

CAPÍTULO 4

CARACTERES TAXONÓMICOS

MARGARÍA, CECILIA Y ANALÍA A. LANTERI



DEFINICIÓN DE CARÁCTER TAXONÓMICO

Los caracteres taxonómicos son atributos utilizados para distinguir los miembros de un taxón, de los miembros de otro taxón (Mayr & Ashlock, 1991), o atributos heredables cuya variación permite diferenciar grupos o taxones (Smith, 1994). Las distintas alternativas o variantes de un carácter se denominan estados de caracteres (Pimentel & Riggins, 1987) e.g. forma de las antenas: geniculadas, moniliformes o filiformes; color de los pétalos: blancos o rojos.

Las definiciones previamente mencionadas responden a criterios taxonómicos tradicionales, ya que enfatizan los aspectos diagnósticos de los caracteres, es decir aquellos que habitualmente se emplean en las claves dicotómicas para identificar taxones (Kitching *et al.*, 1998). En el contexto de la Sistemática Filogenética o Cladística los caracteres equivalen a "series de transformación" de estados homólogos (Mickey, 1982; Kitching *et al.*, 1998). Por eso Farris *et al.* (1970) definen a los caracteres como "colecciones de estados mutuamente exclusivos que tienen un orden fijo y una evolución, de modo que cada estado se deriva de otro y hay un único estado a partir del cual derivan en última instancia todos los demás".

La observación y el registro de caracteres es un paso fundamental de la práctica taxonómica, pues del mismo dependen la correcta delimitación de las especies y su clasificación en taxones superiores. Los caracteres deben ser independientes unos de otros y no proporcionar información redundante (Mayr & Ashlock, 1991). La independencia implica que cada carácter puede haber seguido un camino evolutivo diferente (Wiley, 1981; Schuh, 2000). Por ejemplo, el extremo terminal del ovipositor de algunos gorgojos que oviponen en el suelo presenta un par de estructuras (hemiesternitos o coxitas) en forma de uñas fuertemente esclerotizadas; en las especies que oviponen sobre las plantas dichas estructuras tienen forma de valvas y están poco esclerotizadas; si "forma" y "grado de esclerotización" de los hemiesternitos fueran caracteres funcionalmente correlacionados (= ligados por la ontogenia), ambos deberían considerarse como un único carácter, pues su información sería redundante. Las decisiones sobre cuáles y cuántos caracteres registrar, y cuáles y cuántos estados forman parte de una misma serie de transformación, son fundamentales para el análisis cladístico, ya que pueden afectar el principio de independencia y distorsionar los resultados de dicho análisis (ver Capítulo 8).

Existen varias clasificaciones posibles de los caracteres; en este capítulo se desarrollarán dos, la que los separa en discretos y continuos, en función de las propiedades matemáticas del rango de números usados para medir un determinado atributo (Kitching *et al.*, 1998) y la que los agrupa de acuerdo con la fuente de información de la cual provienen (Wiley, 1981; Mayr & Ashlock, 1991).

CARACTERES DISCRETOS Y CONTINUOS

Los caracteres utilizados en estudios sistemáticos numéricos, se clasifican en **discretos y cuantitativos continuos** (Kitching *et al.*, 1998; Schuh, 2000). Los datos discretos se expresan lógicamente

mediante valores enteros, que representan un subconjunto de todos los valores posibles, e.g. número de espinas presentes en las tibias de un insecto igual a 8, 10 o 12. Los caracteres cuantitativos de variación continua registran valores infinitesimalmente próximos dentro de un rango, de modo que no es posible asignarles valores enteros, e.g. largo de las tibias de un insecto medido en milímetros.

Cuando en los caracteres cualitativos se observan discontinuidades, es posible distinguir dos o más estados de caracteres, los cuales si se quieren analizar numéricamente, deben ser codificados. Codificar significa asignar un código alfanumérico a cada estado, e.g. forma de las escamas, lanceoladas (0), redondas (1) ovoides (2). Los caracteres cuantitativos continuos no requieren de codificación, aunque si se registran discontinuidades, también se pueden expresar como variables discretas e.g. rostro 1-2 veces más largo que ancho, o 3-4 veces más largo que ancho. En la tabla I se brindan ejemplos de datos discretos y continuos, de uso frecuente en Sistemática:

Tabla I. Ejemplos de caracteres discretos y continuos.

A. Caracteres discretos

- Cualitativos doble-estado: Simetría radial (0), bilateral (1)
Ojos convexos (0), aplanados (1)
Flagelo ausente (0), presente (1)
Sitio de restricción ausente (0), presente (1)
Electromorfo ausente (0), presente (1)
Inversión cromosómica ausente (0), presente (1)
- Cualitativos multiestado: Tegumento liso (0), tuberculado (1), canaliculado (2)
Tegumento desnudo (0), con setas (1), con escamas (2)
Bases nitrogenadas del ADN: adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T)
- Caracteres merísticos: Número cromosómico $n = 11$, $n = 22$, $n = 26$
- Continuos transformados en discretos: Fémures 2 a 3 veces tan largos como anchos (1), 4 a 5 veces tan largos como anchos (2)

B. Caracteres continuos

Datos morfométricos

- Medidas: Largos o anchos en micras, milímetros, centímetros, etc.
- Proporciones: Largo sobre ancho, ancho sobre ancho, largo sobre largo de determinadas estructuras.
- Variables obtenidas a partir de *landmarks* (= puntos de referencia) o coordenadas de contornos.

Datos expresados como distancias

- Distancias inmunológicas, distancias obtenidas mediante análisis de fragmentos y otros datos moleculares que pueden transformarse en distancias.

