

El Método Comparativo en Biología Evolutiva

José A. Díaz

Departamento de Biología Animal I (Vertebrados), Facultad de Biología, Universidad Complutense, E-28040 Madrid. E-mail: jadiaz@bio.ucm.es

Introducción

La comparación entre especies (o taxones de orden superior) es una de las herramientas metodológicas más ampliamente utilizadas en todos los ámbitos de la biología evolutiva, incluyendo aspectos tan variados como el estudio de los ciclos vitales (“life histories”)^{63, 6, 4}, la abundancia y distribución de los organismos^{13, 68}, la ecomorfología^{48, 49, 27, 66}, la ecofisiología^{42, 43, 15, 3} o la ecología de la conducta^{9-11, 5, 55}. En particular, las comparaciones interespecíficas permiten comprender cómo la herencia ancestral (inercia filogenética) y la selección natural (adaptación), es decir, los dos grandes temas de la biología evolutiva desde Darwin en adelante^{14, 64}, han ido moldeando los rasgos que observamos en las especies actuales. Además, los estudios comparativos revelan con frecuencia regularidades sorprendentes en los datos que sirven de punto de partida para nuevas preguntas (por ejemplo, ¿a qué se debe que los tiempos de generación de una amplia variedad de organismos, desde bacterias hasta secuoyas, se ajusten con precisión a una función lineal del tamaño corporal en escala bilogarítmica?^{63, 36}; ¿por qué la energía extraída de sus respectivos ecosistemas por un rango de especies que abarca desde protozoos a ballenas es más o menos constante, según se deduce de la relación inversa entre tamaño corporal y máxima densidad de población¹³?). Incluso algunas de las características biológicas más llamativas de nuestra propia especie (como el grado de encefalización superior al de cualquier otro mamífero¹ o el sistema de apareamiento monógamo que se deduce del

tamaño relativo de los testículos^{1, 35} han podido ser descritas a partir de ecuaciones alométricas basadas en comparaciones interespecíficas.

En realidad, y por lo que concierne a la ecología de la conducta, a lo largo de las últimas décadas esta disciplina y la biología evolutiva han entrado en una fase de fecunda interacción que se refleja sobre todo en los resultados de combinar los datos ecológicos y etológicos con hipótesis filogenéticas⁴⁰. La ecología de la conducta trata de comprender cómo han coevolucionado la ecología y el comportamiento, lo que requiere con frecuencia situar los caracteres en un contexto filogenético. Los modelos sobre evolución del cuidado parental, por ejemplo, postulan que el cambio simultáneo en ambos parentales, macho y hembra, de cuidar a no cuidar, es extremadamente improbable. Pues bien, Gittleman³¹ demostró, estudiando las transiciones a lo largo de las ramas en un cladograma de peces óseos, que todos los cambios observados (N = 21) se ajustaban a lo predicho (de cuidado biparental a cuidado materno o paterno o viceversa, o de cuidado materno o paterno a no cuidado o viceversa), pero ninguna apoyaba la hipótesis contraria (de cuidado biparental a no cuidado o viceversa, o de cuidado materno a cuidado paterno o viceversa). A su vez, la biología evolutiva trata de comprender las razones de la diversidad de especies en los distintos linajes, y es obvio que la ecología de la conducta puede aportar datos esclarecedores, al proporcionar información sobre los rasgos en los que difieren grupos hermanos con valores contrastados de diversidad. Así, las estirpes difieren en su potencial de diversificación como consecuencia de procesos etológicos o ecológicos que pueden ser de dos tipos: innovaciones clave que promueven la superioridad competitiva de los taxones en los que aparecen (como la fitofagia en los insectos⁶⁵ o la elevada tasa reproductiva de ciertos grupos de mamíferos⁶²) o rasgos que promueven la especiación sin afectar a la eficacia biológica (como la selección sexual² o la fragmentación de las áreas de distribución⁶⁷).

Una razón fundamental por la que el método comparativo es tan importante en biología evolutiva es que ésta, como la astronomía o la geología, es una ciencia histórica. Los astros de la Vía Láctea, los Pirineos y los pinzones de las Galápagos tienen cada uno su propia historia que los hace diferentes de otras estrellas, montañas y fringílicos. Esto hace que el estudio de los procesos

Temas actuales en Etología

evolutivos (adaptación, coevolución, etc.) y, sobre todo, del curso de la evolución, raramente pueda abordarse mediante técnicas experimentales en sentido estricto o popperiano. Aunque si comparamos búhos nivales con cárabos u osos polares con osos pardos, podemos conjeturar que la selección natural en contra de los individuos más conspicuos es la responsable de las diferencias en el color del plumaje o el pelo, físicamente es imposible reconstruir en el laboratorio los procesos que han producido osos polares o búhos nivales a partir de sus ancestros pardos o grises. Afortunadamente, sin embargo, la evolución ha producido gran cantidad de “experimentos naturales” bajo la forma de especies que difieren en las presiones selectivas que deben afrontar, lo que hace que las comparaciones interespecíficas puedan utilizarse con provecho para entender cómo funciona la selección natural y qué adaptaciones produce.

