permite cambiar, abrir archivos externos para incluir 'ar-

boles, crear una lista de los 'arboles que esta incluidos a la matriz, guardar los 'arboles, exportarlos en formato de hennig86 o Phylip (ver anexo de formatos para m'as informaci'on) y manejar las politomias como politomias blandas o duras (Coddington & Scharff, 1994).

Σ: esta ventana incluye el manejo de todos los estad'isticos del 'arbol, como la longitud, el 'indice de consistencia, 'indice de retenci'on, 'indice de consistencia escalonado, el n'umero de cambios en el 'arbol y finalmente, puede generarse el archivo de comandos para correr el indice **decay**, 'o soporte de Bremer en PAUP* (vea el cap'itulo sobre programas).

Trace: aqu'i se maneja todo lo relacionado con el mapeo de los caracteres; puede mapear todos los caracteres a la vez, o escoger un determinado car'acter para ser mapeado. Tambi'en se escoge el tipo de cambio de los caracteres (**resolving options**) el cual puede ser ACTRAN o DELTRAN, y escoger el tipo de mapeo para los caracteres continuos, MacClade y Mesquite son los 'unicos programas que permiten mapear tal tipo de caracteres.

Chart: En esta ventana se pueden generar cuadros de estad'isticas de los caracteres vs pasos y 'arboles (characters states/etc.) o de los cambios de caracteres, la ocurrencia de los estados a trav'es de todos los caracteres. Finalmente puede comparar dos 'arbolesresolviendo sus politomias o tal y como son.

Display: finalmente en esta ventana se manejan los aspectos gr'aficos de la

resentaci'on de los 'arboles tales como el tipo de letra, el tamaño y el estilo de la letra, el estilo y forma del 'arbol, numeraci'on de las ramas, el tamaño del 'arbol, la configuraci'on de los colores del mapeo y la simbolog'ia del los taxa (como n'umeros o nombres).

Aunque con menos capacidades que McClade , Mesquite es una herramienta poderosa, teniendo en cuenta que es gratuito. Su principal falla es que no permite ver las transformaciones en los nodos de todos los caracteres simult'aneamente. Su interfaz es muy similar a la de McClade y la distribuci'on de ventanas y comandos es m'as o menos equivalente.

A.2 B'usqueda de 'arboles

A.2.1 TNT

Autor: Goloboff et al., 2007.

Plataforma: MS-DOS, Windows, MacOS, Unix.

Disponibilidad: es posible descargar un demo funcional, para 10 corridas. El programa tiene un costo de US80.00.

http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/TNT/.

Para parsimonia, es el programa m'as r'apido que se ha desarrollado; incluye

varios tipos de b'usquedas especializadas, como la deriva y la fusi'on de 'arboles.

Al igual que NONA ,

> `proc` le permite abrir la matriz de datos o archivos de instrucciones. Para las b'usquedas puede configurar los diferentes m'etodos usando

> `ratchet` ,

> `drift` y

> `mult` ; al usar

> `?` puede ver c'uales son los parametros, y con

> `=` puede modificarlos.

> `Mult` puede usarse como la "central de b'usqueda", definiendo un n'umero de r'eplicas para una b'usqueda de Wagner y las posteriores mejoras con ratchet y drift (seg'un como est'en configurados). Para correr simplemente escriba

> `mult: replic X;` para ejecutar el n'umero de replicas que desee (X).

Con

> `tsave* nombre` se abre el archivo "nombre" para guardar 'arboles. Gu'ardelos con

> `save` y al final no olvide cerrar el archivo:

> `tsave/;`

El programa cuenta con ayuda en l'inea que puede ser consultada usando

> `help` o escribiendo

> `help comando` para un comando espec'ifico.

Este es 'unico programa que tiene directamente implementado el remuestreo sim'etrico. Adem'as tiene implementado el soporte de Bremer, el soporte relativo de Bremer, el soporte de Brtemer dentro de los l'imites del Bremer absoluto y puede calcular la cantidad de grupos soportados-contradichos (FC). Con

> `resample` usted puede configurar como quiere la permutaci'on. Con

> `subop` (tambi'en en NONA) usted puede indicar la longitud de los sub'optimos, en diferencia de pasos con respecto al 'arbol 'optimo.

> `Bsupport` hace el c'alculo del 'indice de Bremer, con un

> `*` calcula el valor relativo, o puede usar

> `Bsupport ]` para calcular el soporte relativo dentro de los l'imites del absoluto. Infortunadamente los resultados no se almacenan en ninguna parte, por lo que debe generar una salida (en formato de texto).

Versi'on de men'u Solo para Windows es bastante similar a winClada , pero esta mucho mejor organizada. Algunas funciones son:

Settings: Adem'as de las diferentes opciones de macros, manejo de memoria,

tambi'en contiene los par'ametros usados en el colapsado de ramas, consensos, y pesado impl'icito.