Datos expresados como frecuencias

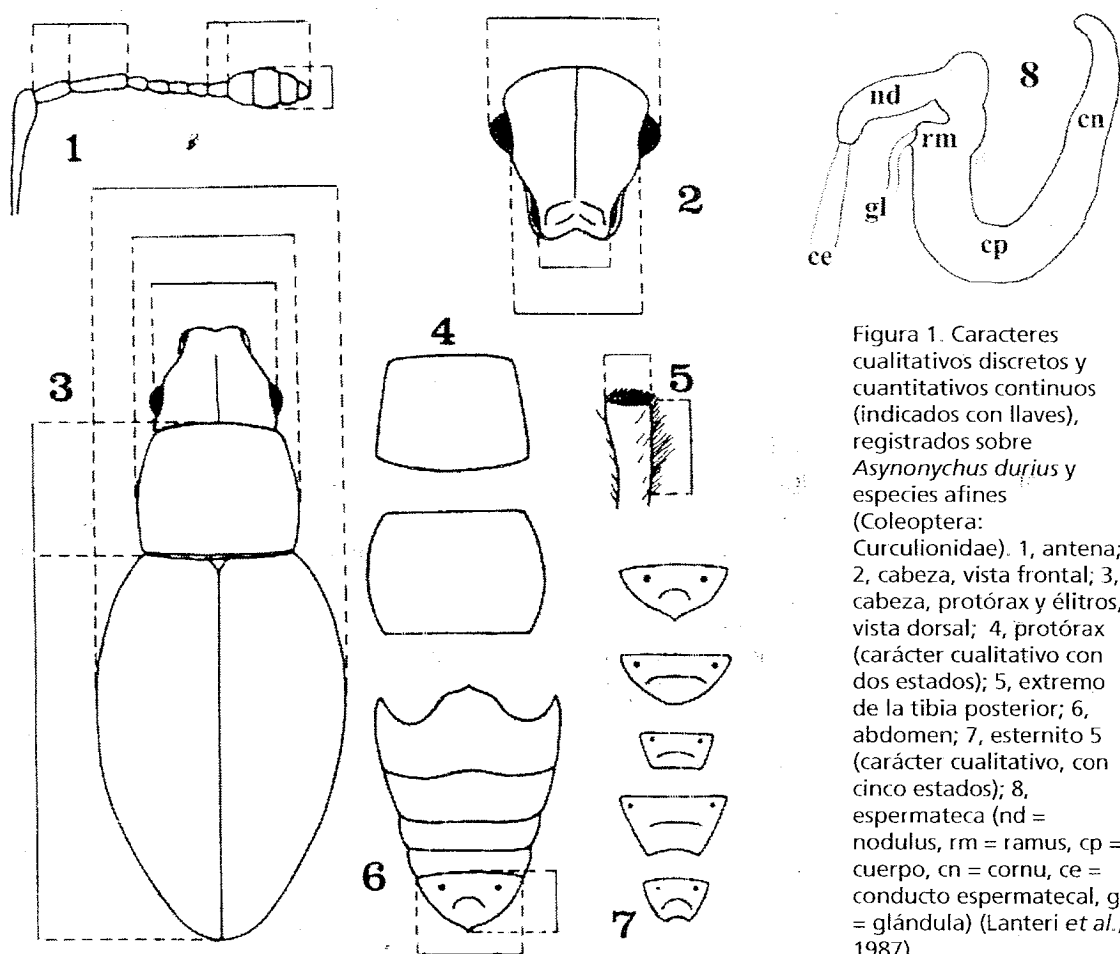
- Frecuencias alélicas, alozímicas, de reordenamientos cromosómicos, etc.

Algunos autores han señalado que la diferencia entre caracteres cuali y cuantitativos es subjetiva, ya que no constituye una propiedad intrínseca de los organismos (Stevens, 1991). Ciertas diferencias morfológicas cualitativas suelen ser mejor representadas mediante datos morfométricos, es decir, por características cuantificables de la forma, tales como proporciones largo sobre ancho de una estructura (Rohlf & Marcus, 1993; Marcus *et al.*, 1996). Asimismo en las descripciones de los taxones suelen emplearse expresiones tales como "élitros dos veces más largos que el protórax o tres veces más largos que el protórax", las cuales denotan variables cualitativas expresadas como cuantitativas discretas (Schuh, 2000).

Las variables discretas se analizan principalmente por los métodos de Parsimonia propuestos por la Cladística, que se aplican en estudios filogenéticos entre especies o taxones superiores

(ver Capítulos 8-10). Las variables continuas, en cambio, se analizan mediante técnicas numéricas asociadas con la Fenética y métodos de distancias, aplicados generalmente a nivel infraespecífico, o para delimitar especies próximas (ver Capítulos 6 y 7).

Los datos cuantitativos continuos también suelen ser objeto de tratamientos estadísticos que proporcionan información sobre rangos y medias de las variables estudiadas, medidas alrededor de la media (varianza, desviación estándar, coeficientes de variación) y/o estadísticos inferenciales (error estándar, límites de confianza) (Wiley, 1981). En la figura 1 se ilustran algunos de los caracteres cualitativos y cuantitativos (= morfométricos) registrados en un trabajo taxonómico realizado sobre un grupo de especies de insectos (Lanteri *et al.*, 1987).



Los datos morfométricos se registran mediante instrumentos tales como calibres, reglas, cintas métricas, compases, oculares micrométricos, etc. (Morfometría tradicional) o por medio de instrumental tecnológicamente más complejo, como tabletas digitalizadoras, video digitalizadores y digitalizadores de tres dimensiones (Morfometría geométrica). Las distancias lineales proporcionan generalmente información incompleta (y a veces redundante) acerca de la forma, pues no permiten discernir cuál es la localización específica donde se halla la variación (Rohlf & Marcus, 1993). Las técnicas de Morfometría geométrica, en cambio, permiten analizar la variación de la forma y el tamaño de las estructuras, con un nivel de detalle mayor que la Morfometría tradicional basada en análisis de colecciones de medidas (= distancias, proporciones, ángulos). Sin embargo, se ha señalado que las distancias entre puntos siguen siendo fuentes importantes de información morfométrica (Pérez, 2003).

Cuando se emplean técnicas de Morfometría geométrica (ver Capítulo 7), el elemento morfológico se caracteriza por una serie de puntos denominados *landmarks* (= puntos de refe-

rencia), que se ubican en suturas, forámenes, u otras zonas de yuxtaposición de tejidos, o en puntos de máxima curvatura, puntos extremos o de inflexión de una estructura (Bookstein, 1991) (Fig. 2). En análisis morfométricos se pueden utilizar además coordenadas de contornos.

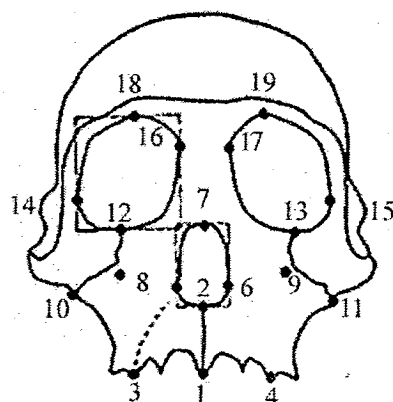


Figura 2. Landmarks del cráneo utilizados frecuentemente en taxonomía de homínidos (modificado de Guy *et al.* 2003).

CLASIFICACIÓN DE CARACTERES SEGÚN SUS FUENTES

La evidencia morfológica ha sido tradicionalmente la principal fuente de información en Taxonomía, excepto para algunos grupos como bacterias, protistas y virus (Wiley, 1981). La mayoría de los taxones actuales y extinguidos se han descrito sobre la base de datos morfológicos, información biogeográfica y en algunos casos, de nicho ecológico. Sin embargo, la historia demuestra que los taxónomos no han cesado de buscar nuevas fuentes de información para resolver problemas relativos a la delimitación de las especies y la reconstrucción filogenética. En la Tabla II se brinda una clasificación posible de los caracteres según sus fuentes, adaptada a partir de aquéllas propuestas por Wiley (1981) y Mayr & Ashlock (1991). La mayoría de los caracteres mencionados en la tabla II son intrínsecos, pues están sujetos a las leyes de la herencia, pero ciertos caracteres como las asociaciones de huéspedes o los datos biogeográficos son extrínsecos (Schuh, 2000).

Tabla II: Tipos de caracteres según sus fuentes.

1. Morfológicos

- Morfológicos externos (e.g. color, forma, tamaño)
- Morfológicos internos (= anatomía)
- Morfología de estructuras especiales (e.g. genitalia de insectos, granos de polen)
- Embriológicos (e.g. tipo de huevo, blástula, gástrula)
- Citológicos e histológicos (e.g. presencia de cilios o flagelos, de vacuolas pulsátiles, de determinado tipo de células en diferentes tejidos)

2. Fisiológicos

- Factores metabólicos (e.g. regulación de la temperatura corporal, respiración aeróbica o anaeróbica, presencia o no de diapausa invernal o estival)
- Secreciones corporales (e.g. tipo de hormonas de crecimiento o sexuales, secreciones glandulares relacionadas con funciones defensivas, etc.)