Sin embargo, desde los años 80 está teniendo lugar una profunda revisión del método comparativo relacionada con el hecho de que las distintas especies forman parte de una escala jerárquica de relaciones de parentesco y no pueden contemplarse como datos independientes extraídos de una misma distribución, lo que da lugar a un serio problema a la hora de analizar tales datos y, a la vez, abre para los estudios comparativos nuevas y excitantes perspectivas, al situarlos en un contexto evolutivo explícito. El objetivo de esta revisión es plantear con claridad dicho problema y presentar algunas de las técnicas de análisis que permiten resolverlo, para concluir con una valoración crítica de los actuales desarrollos del método comparativo.

Planteamiento del problema

Obviamente, las relaciones de parentesco entre los taxones hacen que algunos de ellos (por ejemplo *Podarcis hispanica* y *Psammodromus algirus* en la Figura 6) compartan menos historia común, y sean por tanto más independientes entre sí, que otros (*Podarcis hispanica* y *Podarcis muralis* están más emparentadas, comparten más historia común y son menos independientes que *Podarcis hispanica* y *Psammodromus algirus*). ¿Por qué la falta de independencia constituye un problema analítico? Para comprenderlo, puede ser útil partir de la analogía con

un ejemplo no ya comparativo sino observacional (un “experimento mensurativo” en la terminología de Hurlbert, quien destacó el problema de la pseudorreplicación, o falta de independencia, en un trabajo ya clásico⁴⁴).

Supongamos que queremos comparar la abundancia de larvas de tritón a 1 m y a 3 m de profundidad en el fondo de un lago. Un procedimiento posible sería preparar 12 trampas de embudo, cebarlas y colocarlas antes del anochecer, seis en un punto del lago a 1 m de profundidad y otras seis en otro punto distinto a 3 m de profundidad. A la mañana siguiente, se retiran las trampas, se cuentan los tritones, se calculan las abundancias medias y se aplica un test estadístico (por ejemplo un test de la t) para comprobar si las medias difieren. Sin embargo, para responder a la pregunta planteada (¿difiere o no la abundancia a las dos profundidades?) no es lícito colocar las seis trampas en el mismo punto a cada profundidad. Si, con ese diseño, la diferencia es significativa, lo único que puede concluirse es que las abundancias difieren entre los dos puntos muestreados, a uno de los cuales le “ocurre estar” a 1 m de profundidad mientras que al otro le “ocurre estar” a 3 m de profundidad. Pero ese resultado significativo no puede utilizarse como prueba de que existen diferencias entre las dos profundidades. Con los datos disponibles, la diferencia encontrada no tiene por qué ser mayor que la que podría haber entre dos puntos distintos del lago situados a la misma profundidad. La única solución es dispersar y entremezclar las trampas de una manera adecuada, por ejemplo colocándolas al azar en seis puntos distintos para cada una de las dos profundidades. Sólo así tendremos réplicas genuinas⁴⁴ del efecto de la profundidad.

Otro ejemplo todavía más exagerado es que a nadie se le ocurriría deducir que una especie presenta dimorfismo sexual en el tamaño comparando cinco medidas de un único macho con cinco medidas de una única hembra, porque los datos serían réplicas, no de los sexos, sino de los individuos medidos. En resumen: un requisito elemental de un estudio bien diseñado es que las unidades muestrales sean independientes unas de otras, es decir, que no formen subconjuntos definidos por la compartición de historias semejantes, ambientes parecidos o iguales características de muestreo. Si no se respeta este requisito, se comete pseudorreplicación⁴⁴, que es, de hecho, uno de los problemas de diseño más graves, frecuentes y conceptualmente importantes en biología de organismos

Temas actuales en Etología

y sistemas. Nótese que la pseudorreplicación es equívoca porque implica confusión de variables⁷¹, e.g. profundidad con sitio de ubicación de las trampas o sexo con individuo en los ejemplos propuestos, lo que introduce un serio riesgo de cometer el error estadístico de tipo I (atribuir a la profundidad o al sexo efectos que en realidad no tienen). Además, el aumento ilegítimo del tamaño muestral también tiende a aumentar la probabilidad de cometer el error de tipo I.

Pues bien, el punto de partida para los actuales desarrollos del método comparativo es que las relaciones de parentesco entre las especies (o taxones de orden superior) introducen exactamente el mismo problema de no independencia que se plantea en el caso del dimorfismo sexual o la abundancia de tritones. Un ejemplo puede resultar aclaratorio. Supongamos que la hipótesis que se quiere contrastar es que entre los primates, y controlando el efecto del tamaño corporal, las especies frugívoras deben presentar territorios mayores que las folívoras para poder satisfacer sus demandas de alimento, ya que los recursos que utilizan son más escasos y de distribución más heterogénea⁴⁵. Ahora bien, y por citar sólo un caso, los gibones (género *Hylobates*) forman un grupo de seis especies, todas frugívoras y con territorios grandes. ¿Deben incluirse las seis especies en el análisis (e.g. ANCOVA)? Obviamente, la explicación más sencilla para el hecho de que las seis especies sean frugívoras y tengan territorios grandes no es que se hayan producido seis episodios evolutivos independientes en los que las presiones selectivas impuestas por la frugivoría hayan favorecido la ampliación del territorio, sino que todos los gibones proceden de un único antepasado común que ya era frugívoro y de territorio grande (Figura 1). Así que utilizar a las seis especies como datos independientes para el análisis equivale a imputar a la adaptación efectos que en realidad se deben a la ancestría³⁷. Que quede claro que los datos no demuestran que la hipótesis planteada (de asociación entre los cambios evolutivos en el tipo de dieta y en el tamaño del territorio) sea falsa, sino que, simplemente, son insuficientes para contrastarla.