Analyze: Contiene los diferentes tipos de b'usquedas y sus par'ametros, el manejo de 'arboles suboptimos, y los remuestreos.

Optimize: Permite ver y dibujar sinapomorfías, mapear caracteres, y revisar estadísticos de caracteres y 'arboles (por ejemplo long o peso).

Trees: All'i se encuentran las entradas para el dibujo de arboles, el calculo soporte de Bremer, realizar consensos y super-'arboles, as'i como 'arboles al azar, y el manejador de etiquetas de los nodos (*tags*).

Data: Aparte de la configuración `[U+FFFD]` de caracteres y terminales, posee un editor b'asico de datos, que aunque muy simple, es extremadamente f'acil de manejar, y mas directo que los editores basados en mostrar la matriz (Como winClada , o Mesquite).

Usted puede encontrar un manual para el lenguaje de macros en la dirección: http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/TNT/scripts/

A.2.2 NONA

Autor: Goloboff, 1998.

Plataforma: Linux, Mac o Windows (9x o superior). Disponiblilidad: Gratuito en conjunto con otros programas en

http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/Nona-PeeWee.

Este programa es la mejor opci'on que existe para b'usquedas bajo parsimonia, dado que es gratuito, tiene lenguaje de macros y es veloz. Si est'a interesado en b'usquedas usando concavidad, puede usar PIWE ; si el inter'es son las b'usquedas de Sankoff entonces PHAST / SPA son los programas requeridos. Todos estos son similares a NONA en cuanto a comandos se refiere, y est'an incluidos con la distribuci'on de NONA .

B'asicamente los comandos de NONA son los mismos de TNT . Una diferencia importante (aparte de la velocidad y algoritmos implementados) es que en NONA los comandos son ejecutados (en vez de poder configurar sin ejecutar). A diferencia de PAUP* , no puede desactivar terminales.
Al igual que en TNT , el comando simple de b'usqueda es
> `mult` . Para permutar ramas se utiliza
> `max` . En ambos casos debe colocarse un asterisco
> `mult*; max*` para que utilice TBR como permutaci'on, en caso contrario usará SPR.
Para salvar el 'arbol, el comando es
> `sv` . La primera vez que se llama, solo abre el archivo (Debe darse como par'ametro o el programa solicita un nombre). Con

> `sv*` salva todos los 'arboles en memoria. Usando

> `ksv` se guardan los 'arboles colapsados, de lo contrario siempre se guardan dicot'omicos. Para salvar el consenso es necesario usar

> `inters .`

El 'unico m'etodo de soporte expl'icitamente implementado es el soporte de Bremer

> `bsupport` : con asterisco

> `bs*` muestra los soportes relativos, 'o de lo contrario muestra el valor absoluto. Pero el programa viene acompañado de varios programas y macros que permiten calcular *jackknife* y *bootstrap*, as'i como hacer medidas basadas en frecuencias relativas (FC).

A.2.3 Poy

Autor: Var'on et al., 2007.

Plataforma: Linux, MacOS y Windows.

Disponibilidad: gratuito.

http://research.amnh.org/scicomp/projects/poy.php

Es el 'unico programa disponible que realiza un an'alisis simultáneo sin utilizar alineamiento previo de las secuencias moleculares. Tambi'en puede usarse para realizar alineamientos, o para hacer b'usquedas convencionales de datos previamente alineados o morfol'ogicos. La versi'on actual posee 'uni-

camente una implementaci'on de parsimonia, pero se planean versiones que tambi'en realicen b'usquedas bajo m'axima verosimilitud.

El programa posee cuatro ventanas: una de salida, donde se imprimen salidas pedidas por el usuario (por ejemplo, un 'arbol, o la ayuda). Una ventana de comandos, donde se escriben las ordenes al programa, una donde muestra que clase de tarea se esta realizando y en la última donde se muestra el progreso de las b'usquedas.

Las matrices y arboles son abiertos usando

> `read(''archivo'')` , donde archivo es el archivo a leer. Puede leer multiples conjuntos de datos, bien sea abriendo uno por uno, o varios en la misma instrucci'on como

> `read(''arch1'',''arch2'')` . Los datos se van agregando. Para limpiar la memoria se utiliza

> `wipe()` .

Se buscan 'arboles con

> `build(x)` , que realiza x arboles de Wagner. Para mejorar dichos árboles hay que usar

> `swap()` . Notese que las instrucciones est'an separadas. Es posible hacer b'usquedas m'as sofisticadas usando nuevas tecnolog'ias, como ratchet implementado en

> `perturb(iterations: x, ratchet())` , donde se har'ian x iteraciones de rathcet, con

> `swap(drift)` o

> `swap(annealing)` se hace deriva de 'arboles y cristalizaci'on simulada, y

> `fuse()` hace fusi'on de 'arboles.