3. Cromosómicos o cariológicos

- Número cromosómico
- Forma y tamaño de los cromosomas
- Presencia de reordenamientos cromosómicos (e.g. inversiones, duplicaciones o translocaciones)

4. Moleculares proteicos

- Diferencias electroforéticas (e.g. en isoenzimas, aloenzimas o proteínas estructurales)
- Secuencias de aminoácidos
- Distancias inmunológicas

5. Moleculares del ADN

- Secuencias del ADN de genes particulares (nucleares, mitocondriales, de los cloroplastos y ribosomales)
- Análisis mediante endonucleasas de restricción (e.g. AFLP, RFLP)
- Datos obtenidos a partir de técnicas de hibridación de ADN, y otros marcadores moleculares (e.g. RAPD)

6. Ecológicos

- Habitat y hospedadores (e.g. preferencias o restricciones de hábitat, especificidad de nicho ecológico, etc.)
- Tipo de alimento consumido (e.g. organismos de hábitos herbívoros, carnívoros, omnívoros, detritívoros)
- Rol ecológico (e.g. consumidores primarios, secundarios, depredadores)
- Organismos asociados (e.g. parásitos, endosimbiontes, patógenos, etc.)

7. Etológicos (= comportamiento)

- Mecanismos de cortejo previo a la cópula
- Mecanismos defensivos y otros patrones de comportamiento

8. Biogeográficos

- Patrones biogeográficos (e.g. región, provincia o distrito biogeográfico en que se distribuye un taxón)
- Relaciones de simpatria-alopatria entre distintos taxones

Caracteres morfológicos versus otro tipo de caracteres

Un carácter morfológico es un atributo estructural del organismo generalmente referido a su tamaño, forma, color o patrón de coloración (Wiley, 1981). Las estructuras que pueden ser contadas (e.g. datos merísticos como el número de estambres, de espinas, de dientes, etc.) o medidas (e.g. datos morfométricos como longitud, ancho, volumen) proporcionan datos morfológicos.

La evidencia morfológica se registra a nivel celular o de ultraestructuras celulares, tisulares, de órganos, sistemas de órganos, y en estructuras especiales tales como genitalia de insectos y granos de polen (Mayr & Ashlock, 1991). Para el registro y observación de algunos caracteres morfológicos se debe recurrir a la realización de disecciones, o a la aplicación de técnicas histoquímicas o microscópicas particulares (e.g. microscopía electrónica de barrido, tinción de estructuras citológicas, etc.). Otros tipos de caracteres, por ejemplo ecológicos, etológicos y fisiológicos, pueden resultar de gran utilidad para resolver problemas sistemáticos, pero por lo general no se dispone de información suficiente al respecto y en consecuencia su uso es limitado (Schmidt-Nielsen, 1979; Wenzel, 1992).

El empleo de caracteres morfológicos en Sistemática brinda ciertas ventajas, ya que suelen ser fáciles de observar y/o requieren instrumental y técnicas relativamente sencillas, en comparación con aquéllas que se emplean para el registro de otros caracteres como los datos moleculares

filogenética, los datos morfológicos suelen ser insuficientes para resolver adecuadamente relaciones genealógicas y es preciso emplear otros caracteres, por ejemplo datos moleculares del ADN (Hillis & Wiens, 2000).

La Sistemática molecular se ha desarrollado rápidamente durante las últimas dos décadas, como consecuencia de las grandes innovaciones tecnológicas en el campo de la Biología molecular (Hillis & Moritz, 1990; Soltis *et al.*, 1998) y esto ha provocado importantes cambios en lo que respecta al registro y análisis de caracteres. Debido a la gran importancia de los caracteres moleculares del ADN en Sistemática, se brindará un mayor detalle sobre los fundamentos de las técnicas empleadas para su obtención. También se detallarán los caracteres registrados a partir de los cromosomas y mediante distintos marcadores moleculares (proteicos y del ADN), cuyas técnicas de estudio se consideran precursoras de las más avanzadas de secuenciación del ADN.

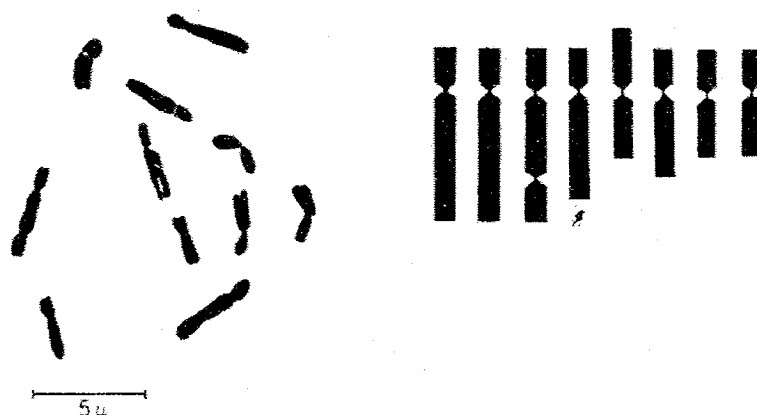
Caracteres cromosómicos (= cariológicos)

El descubrimiento de que en células tratadas en un medio hipotónico es posible observar la dispersión de los cromosomas metafásicos, dio lugar al estudio detallado de su número, tamaño y morfología, principalmente a partir de la década del 50 (Hillis & Moritz, 1990). Para observar este tipo de caracteres se emplean técnicas de Citogenética tradicional, *in vivo* o *in vitro* (= utilizando cultivos de tejidos). Éstas siguen una serie de pasos que incluyen la selección de tejidos con alta actividad mitótica o de fácil estimulación por agentes mitogénicos (e.g. médula ósea, epitelios o tejidos embrionarios en animales), el tratamiento de dichas células en una solución hipotónica, la inhibición del huso mitótico para bloquear las células en metafase (generalmente se usa colchicina), la fijación del material y la confección de preparados cromosómicos por aplastado (= *squash*) o goteo (*splash*) sobre un portaobjetos (Hillis & Moritz, 1990). Mediante la observación detallada de estos preparados se puede llegar a conocer el cariotipo de un individuo o especie, y confeccionar un idiograma (Fig. 3).

Cariotipo: es el conjunto sistemáticamente ordenado de los cromosomas de una célula, registrado a partir de una fotografía o dibujo, que por extensión representa el complemento cromosómico del individuo y de la especie. Permite observar características tales como el número y tamaño relativo de los cromosomas, y la posición del centrómero y constricciones secundarias.

Idiograma (Fig. 3): es la representación esquemática del complemento cromosómico de una especie obtenida por la medición de un número estadísticamente significativo de cariotipos.

Figura 3. Cromosomas (izquierda) e idiograma (derecha) de una especie hipotética. En este último se pueden observar el número, forma y tamaño de los cromosomas.