En consecuencia (y ésta es la idea básica de los actuales desarrollos del método comparativo), la solución de este tipo de problemas exige contemplar de forma explícita las relaciones filogenéticas a la hora de utilizar las comparaciones entre especies como herramienta metodológica para estudiar la diversidad, biología e historia natural de las especies actuales.

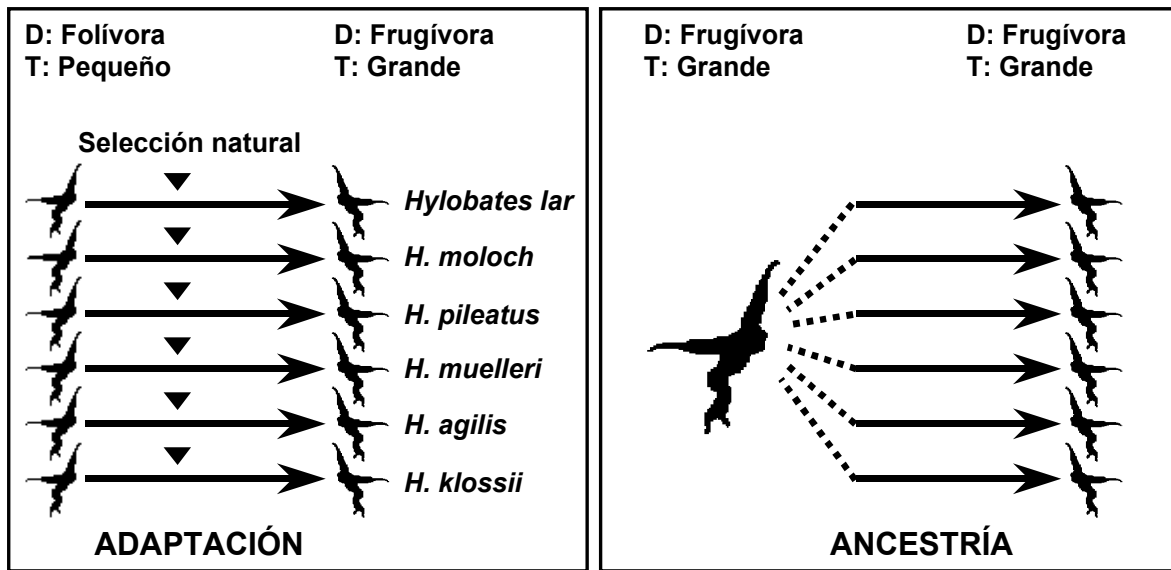


Figura 1.- Si no se consideran las relaciones de parentesco, la utilización de datos procedentes de especies distintas para inferir procesos de coevolución o adaptación (e.g. los gibones tienen territorios grandes debido a su dieta frugívora) puede dar lugar a problemas de “pseudorreplicación filogenética” (en realidad las seis especies proceden de un mismo antepasado común que ya era frugívoro y de territorio grande). D = dieta; T = territorio.

Más formalmente, y a partir del ejemplo representado en la figura 2, la tabla de contingencia que aparece en dicha figura, construida tomando las especies como si fueran datos independientes, parece demostrar una asociación entre los dos caracteres discretos con estados a-b y 0-1 ($P < 0.01$ en cualquier test), pero en realidad esconde un problema de pseudorreplicación. Por el contrario, si se asume, correctamente, que sólo ha habido un cambio evolutivo en ambos caracteres, el resultado es que con tan pocos datos (en realidad, con un solo dato *independiente*) no es posible concluir nada sobre la asociación entre ellos¹².

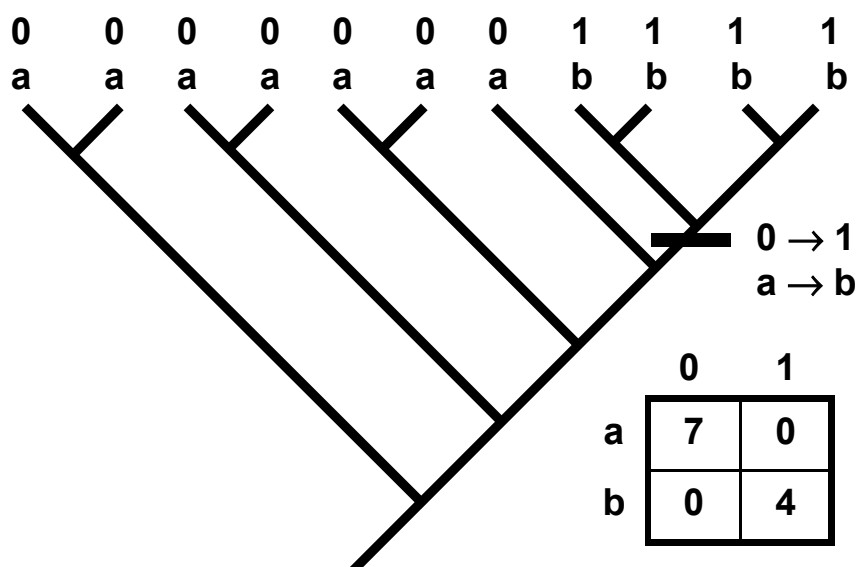


Figura 2.- La consideración de las relaciones de parentesco puede dar lugar a que desaparezcan relaciones aparentemente significativas como la correspondiente a la tabla de contingencia de la figura: en realidad, sólo ha habido un cambio evolutivo de 0 a 1 y de “a” a “b”, y no se dispone de réplicas para el contraste de hipótesis. Basado en Cunningham et al. (1998)¹².