El comando para manejar costos es

> `transform(tcm())` . Se puede modificar los costos de transformacion para datos "est'aticos" como morfolog'ia con

```
> transform(static, weight:2)
```

que dar'ia un peso de 2 a cada transformaci'on de datos morfol'ogicos. Con

```
> transform(tcm(1,2))
```

se da un peso de 1 a las sustituciones y de 2 a los gaps y caracteres est'aticos, ese es el valor que viene por omisi'on. Con

```
> transform(fixedstates)
```

se implementa el m'etodo de estados fijos de Wheeler.

Es posible calcular soportes con

```
> calculate_support()
```

que incluye *bootstrap*, *jackknife* y soporte de Bremer (por omisi'on). Las salidas se realizan con

```
> report(''archivo'')
```

pueden ser cladogramas en formato parentical, dibujados en ascii, o en *postscript*.

Tambi'en es 'util para conocer estad'isticas de los 'arboles, las optimaciones de los nodos y la integridad de los datos.
El programa funciona desde computadoras de escritorio hasta *clusters*. Puede ejecutarse directamente en la línea de comando o en procesos de lotes.

A.2.4 PAUP*

Autor: Swofford, 2002.
Plataforma: MWindows, MacOS, Unix.
Disponibilidad: el programa para l interface gráfica tiene un costo entre US 80.00 a US150.00 dependiendo del sistema operativo y es distribuido por Sinauer, mientras que para línea de comandos es gratuito.
http://www.sinauer.com/detail.php?id=8060.

PAUP* es uno de los programas más usados en cuanto a búsquedas mediante ML, o si el sistema operativo es Mac. Dados los costos es muy posible que la interface dominante llegue a ser por línea de comandos; la interface para Windows y MacOSX en modo gráfico tiene el mismo acercamiento; como NONA y TNT tiene la opción de manejar un gran número de parametros que permiten hacer una búsqueda **sobre pedido**, adicionalmente realiza todos los consensos directamente sin necesitar un segundo programa. Su gran desventaja es su velocidad y la falta de un lenguaje de macros.

`set` :esta función define la configuración básica de algunos parámetros. Son importantes `increase=no` , para que no le pregunte si desea aumentar el número de árboles, y `maxtrees=N` para dar como opción que guarde un número de árboles (N).

`exec` : para abrir la matriz de datos o archivos de instrucciones.

`hsearch` : es la función de búsqueda de cladogramas. Las opciones de este comando son `addseq=random` , lo que asegura que la entrada de datos para el árbol de Wagner es al azar.

`swap=tbr/spr` : es el tipo de permutación.

`nreps=X` : indica el número de réplicas que se hará en la búsqueda.

`nchuck=X ckuckscore=1` : le permite usar la estrategia NONA, indicando cúantos árboles desea por réplica. Si usted desea hacer solo permutación de ramas del árbol previamente construido, la serie de instrucciones sería `search start=current chuckscore=no` .

Para guardar los árboles utilice el comando `savetre` .

Con el comando `contree` se generan los árboles de consenso. Estos deben ser guardados cuando se ejecuta el comado (parámetro `treefile=nombre` , donde nombre es el achivo.). Los métodos de medición de soporte implementados son el *bootstrap* con el comando `bootsptrap` y el *jackknife* con `jackknife` .

En caso de dudas, el programa posee una ayuda en linea, consúltela usando `help` o escribiendo `help comando` para un comando específico; para ver las

opciones del comando use `comando ?` .

A.2.5 MrBayes

Autor: Ronquist et al., 2005.

Plataforma: Windows, MacOS, Unix.

Disponibilidad: gratuito.

http://mrbayes.net

Es el programa m'as com'unmente usado para an'alisis bayesiano. Es gratuito y su interfaz es muy similar a la de PAUP*. Los principales comandos del programa son descritos en el capitulo de an'alisis bayesiano. El tutorial incluido es muy completo y viene incluido dentro del programa.