En la tabla II se brinda una lista de caracteres cromosómicos utilizados en estudios sistemáticos y/o filogenéticos. El número cromosómico por lo general se incluye en los trabajos sistemáticos sobre plantas vasculares, grupo para el cual se dispone de información bastante completa al respecto (Grant, 1971); por lo contrario, el número cromosómico de la mayoría de las especies animales es aun desconocido (Wiley, 1981; Mayr & Ashlock, 1991). Existe una gran variación en el número cromosómico, tanto de las especies vegetales como animales, e.g. números somáticos ($2n$) extremos de algunas especies de plantas son los siguientes: *Haplopappus gracilis* (Compositae)

$2n=4$; *Ophioglossum reticulatum* (Pteridophyta) $2n=1260$. Algunos números haploides (x) conocidos para animales son: *Drosophila melanogaster* (Insecta, Diptera) $x=4$; *Ctenomys occultus* (Mammalia, Rodentia) $x=70$. Las variaciones en número cromosómico se dan a diferentes niveles taxonómicos, e.g. en anuros dicho número suele ser constante a nivel de géneros y familias, en insectos lepidópteros, en cambio, varía generalmente a nivel de especies.

La presencia de poliploidía ha tenido una gran importancia en la especiación de las plantas vasculares, dado que el 40% de las angiospermas son de origen poliploide (Grant, 1971). Asimismo en ciertos grupos de animales, como los gorgojos (Coleoptera: Curculionidae) se ha descubierto un número creciente de razas poliploides, incluyendo formas triploides ($3x$) (las más frecuentes) hasta decaploides ($10x$) y también formas aneuploides (Saura et al., 1993).

Los reordenamientos cromosómicos suelen acompañar procesos de especiación, funcionando como barreras gaméticas, y provocando esterilidad, inviabilidad o escasa fecundidad en los híbridos, de allí la importancia de estos caracteres para reconocer especies próximas, especialmente en el caso de los mamíferos (Reig, 1984; Bianchi et al., 1985; Bidau et al., 1996).

Tabla II: Lista de caracteres cromosómicos

a) Número cromosómico:

- Cambios que afectan a todo el complemento haploide: *euploidía*. El cambio más frecuente es la poliploidía (aumento de la dotación cromosómica completa). Puede haber alopoliploidía o autopoliploidía, según el origen del cambio sea o no por hibridación.
- Cambios que afectan parte del complemento haploide: *aneuploidía*. En este caso hay ganancia o pérdida de uno o más cromosomas por fusión o fisión.

b) Forma y tamaño de los cromosomas:

Está determinada principalmente por la posición del centrómero y el largo relativo de los brazos, como así también por la presencia de constricciones secundarias. De acuerdo con su morfología los cromosomas se dividen en metacéntricos, submetacéntricos, acrocéntricos y telocéntricos.

c) Presencia de reordenamientos, reorganizaciones o mutaciones cromosómicas:

- *Inversiones*: cambios de posición de un fragmento intracromosómico. Las inversiones pueden ser pericéntricas (están involucrados fragmentos ubicados a ambos lados del centrómero) o paracéntricas (están involucrados fragmentos ubicados a un lado del centrómero).
- *Duplicaciones*: presencia doble de un mismo fragmento cromosómico.
- *Translocaciones*: intercambio de fragmentos entre cromosomas no homólogos. Las translocaciones pueden ser recíprocas o robertsonianas (no incluyen al centrómero), o fusiones y fisiones (incluyen al centrómero y suelen provocar disminución o aumento del número cromosómico).
- *Deleciones*: ruptura y pérdida de fragmentos cromosómicos.
- *Inserciones*: ganancia de fragmentos cromosómicos.

Técnicas de bandeo cromosómico

Las técnicas de bandeo cromosómico constituyeron un importante avance tanto para la identificación de cromosomas homólogos (de cariotipos de una misma especie) como homeólogos (entre cariotipos de distintas especies), pues permiten individualizar cada par cromosómico por su modelo de bandas, lo que significa caracterizar cada cromosoma por la distribución de bases del ADN (Dulout, 1979). Estas técnicas de citogenética molecular son numerosas y variadas; la primera, fue propuesta en 1958, empleaba mostaza de quinacrina y el patrón de bandas resultante era visible en un microscopio de fluorescencia; hacia 1970 se desarrollaron otras técnicas como los bandeos C, G, Q y R. El bandeo G es uno de los más frecuentemente utilizados, emplea colorante de Giemsa y produce bandas transversales oscuras en las regiones ricas en adenina-timina. En el bandeo C se tiñen de color oscuro zonas de heterocromatina constitutiva formadas por secuencias de ADN altamente repetidas (Solari, 1999). Estas bandas suelen ubicarse en regiones pericentroméricas y teloméricas, y con menos frecuencia en zonas intersticiales del

cromosoma (Sánchez & Confalonieri, 1993). La presencia-ausencia de determinadas bandas puede registrarse como carácter taxonómico (Borowik, 1995) (Fig. 4), aunque en algunos casos (e.g. bandas C) pueden aparecer en estado polimórfico dentro de una misma especie. A nivel poblacional, también se emplean como caracteres cromosómicos, las frecuencias de determinados reordenamientos (ver Capítulo 6).