Técnicas analíticas

¿Cómo se resuelve el problema planteado? Es decir, ¿cómo se realizan los análisis estadísticos a partir de datos de especies (o géneros, familias, etc.) evitando los problemas derivados de lo que podríamos denominar “pseudorreplicación filogenética”? Para responder a esta pregunta, se han desarrollado toda una serie de técnicas que, en conjunto, suelen denominarse de método comparativo en la literatura especializada, y que han sido revisadas por distintos autores^{36, 5, 55}.

Estas técnicas pueden clasificarse de acuerdo con dos criterios³⁶: el tipo de variables a las que se aplican (discretas o continuas) y su carácter direccional o no direccional^{42, 43, 37} (Tabla 1). Los métodos no direccionales comparan taxones

hermanos, u otras entidades filogenéticamente independientes, para inferir tendencias evolutivas (Figura 3). Los direccionales, por su parte, rastrean los cambios ancestro-descendiente a lo largo del tiempo (e.g. los métodos de mínima evolución), o bien examinan hipótesis que implican no sólo una asociación potencialmente adaptativa entre los caracteres con estados Aa y Bb (responsable de que AB y ab sean, por ejemplo, combinaciones de estados más frecuentes que Ab y aB), sino también que dicha asociación se debe a que los cambios en un carácter (e.g. $A \rightarrow a$ o $a \rightarrow A$) preceden y causan los cambios en el otro ($B \rightarrow b$ o $b \rightarrow B$) (hipótesis direccionales en sentido estricto⁷⁰). Aquí me limitaré a presentar algunas de las técnicas más ampliamente utilizadas, señaladas con asteriscos en la Tabla 1; el lector puede acudir a las fuentes originales para una mayor profundización en las técnicas expuestas, así como para el estudio de las que no se tratan en esta revisión. Utilizaré como ejemplo un trabajo publicado¹⁶ en el que se estudia la covariación de las temperaturas ambientales (una característica del hábitat seleccionado) y las tasas de calentamiento (un rasgo fisiológico potencialmente adaptativo) en un clado de lacértidos.

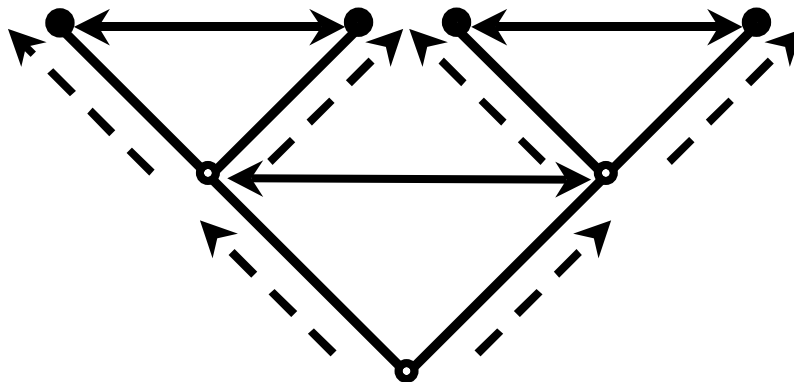


Figura 3.- Los métodos comparativos direccionales (flechas discontinuas) rastrean los cambios antepasado-descendiente o examinan hipótesis de causalidad direccionales (véase el texto para más detalles), mientras que los no direccionales (flechas continuas; contrastes independientes de la filogenia, por ejemplo) comparan taxones hermanos.

Tabla 1.- El método comparativo: principales técnicas filogenéticas que tratan de resolver los problemas estadísticos propios de los datos interespecíficos (falta de independencia atribuible a las relaciones de parentesco entre las especies). Las técnicas se han clasificado según el tipo de variables – discretas o continuas – y según su carácter direccional o no direccional (el método de Maddison es direccional porque considera la direccionalidad de las relaciones causa-efecto entre caracteres, mientras que los métodos de mínima evolución son direccionales porque utilizan los cambios antepasado-descendiente; véase el texto para más detalles). Las abordadas en esta revisión aparecen señaladas con asteriscos.

		VARIABLES	
		DISCRETAS	CONTINUAS
TIPOS DE ANÁLISIS	DIRECCIONALES	Método de Maddison ⁵¹	Métodos de mínima evolución ⁴³
	NO DIRECCIONALES	Método de Ridley* ⁶⁹	Contrastes independientes de la filogenia* ²¹ Autocorrelación filogenética ^{8, 32}
		AN(C)OVAs filogenéticos* ²⁸ (simulaciones de Monte Carlo) [†]	

[†] Las simulaciones permiten, en última instancia, evaluar la eficacia de todos los métodos⁷⁰, pero sobre todo de los que analizan variables continuas^{53, 28, 56, 16, 17, 61}.