Una de las características más interesantes es la implementación de los "modelos" usados para caracteres morfológicos (Lewis, 2001), así como el modelo de 'parsimonia' tal y como fue descrito por Tuffley & Steel (1997) que se activa usando

```
> lset parsmodel=yes;
```

Formatos de archivos

B.1 Formatos de matrices

B.1.1 NONA

Es v'alido para NONA , TNT , Hennig86 (formato de morfolog'ia de POY) y WinClada ; comienza con

> `xread` , luego el n'umero de caracteres y el n'umero de taxa, los polimórficos entre paréntesis angulares y los desconocidos con

> `-` o

> `?` . Al final, un punto y coma y si se desea la aditividad de los caracteres (comenzando desde 0). Termina con

> `p/` o

> `p-` , que los programas interpretan como fin del archivo.

```
> xread 'Matriz ejemplo' 5 5
```

```
out 00000

alpha 10-20

beta 1102[01]

gamma 1?111

lamda 11111

;

cc -0.2 +3 -4;

p/;
```

Para ADN (en NONA) se usa

> `dread` , con la clausula

> `gap` seguida de

> `?` si se quieren asumir los *gaps* como desconocidos, o con

> `;` si quiere que sean un quinto estado. Se usa codificaci'on tipo IUPAC.

```
> dread gap ; match .  'DNA' 5 5

out ACGTC

alpha AT-CG

beta RTAAC

gamma CGAY-
```

```
lamda TCNCC

;

cc -.;

p/;
```

B.1.2 PAUP*

Se inicia con la clausula `#nexus` , y luego con el bloque `data` . se puede definir si los caractertes son morfológicos, ADN o proteínas. Los polimórfismos se colocan entre par'entesis redondos. ADN en formato IUPAC.

```
#nexus

begin data;

dimensions ntax=5 nchar=5;

format missing=?  gap=- symbols="0 1 2";

matrix

out 00000

alpha 10-20

beta 1102(01)

gamma 1?111

lamda 11111

;
```

```
end;

begin assumptions;

typeset tipoUno=unord:1-3 5, ord:4;

end;

begin paup;

[Aqui puede colocar instrucciones específicas de paup, por ejemplo búsquedas]

hsearch add=random;

end;



#nexus

begin data;

dimensions ntax=5 nchar=5;

format missing=?  gap=- datatype=dna;

matrix

out ACGTC

alpha AT-CG

beta RTAAC

gamma CGAY-

lamda TCNCC

;

end;
```

B.1.3 MALIGN

El esquema de MALIGN es similar al de GenBank.

```
> SequenceA

1 CAGCAGCACG CAAATTACCC ACTCCCGGCA CGGGAGGGTA GTGACGAAAA ATAACAATAC

61 CCGTC


SequenceB

1 CAGGCACGCA AATTACCCAC TCCCGGCAGA GGTAGTGACA AAAAATAACG ATACGGGACT

61 CCGTCAC


SequenceC

1 GGCACGGAGG TAGTGACGAA AAATAACGAT ACGGGACTCA TCCGAGGCCC CGTAATCGGA


SequenceD

1 AAATTACCCA CTCCCGGCAC GGAGGTAGTG ACGAAAAATA ACGATACGGG ACTCA


SequenceE

1 GAGGTAGTGA CGAAAAATAA CAATACAGGA CTCATATCCG AGGCCCTGTA ATT
```

(Para proteinas, el asterisco "*" forza la interpretaci'on como proteina)

```
> SequenceF
1 ILAVEELVI SLIVES

SequenceG*
1 AAYVTTTCC KKYK
```

B.1.4 POY

POY y Clustal , utilizan el formato de FASTA (la primera l'inea tiene un > seguido por el nombre y comentarios de la secuencia; la siguiente l'inea comienza la secuencia como tal).

```
> > taxonA Comentarios
aaacgt
aac
> taxonB
aaacgt
```

B.2 Formatos de 'arboles

B.2.1 NONA

NONA , Hennig86 , WinClada y TNT usan este formato; con

> `*` indican que hay mas 'arboles y con

> `;` que es el 'ultimo 'arbol. N'otese el espacio para separar los terminales. El primer taxon es 0. Al igual que en las matrices,

> `p-` o

> `p/` indican el final de lectura del archivo. Winclada puede incluir al incio la lista de nombres, pero no es compatible con otros programas.

```
> tread 'tres arboles'

(0 (1 (2 (3 4 ))))*

(0 (1 (2 3 4 )))*

(0 ((1 2 )(3 4 )));

p/;
```

```
> tread 'solo un arbol'
```

```
(0 (1 (2 (3 4 ))));

p/;
```

B.2.2 PAUP*

En PAUP* el 'arbol est'a embebido en el archivo de la matriz o en un formato aparte. Los grupos son separados por comas y el primer taxon es 1.

```
> #nexus


begin trees;

translate

1 lamda,

2 alpha,

3 beta,

4 gamma,

5 out

;

tree *primero=(5,(1,(2,(3,4))));

tree politomico=(5,(1,(2,3,4)));

tree tercero=(5,((1,2),(3,4)));
```

```
end;
```

El orden no altera los 'arboles en los programas. As'i:

```
> (0,(1,(2,(3,4))))
```

es igual a

```
> ((1,((3,4),2)),0)
```