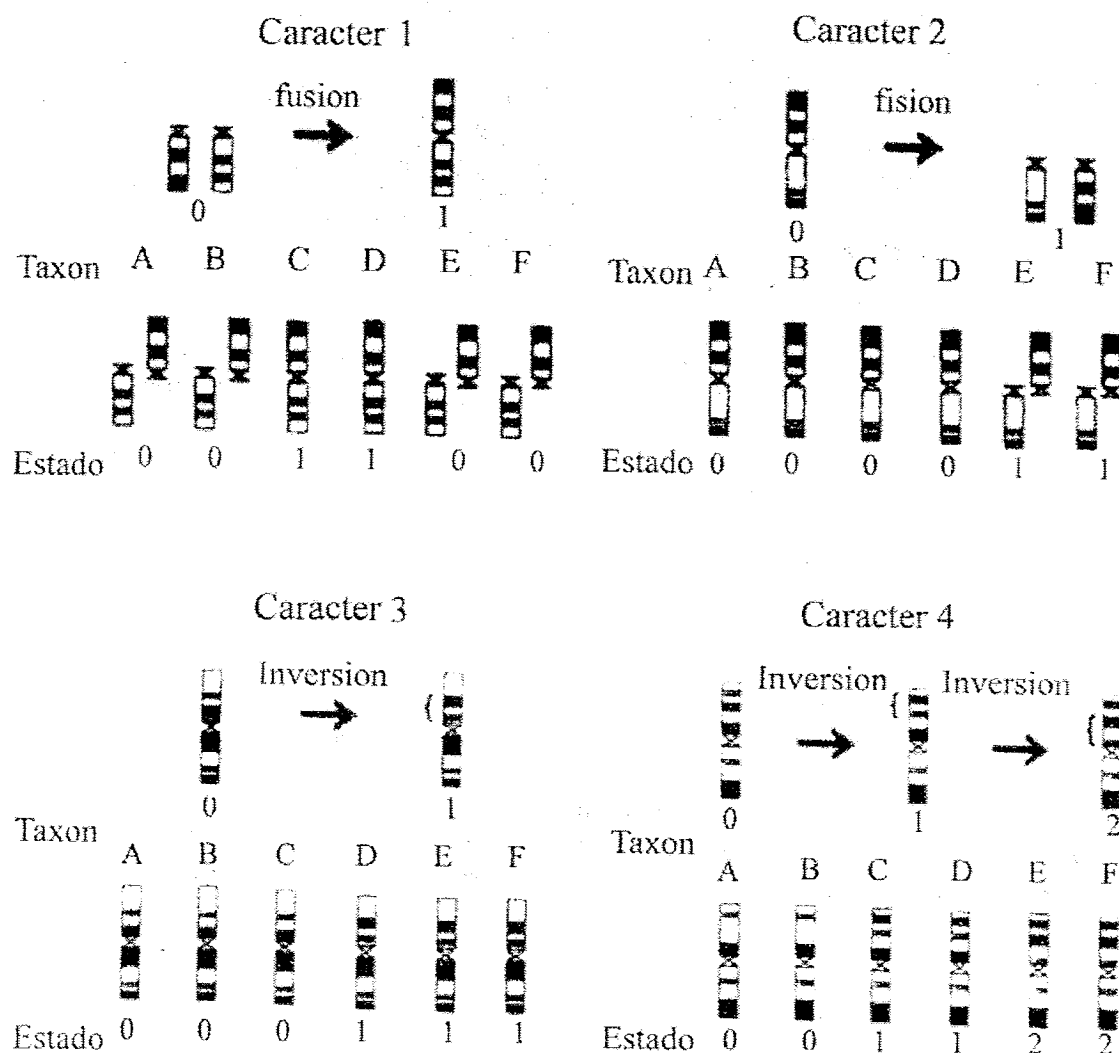


Figura 4. Presencia-ausencia de fusiones o fisiones cromosómicas (caracteres 1 y 2) o de inversiones (caracteres 3-4). Las inversiones pueden ser independientes (carácter 3) o dependientes (carácter 4), es decir, derivadas de inversiones previas, en cuyo caso se consideran como caracteres con más de dos estados. Por debajo de las ilustraciones se indica la codificación de los estados de caracteres según Borowik (1995).

Se denominan **cromosomas compartidos**, los cromosomas de distintas especies, que presentan: a) igual tamaño y morfología; b) igual cronología y modelo de duplicación; c) igual distribución y tipo de bandas (Fig. 5). En la década del 70 se publicaron numerosos trabajos sobre cariotipo humano ($n = 23$) comparado con el del chimpancé ($n = 24$), los cuales demostraron que ambas especies comparten 11 pares de cromosomas (cromosomas 3, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 19, 21, 22 y X) (Dulout, 1979).

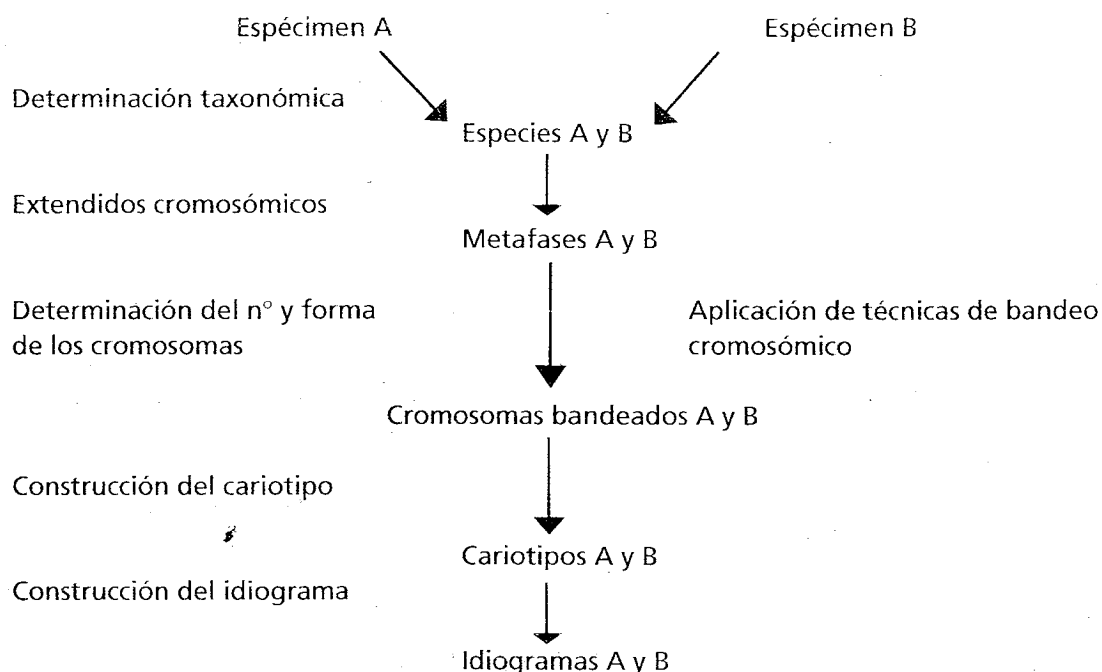


Figura 5: Pasos a seguir para identificar cromosomas compartidos (modificado de Olivero *et al.*, 1987).

Técnicas de hibridación *in situ*

Uno de los últimos avances en el campo de la citogenética molecular lo representan las técnicas de hibridación *in situ*, que emplean sondas de ácidos nucleicos marcadas radiativamente o mediante elementos de tinción, sobre preparados cromosómicos. De este modo es posible localizar secuencias de ADN específicas, en cromosomas o partes de cromosomas particulares (Bennett, 1995). Estas técnicas son las más simples y directas para el mapeo físico de los genes en los cromosomas. Los mapas cromosómicos indican la secuencias y distancia de los genes en los cromosomas y tienen numerosas aplicaciones, entre ellas el reconocimiento de híbridos y la identificación de sus especies parentales (Poggio *et al.*, 1999).

Caracteres moleculares proteicos

Las proteínas son macromoléculas poliméricas formadas por uno, dos o más polipéptidos, los cuales incluyen secuencias de aminoácidos ligados por uniones peptídicas covalentes. La secuencia de aminoácidos de una proteína se conoce como su estructura primaria, y está determinada por la secuencia de bases nitrogenadas del ADN, de modo que estudiando la composición de las proteínas se puede obtener información acerca de la constitución genética de los individuos y de las especies. Por ejemplo, la sustitución de los nucleótidos AAG por GAG en el ADN, determina la sustitución del aminoácido denominado ácido glutámico, por el aminoácido lisina (Tamarín, 1996).

El empleo de técnicas de electroforesis aplicadas al análisis de proteínas enzimáticas y no enzimáticas tuvo un gran desarrollo a partir de la década del 60 y ha disminuido desde principios de la década del 90 hasta la actualidad, en la medida que aumentaron las posibilidades de manipulación del ADN (Soltis *et al.*, 1998). La electroforesis se basa en la propiedad de las proteínas de migrar en un campo eléctrico, y en el supuesto de que la movilidad de las proteínas de distintas especies, reflejará diferencias en la secuencia de sus aminoácidos (Hillis & Moritz, 1990). Se ha aplicado para separar **isoenzimas** (formas funcionalmente similares de enzimas, incluyendo polímeros producidos por diferentes *loci* génicos, o por diferentes alelos del mismo *locus*) y **aloenzimas** (conjunto de isoenzimas que representan diferentes alelos del mismo *locus* génico).