El Método de Ridley

El método de Ridley⁶⁹ persigue detectar los cambios en los caracteres a lo largo del cladograma (como el cambio de 0 a 1 y de “a” a “b” en la figura 2) para

utilizar como unidades muestrales independientes no los taxones emparentados sino los linajes que experimentan cambios evolutivos. En consecuencia, el primer paso para aplicar el método de Ridley consiste en reconstruir los estados ancestrales de los caracteres para a continuación identificar las ramas en las que se producen cambios. El procedimiento de reconstrucción más habitual, basado en el principio de parsimonia^{20, 5}, es el originalmente propuesto por Maddison et al. (1984)⁵², y requiere proceder de acuerdo con el siguiente algoritmo⁵:

1.- En primer lugar, hay que identificar el **nodo interno** y el **nodo problema**. El primero es el nodo cuyo estado queremos averiguar: así, en el ejemplo de la Figura 4, no sabemos si el ancestro común de las dos especies del género *Podarcis* es de clima mediterráneo o de clima frío. El nodo problema (o nodo externo) es el ancestro común inmediato del nodo interno y su grupo hermano. Según el principio de parsimonia, el nodo problema debe presentar el mismo estado que el nodo interno al que antecede. Es decir: una vez resuelto el nodo problema, asignaremos su mismo estado al nodo interno. El nodo raíz, por último, es el nodo basal de todo el cladograma.

2.- A continuación se resuelven los nodos de forma secuencial, comenzando por los más alejados del nodo problema y trabajando siempre desde fuera hacia dentro (“dentro” viene definido por el nodo interno). Para resolver los nodos, según el principio de parsimonia, se les asigna el estado más frecuente en los dos nodos o taxones contiguos:

$a \cap a$	\Rightarrow	a
$b \cap b$	\Rightarrow	b
$a \cap b$	\Rightarrow	a,b (ambiguo)
$a,b \cap a$	\Rightarrow	a
$a,b \cap b$	\Rightarrow	b
$a,b \cap a,b$	\Rightarrow	a,b