Para realizar una corrida electroforética es preciso contar con una fuente de poder (generador), dos cubas, un puente de unión, una solución *buffer* (regula el pH en que se realiza la corrida) y un soporte (gel de almidón o de poliacrilamida). Una vez sembradas en el so-

porte embebido en el *buffer* y establecido el campo eléctrico, las proteínas migrarán hacia el ánodo (positivo) con una velocidad que dependerá de su carga electrostática neta, su tamaño y su configuración estructural. La carga electrostática de las proteínas se debe a que cinco de los 20 aminoácidos que las forman, son o bien básicos y están cargados positivamente (radical amino NH_3^+ en los aminoácidos lisina, arginina e histidina), o bien ácidos y están cargados negativamente (radical carboxilo COO^- en los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico).

La coloración histoquímica o revelado de los geles donde se ha realizado la corrida electroforética, permite observar patrones de bandas. Dependiendo del tipo de revelado del gel, se podrá detectar la fracción proteica total (método de electroforesis de proteínas totales) o un determinado sistema enzimático (método de electroforesis de isoenzimas), de modo que cada banda coloreada o electromorfo representa una fracción proteica. La presencia/ausencia de bandas, en el caso del método de proteínas totales, como también su posición y grosor, se pueden registrar como caracteres taxonómicos (Fig. 6). En el caso del método de electroforesis de isoenzimas, los datos electroforéticos se expresan como frecuencias alélicas o alozímicas (es decir, como variables continuas) ya que puede inferirse el control genético de las distintas bandas (Confalonieri *et al.*, 1990).

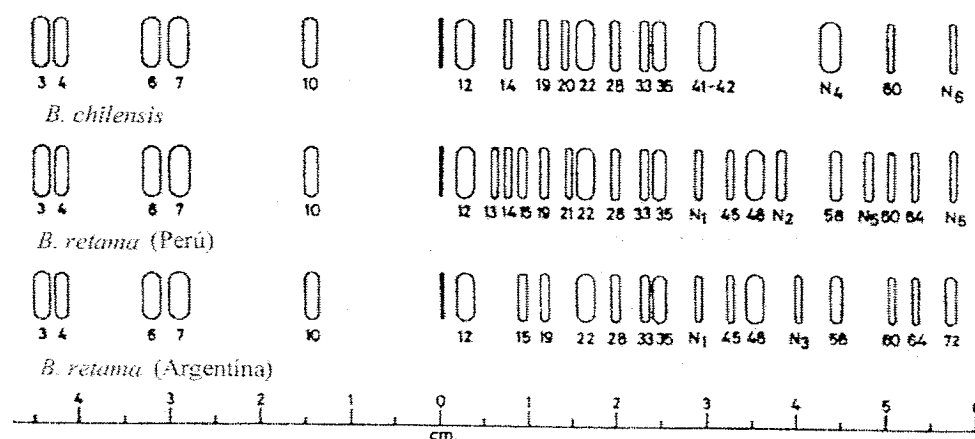


Figura 6. Representación esquemática del patrón de bandas de proteínas seminales de *Bulnesia chilensis* y *B. retama* (poblaciones de Argentina y Perú) (Zygophyllaceae) (Comas *et al.*, 1984). Cada una de las bandas o electromorfos se consideró un carácter presente o ausente. El cero de la escala indica el lugar de siembra de las muestras proteicas.

La electroforesis de isoenzimas ha sido muy utilizada para analizar relaciones filogenéticas entre taxa, hasta fines de la década del 80 (Crawford, 1983), pero a partir de entonces fue reemplazada por los marcadores moleculares del ADN. Entre las limitaciones de la electroforesis de isoenzimas cabe señalar las siguientes (Schuh, 2000): a) el número de caracteres que provee es menor con respecto a los datos que proporciona el ADN (existen 64 codones del ADN para codificar 20 aminoácidos y por lo tanto ciertas sustituciones de nucleótidos no se reflejarán en las proteínas); b) numerosos taxa son polimorfos para ciertos productos proteicos; c) la información común entre taxa suele ser escasa, de modo que aparecen bandas únicas para cada taxón, que son irrelevantes para agrupar taxa; d) existen inconvenientes para la determinación de las homologías de los caracteres proteicos. No obstante estas limitaciones, la electroforesis proteica, en especial de isoenzimas, es considerada por muchos especialistas como una herramienta de gran utilidad para el reconocimiento de especies próximas y para el estudio de la variabilidad genética poblacional, flujo génico e hibridación (Arnold & Emms, 1998).

Otras técnicas que han sido empleadas para el estudio de proteínas no enzimáticas (e.g. hemoglobina, albúminas del suero), con fines sistemáticos y filogenéticos, son las de secuenciación de aminoácidos (Gorr *et al.*, 1991) y las técnicas inmunológicas (e.g. Fijación de Microcomplemento

o MC'F), basadas en el grado de reactividad antígeno-anticuerpo de las especies comparadas y su especificidad con respecto a determinados antígenos (Maxson & Maxson, 1986). En la actualidad estas técnicas, al igual que los denominados caracteres bioquímicos (e.g. presencia de micromoléculas como pigmentos antociánicos, alcaloides, látex, etc., en algunos vegetales), no se utilizan en Macrotaxonomía (Nieto & Llorente-Bousquets, 1994).

Caracteres moleculares del ADN

Las técnicas modernas de manipulación del ADN se basan en el aprovechamiento de una de las principales propiedades de esta macromolécula orgánica: la complementariedad de las bases nitrogenadas de sus dos cadenas helicoidales (Bianchi, 1990). El desarrollo espectacular de estas técnicas se produjo principalmente a partir de la década del 80, cuando se generalizaron el uso de las endonucleasas de restricción para cortar el ADN en determinados sitios de reconocimiento y la técnica denominada *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) para obtener múltiples copias de un mismo fragmento de ADN (Satz & Kornblihtt, 1993).

Las endonucleasas de restricción son enzimas que las bacterias emplean para destruir el ADN foráneo, generalmente de virus. Fueron descubiertas en 1978 y permiten reconocer secuencias de nucleótidos de 4 a 10 pares de bases (pb) y cortar el ADN en puntos específicos de reconocimiento (Tamarin 1996; Hillis *et al.*, 1996). Para realizar una PCR es preciso contar con un termociclador, en el cual se colocará el ADN "blanco" conjuntamente con nucleótidos, enzima polimerasa (TAQ polimerasa) y los cebadores o *primers* específicos para el gen en estudio (Satz & Kornblihtt, 1993). La muestra se somete a altas temperaturas (e.g. 90°C), para que el ADN se desnaturalice y se separen sus cadenas complementarias al romperse los puentes de hidrógeno. Luego se reduce bruscamente la temperatura (e.g. 45°C), a fin de que se comiencen a formar cadenas complementarias de aquéllas previamente separadas, a partir de los cebadores incorporados a la muestra y gracias a la presencia de los nucleótidos y de la enzima polimerasa. La repetición de este procedimiento en varios ciclos sucesivos permite obtener múltiples copias del ADN "blanco". El descubrimiento de la TAQ polimerasa, obtenida a partir de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, hizo posible la generalización de la PCR, ya que al resistir altas temperaturas no exige que en cada ciclo se adicione enzima polimerasa.

Las muestras de organismos que serán sometidos a estudios de ADN deben ser conservadas convenientemente, por ejemplo los insectos se deben colocar en alcohol al 100% o en *freezer* a -80°C, inmediatamente después de muertos (Reiss *et al.*, 1995). Una vez en el laboratorio se procede a la extracción del ADN, es decir, a su separación de otras moléculas orgánicas mediante el uso de productos como detergentes, fenol y/o cloroformo isoamílico (Hillis *et al.*, 1996). En organismos muy pequeños la extracción comporta la destrucción del ejemplar, pero en especímenes grandes sólo basta tomar una muestra de tejido. En este último caso es conveniente conservar los ejemplares completos como material de referencia (= *voucher specimens*). En la actualidad es posible extraer ADN no sólo a partir de especies vivientes sino también de restos fósiles (Lanteri & Confalonieri, 2001).

Los pasos siguientes a la extracción del ADN son la purificación, la amplificación por PCR y la aplicación de algún método, para cuya elección se tomará en cuenta principalmente el tipo de estudio a realizar y los recursos económicos y tecnológicos disponibles. Las técnicas moleculares más utilizadas para inferir relaciones filogenéticas entre grupos de organismos, son las de **Secuenciación** y en segundo término los **Análisis de sitios de restricción**, pero para el estudio de las variaciones y la estructura poblacional, el flujo génico interpoblacional y otros aspectos relacionados con los procesos de especiación, se suelen emplear marcadores moleculares menos costosos y de más fácil aplicación (Avise, 1994; Olmstead & Palmer, 1994).

Tanto las técnicas de Secuenciación como las de Análisis de sitios de restricción pueden aplicarse sobre genes nucleares de copia única o de copias múltiples (e.g. genes nucleares de ADN ribosomal que codifican para ARN ribosómico= ADN_r), y también sobre genes mitocondriales (ADN_{mt}) y de los cloroplastos (ADN_{cp}) (de copias múltiples ya que hay cientos a miles de dichas organelas por célula).

Técnicas de secuenciación

Las técnicas de secuenciación de ADN permiten determinar el orden en que se encuentran ubicadas las bases nitrogenadas responsables de la información genética que reside en dicha molécula. Fueron desarrolladas por dos investigadores en forma independiente, uno de Harvard (Walter Gilbert) y otro de Cambridge (Frederick Sanger), quienes gracias a sus investigaciones se hicieron acreedores al premio Nobel de química en 1980 (Tamarín, 1996). El método propuesto por Sanger se denomina del "didesoxi", pues utiliza didesoxinucleótidos o análogos de nucleótidos. Consiste básicamente en realizar una reacción de PCR especial a partir de la cual se obtienen fragmentos fluorescentes del ADN "blanco", de todos los tamaños posibles, en cuyo extremo final se ubican los didesoxinucleótidos, ya que cuando éstos ingresan a la reacción de síntesis, ésta se interrumpe.

Los fragmentos de diferente tamaño se separan por electroforesis en gel (Hillis *et al.*, 1996; Tamarín, 1996). A medida que se lleva a cabo la separación de los fragmentos, un lector láser detecta la intensidad de la emisión fluorescente de los mismos y de este modo identifica las distintas bases nitrogenadas. Los cromatogramas resultantes de la lectura de los geles se observan en una computadora y se traducen directamente en secuencias de nucleótidos. En la actualidad se utilizan métodos de secuenciación modificados a partir del de Sanger, pero que proceden de manera más rápida, en especial, en lo que respecta a la separación e identificación de los fragmentos.

Cada sitio o posición de una secuencia de ADN se considera un carácter con cuatro estados posibles, correspondientes a las diferentes bases nitrogenadas del ADN: A (adenina), T (timina), C (citosina) y G (guanina). Adenina y guanina son bases púricas, y citosina y timina bases pirimídicas. Cuando se comparan secuencias de cientos y miles de nucleótidos (o pares de bases), en varias especies o individuos, suelen encontrarse sitios invariantes (sin mutaciones puntuales) y sitios donde se han producido cambios o sustituciones de bases (= mutaciones puntuales), de dos tipos principales, **transiciones** (cambios de purina a purina o de pirimidina a pirimidina) y **transversiones** (cambios de purina a pirimidina o viceversa). Por ejemplo, si los nucleótidos AT de una especie, son reemplazados en otra especie por los nucleótidos GC, se interpretará que se han producidos dos transiciones (el cambio de A a G es de purina a purina, y el cambio de T a C, de pirimidina a pirimidina); pero si se hubiera producido un cambio de AT a CG, habrán ocurrido dos transversiones. Existen cuatro transiciones y ocho transversiones posibles:

Transiciones		Transversiones			
A	↔	G	A	↔	T
C	↔	T	C	↔	G
			A	↔	C
			G	↔	T

Además de las sustituciones de bases, se producen cambios que consisten en deleciones (pérdidas de bases) e inserciones (ganancia o adición de bases), también denominadas mutaciones *indel*. En este caso, al comparar las secuencias de dos especies, se advierte que una de ellas es más larga que la otra (tendrá mayor número de nucleótidos) (Tabla III). La presencia de inserciones y deleciones dificulta la determinación de la correspondencia entre los sitios o posiciones de los taxones comparados. El procedimiento por el cual se establece la equivalencia (u homología posicional) de los sitios se denomina alineación y se verá con mayor detalle en el Capítulo 10.

Tabla III. Secuencia de bases del ADN de cuatro taxones (B-E), en los cuales se observan sustituciones (transiciones y transversiones), inserciones y deleciones, con respecto al taxón A.

Especie A:	AATCGTTCC
Especie B:	AACCGTTCC (sustitución= transición en la tercera posición)
Especie C:	AAACGTTCC (sustitución= transversión en la tercera posición)
Especie D:	AAGGTCGTTCC (inserción de dos bases)
Especie E:	AA - - GTTCC (deleción de dos bases)

Las secuencias completas de los genes del genoma eucariótico incluyen cientos o miles de pares de nucleótidos o pares de bases (bp), pero sólo una escasa proporción presenta variacio-

nes. Debido a su gran tamaño, las tablas de secuencias de ADN ya no se publican en los trabajos, sino que se registran directamente en bases de datos electrónicas, con un número o código de identificación. Una de las bases más consultadas, a la que se puede acceder a través de Internet, es *GenBank* (Hillis & Moritz, 1990).

Análisis de sitios de restricción

Las técnicas para el análisis de sitios de restricción han tenido un gran impacto en estudios sistemáticos, a partir de la década del 80, sin embargo su uso ha disminuido desde que se generalizaron las técnicas de secuenciación del ADN, y actualmente se emplean como una primera aproximación a la inferencia filogenética molecular (Hillis *et al.*, 1996). Entre dichas técnicas cabe citar la denominada RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y la técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

La técnica de RFLP consiste en digerir el ADN en estudio mediante distintas endonucleasas de restricción (se digiere con una o dos enzimas por experimento), lo cual permite obtener fragmentos de diferentes tamaños, que luego se separan por electroforesis, se transfieren a una membrana de filtro, y se hibridan con sondas (oligonucleótidos de secuencia conocida) (Wettstein, 1992), marcadas radiativamente o con algún método no radiactivo colorimétrico y/o inmunológico/fluorescente. De este modo se pueden individualizar los sitios con secuencias complementarias (Awise, 1994; Hillis *et al.*, 1996). Entre sus múltiples aplicaciones cabe destacar el análisis de ADN mitocondrial a nivel de poblaciones humanas (Templeton, 1983; Cann *et al.*, 1987).