Temas actuales en Etología

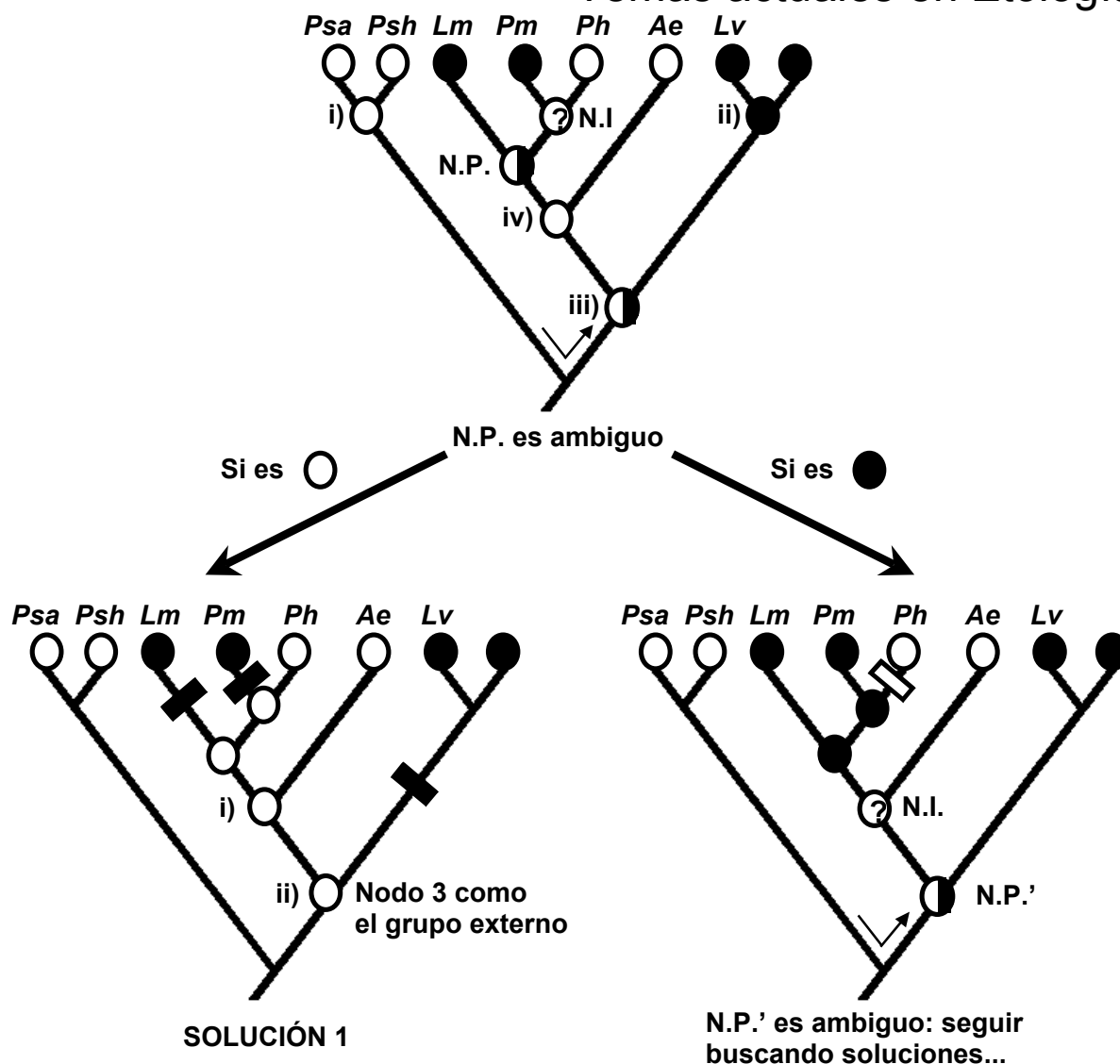


Figura 4.- Primeros pasos de la reconstrucción de estados ancestrales según el principio de parsimonia⁵² para aplicar el método de Ridley. La filogenia representada¹⁶ se basa en datos inmunológicos. Los círculos blancos corresponden a especies de lacértidos de distribución mediterránea (véase por ejemplo el “Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe” editado por la Societas Europaea Herpetologica en 1997) y tasa de calentamiento ajustada por el tamaño inferior a la media; los puntos negros son especies de distribución montana y/o norteña y tasa de calentamiento ajustada por el tamaño superior a la media (datos de la Figura 6). Las abreviaturas de las especies son: *Psa* = Lagartija colilarga, *Psammodromus algerus*; *Psh* = Lagartija cenicienta, *Psammodromus hispanicus*; *Lm* = Lagartija serrana, *Lacerta monticola*; *Pm* = Lagartija roquera, *Podarcis muralis*; *Ph* = Lagartija ibérica, *Podarcis hispanica*; *Ae* = Lagartija colirroja, *Acanthodactylus erythrurus*; *Lv* = Lagartija de turbera, *Lacerta vivipara*; *Ls* = Lagaro verdinegro, *Lacerta schreiberi*.

3.- Se continúa trabajando del mismo modo hacia el nodo problema hasta conseguir resolverlo.

En el ejemplo de la Figura 4, se muestran los pasos a seguir (de i a iv) hasta resolver el nodo problema (y, por extensión, el nodo interno); es importante tomar nota de que, a estos efectos, se pasa de largo el nodo raíz (paso iii), ya que no se dispone de información externa a él. En este caso, el resultado final es que el nodo problema resulta ambiguo, lo que implica que existen al menos dos soluciones igual de parsimoniosas. La primera de ellas (situación ancestral de clima mediterráneo y tasa de calentamiento lenta para el ancestro común de *Lacerta monticola* y las dos especies de *Podarcis*) permite completar la reconstrucción de estados ancestrales utilizando *Psammmodromus* como grupo externo (solución 1), pero la segunda (situación ancestral de clima frío y tasa de calentamiento rápida) da lugar a un nuevo nodo problema que es otra vez ambiguo. Si el nuevo nodo problema (N.P.) y el correspondiente nodo interno (N.I.) resultan ser de clima mediterráneo y tasa de calentamiento lenta, se obtiene la solución 2 de la Figura 5; en caso contrario, el nodo raíz es ambiguo y caben dos nuevas posibilidades (figura 5: soluciones 3 y 4); se recomienda al lector que trate de completar por sí mismo la reconstrucción de estados ancestrales hasta llegar a las cuatro soluciones de la figura 5. En ocasiones, se habla de **evolución acelerada** y **evolución retardada**⁷ para hacer referencia a las dos opciones básicas posibles cuando el nodo problema es ambiguo (figura 5: soluciones 1 y 2). Si el estado que asignamos al nodo problema y al nodo interno es el mismo que el del nodo que les antecede, en este caso distribución mediterránea y tasa de calentamiento lenta, estaremos postulando un modelo de evolución retardada, ya que los cambios se producen más cerca de las puntas (especies actuales) que de la raíz (solución 1); la opción de evolución retardada favorece las adquisiciones paralelas del estado derivado. Si, por el contrario, asignamos al nodo problema y al nodo interno un estado distinto al del nodo que les antecede, estaremos postulando un modelo de evolución acelerada, ya que el primer cambio se produce relativamente más cerca de la raíz que de las puntas (solución 2); la opción de evolución acelerada favorece las reversiones al estado ancestral.

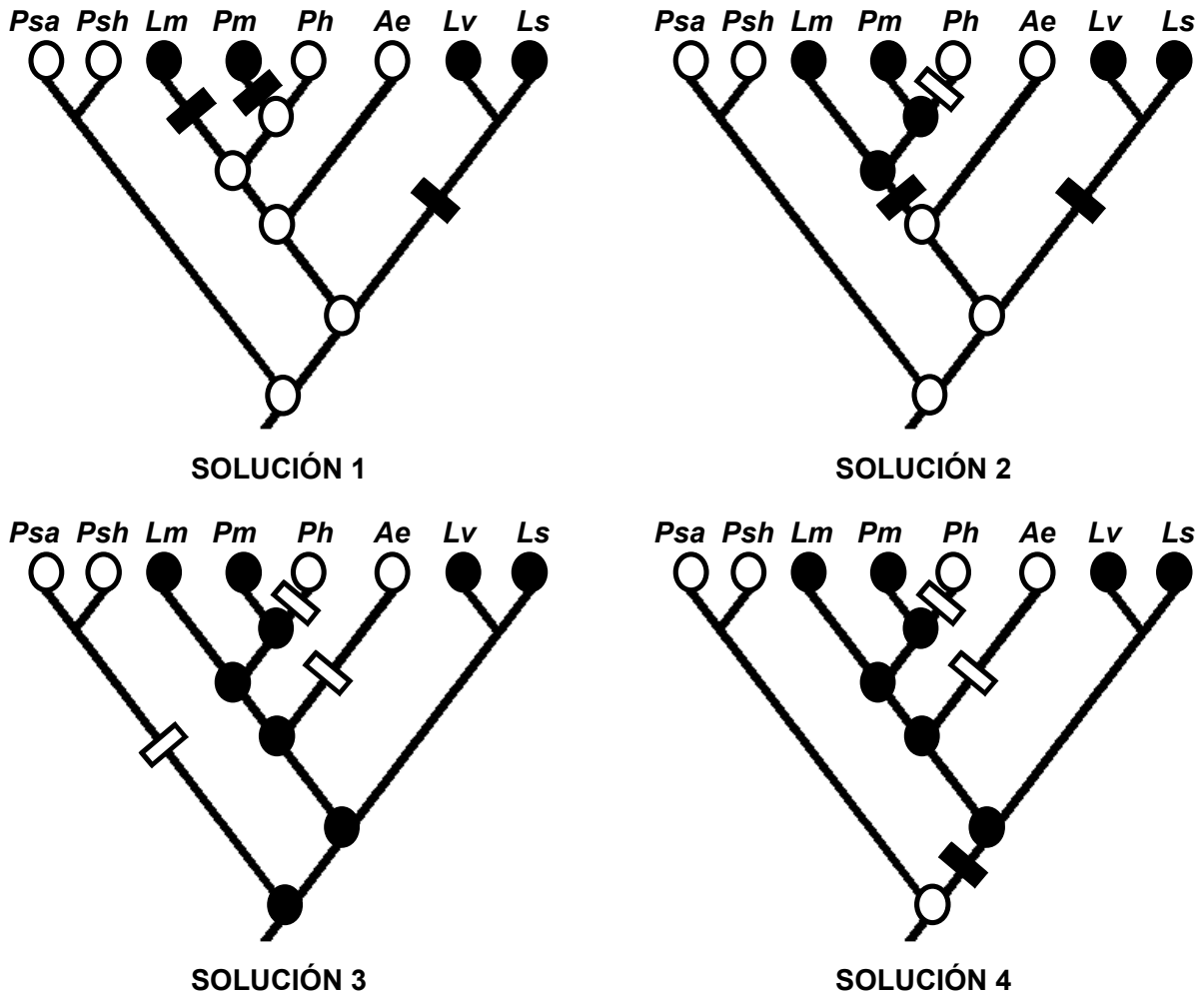


Figura 5.- Las cuatro reconstrucciones posibles de estados ancestrales bajo el criterio de parsimonia para la filogenia y caracteres de la Figura 4.

En cualquier caso, una vez reconstruidos los cambios evolutivos para los caracteres objeto de estudio, puede aplicarse el método de Ridley, que se basa en utilizar únicamente los linajes que experimentan cambios; las ramas sin cambios se ignoran, con lo que se evita utilizar los taxones emparentados como datos independientes para el análisis (así por ejemplo, no se cuentan las dos especies de *Psammodromus* como dos casos independientes, puesto que ambas proceden del mismo ancestro común que ya era mediterráneo y de calentamiento lento). El método consiste en contar el número de linajes que cambian dando lugar a cada una de las cuatro posibles combinaciones de estados finales; es decir, cada cambio dará lugar a un taxón que puede ser mediterráneo y de calentamiento lento, mediterráneo y de calentamiento rápido, de clima frío y

de calentamiento lento, o de clima frío y de calentamiento rápido. Se construye así una (o varias) tabla(s) de contingencia que se basa(n) no en datos de taxones emparentados sino en cambios filogenéticamente independientes. Sobre esta tabla se aplica el test oportuno (e.g. test exacto de Fisher o χ^2). Si el resultado es significativo, se concluye que ciertas combinaciones de caracteres son más frecuentes, y otras menos, de lo que cabría esperar por azar habida cuenta de las relaciones de parentesco entre los taxones estudiados, lo que prueba que los cambios evolutivos en los dos caracteres están correlacionados (por definición, si los cambios ocurrieran al azar no debería haber asociación entre los estados terminales).

En el ejemplo propuesto, y a falta de datos paleoclimáticos, paleoecológicos o de otro tipo que permitan mejorar la reconstrucción de estados ancestrales (e.g. información sobre el grupo externo al clado objeto de estudio), habría que obtener las correspondientes tablas de contingencia para las 16 combinaciones posibles de modelos de cambio evolutivo (4 soluciones para la distribución y otras 4 para la tasa de calentamiento). En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos, en los que puede comprobarse que el resultado es siempre más conservador que el que se obtendría suponiendo erróneamente que las especies han evolucionado con total independencia unas de otras. Nótese también que las ramas con cambios dobles (es decir, las ramas en las que cambian a la vez los dos caracteres considerados) se cuentan sólo una vez, ya que la unidad muestral es el linaje que experimenta cambios, al margen de que los cambios de estado afecten a los dos caracteres o sólo a uno de ellos.

Conviene, por último, caer en la cuenta de que el método es no direccional porque utiliza los cambios en los caracteres únicamente para detectar episodios evolutivos independientes, pero no para establecer la direccionalidad de las relaciones causa-efecto (importa sólo la asociación entre estados terminales, no qué carácter cambia antes y cuál después) ni para analizar los cambios antepasado-descendiente del modo en que lo hacen los métodos de mínima evolución.

Temas actuales en Etología

Tabla 2.- Algunas de las tablas de contingencia obtenidas al aplicar el método de Ridley⁶⁹ al ejemplo de la Figura 5. Para cada tabla, *P* indica el resultado del test exacto de Fisher unilateral (de una cola).