El número de fragmentos producidos por el corte de las distintas enzimas de restricción y el tamaño de estos fragmentos es generalmente diferente para cada especie. Estas diferencias se interpretan como debidas a mutaciones (inserciones, deleciones, o sustituciones de bases) y permiten elaborar mapas de restricción característicos de los taxones comparados. Un mapa de restricción es una representación de la estructura física del ADN en que se localizan los diferentes sitios. La presencia o ausencia de los sitios de restricción se codifica como carácter taxonómico. El número de caracteres dependerá de la cantidad de enzimas utilizadas y del número de sitios que éstas permitan reconocer (Awise, 1994; Hillis *et al.*, 1996). Al igual que en el caso de los análisis proteicos, puede haber sitios polimórficos (presentes/ausentes) en una misma especie. En la figura 7 se ilustra el mapa de restricción de los camélidos sudamericanos (guanaco, alpaca, llama y vicuña), clasificados en los géneros *Lama* y *Vicugna*, y su comparación con el mapa de restricción del camello del viejo mundo (*Camelus bactrianus*).

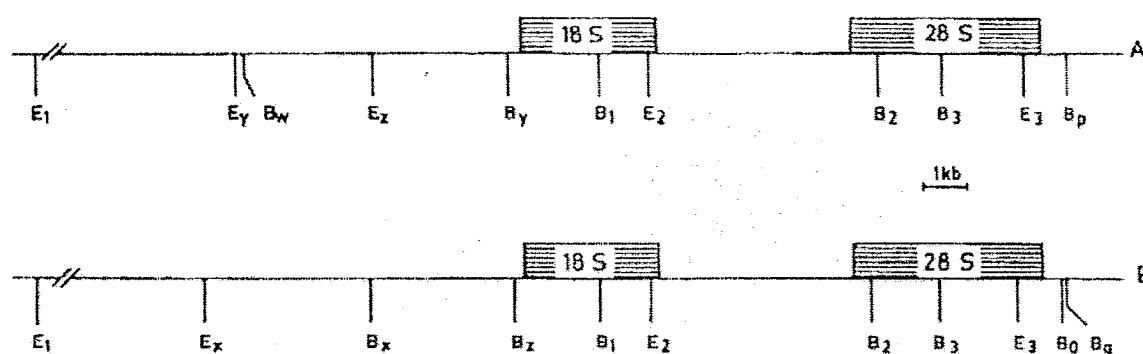


Figura 7. Mapas de restricción de los camélidos sudamericanos (A) y del camello del viejo mundo (B), utilizando dos endonucleasas de restricción *EcoRI* y *BamHI* (identificadas con E y B), para digerir el ADN. En el esquema se puede observar la posición de cada uno de los cortes producidos por las enzimas (señalados con el acrónimo de la enzima y un número o letra). Los recuadros indican zonas conservadas, ubicadas en los genes de ADN ribosomal 18S y 28S (modificado de Semorile *et al.*, 1994).

Otros marcadores moleculares

Uno de los marcadores utilizados frecuentemente para analizar variaciones intrapoblacionales o para diferenciar poblaciones o especies próximas es la técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Esta técnica utiliza una serie de *primers* arbitrarios o al azar, que se "pegan" al "ADN blanco" donde encuentran secuencias complementarias. Los productos de amplificación por PCR se separan por electroforesis y se obtienen bandas marcadoras (Scataglini *et al.*, 2000). Los caracteres registrados consisten en la presencia o ausencia de bandas RAPDs. Cuando se realizan estudios poblacionales, a partir de dichas bandas marcadoras se calculan frecuencias alélicas, que luego se analizan mediante métodos de distancia (ver Capítulo 6).

Ejercitaciones

EJERCICIO 1

Registre el mayor número de características posibles para distinguir las especies del grupo de *Asynonychus durius* (Coleoptera: Curculionidae) (Fig. 8) y vuélquelos en una tabla de taxones por caracteres. Para seleccionar los caracteres puede tomar como referencia la figura 1. En caso de registrar caracteres cualitativos con dos o más estados, asigne un código a cada uno de ellos (e.g. 0 y 1; 1 y 2; 1, 2 y 3). Los caracteres cuantitativos continuos podrá expresarlos en la medida que fueron tomados, o a través de índices o proporciones.

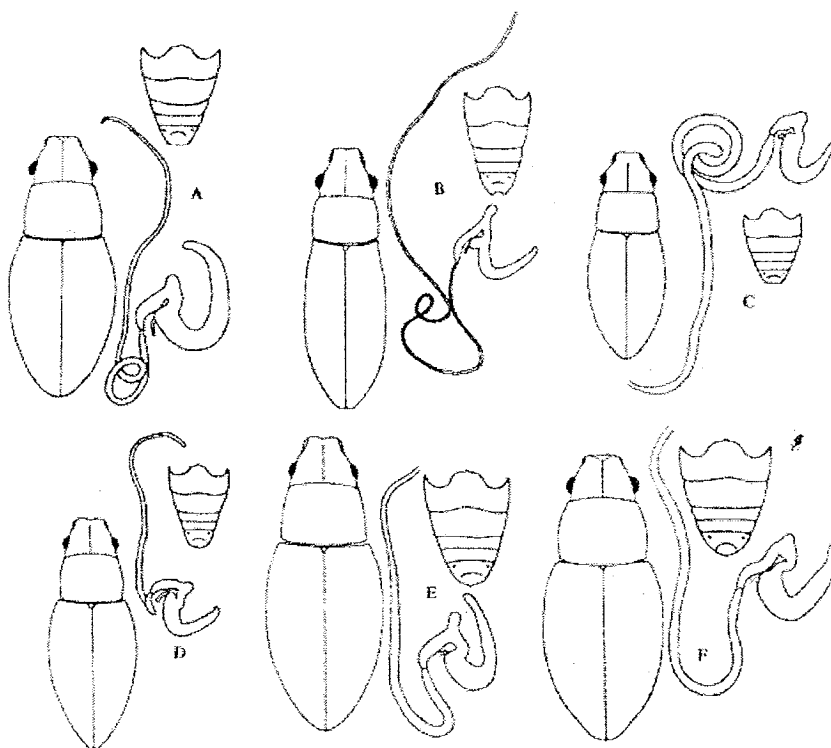


Figura 8. Ilustración esquemática de las especies del grupo de *Asynonychus durius* (Coleoptera: Curculionidae): A, *Asynonychus tessellatus*; B, *A. viridipallens*; C, *A. durius*; D, *A. santafecinus*; E, *A. pallidus* morfotipo I; F, *A. pallidus* morfotipo II (modificado de Lanteri *et al.*, 1987). Se ha representado la cabeza, protórax y élitros (vista dorsal), el abdomen y la espermateca con su conducto.