		Tasa de calentamiento		<i>P</i>
		Lenta	Rápida	
<hr/>				
CONTEO SIMPLE (NO FILOGENÉTICO)				
Distribución	Mediterránea	4	0	0.014
	De clima frío	0	4	
<hr/>				
MÉTODO DE RIDLEY				
<u>Solución 1 para la tasa y 3 para la distribución</u>				
Distribución	Mediterránea	3	0	0.05
	De clima frío	0	3	
<u>Solución 1 para la tasa y 4 para la distribución</u>				
Distribución	Mediterránea	2	0	0.20
	De clima frío	1	3	
<u>Solución 2 para la tasa y la distribución</u>				
Distribución	Mediterránea	1	0	0.33
	De clima frío	0	2	
<u>Solución 2 para la tasa y 3 para la distribución</u>				
Distribución	Mediterránea	3	0	0.10
	De clima frío	0	2	
<u>Solución 3 para la tasa y 4 para la distribución</u>				
Distribución	Mediterránea	3	0	0.25
	De clima frío	0	1	
<hr/>				

El Método de los Contrastes Independientes de la Filogenia

Parece, pues, que al aplicar el método de Ridley la asociación entre tasa de calentamiento y clima deja de ser significativa. Sin embargo, es obvio que utilizar como variables dicotómicas la tasa de calentamiento y el clima supone una

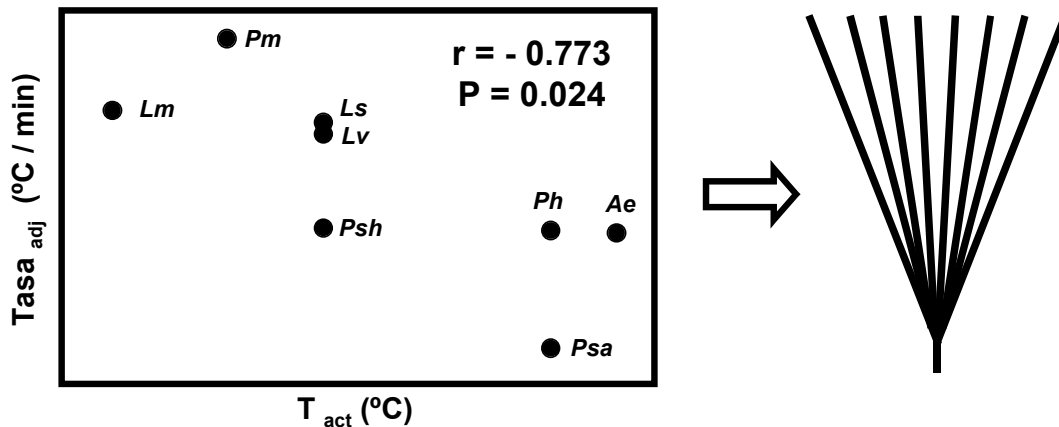
pérdida de potencia estadística, que podría evitarse mediante análisis paramétricos (correlaciones y regresiones) basados en variables continuas. La técnica habitualmente empleada para este tipo de análisis – y probablemente la más utilizada de todas las que forman parte de los actuales desarrollos del método comparativo – es la de los contrastes independientes de la filogenia (abreviadamente, PICs, de “phylogenetically independent contrasts”), propuesta por Joseph Felsenstein en 1985 ²¹. Los comentarios que siguen se inspiran directamente en ese trabajo.

El punto de partida para aplicar el método de los PICs es caer en la cuenta de por qué las relaciones jerárquicas de parentesco que son el resultado de la evolución afectan a los análisis de correlación-regresión y técnicas relacionadas (e.g. regresión múltiple, componentes principales, etc.). Si nos fijamos en el ejemplo de la Figura 6A, aplicar un test convencional para examinar la significación de la hipótesis nula $r = 0$ (o, en regresión, $b = 0$) equivale a asumir que los datos se ajustan a una distribución normal bivariante. Esto, a su vez, exige suponer que las relaciones de parentesco entre las ocho especies se ajustan al esquema representado a la derecha: una radiación instantánea en forma de umbela, compartiendo las ocho especies exactamente la misma cantidad de historia común. Sin embargo, una hipótesis alternativa – sin duda más próxima a la realidad – podría ser la representada en la Figura 6B, en cuyo caso, como demuestra la simulación de la derecha, los grados de libertad reales están más cerca de 0 (2-2) que de 6 (8-2). En efecto: si asumimos que el cambio evolutivo es, de algún modo, proporcional a las longitudes de las ramas, entonces se espera menos cambio en las ramas terminales, cortas, que en las basales, largas; de ser así, es obvio que estaremos más cerca de tener dos “puntos” (o sea, dos grupos de parientes próximos) que de tener ocho datos realmente independientes. De forma que la aparente correlación de la figura 6B es ilusoria: las medias difieren en X e Y, pero la regresión no tiene grados de libertad y no puede ser significativa. En consecuencia, cualquier contraste de hipótesis sobre correlaciones o regresiones con datos interespecíficos que ignore las relaciones de parentesco, puede estar ocultando un serio incremento de la probabilidad de cometer el error estadístico de tipo I. Sólo hay un caso en el que estos problemas no se

Temas actuales en Etología

plantean, a saber, cuando los caracteres responden de forma instantánea a la selección natural en el momento presente y están absolutamente libres de inercia filogenética. Este supuesto, sin entrar a discutir su mayor o menor probabilidad, debiera ser explícitamente reconocido en cualquier estudio comparado que no tuviera en cuenta las relaciones de parentesco²¹.

A) Correlación simple (no filogenética) e hipótesis filogenética implícita



B) Una simulación *al azar* ($r = 0$ para los cambios en X e Y) sobre una filogenia más realista

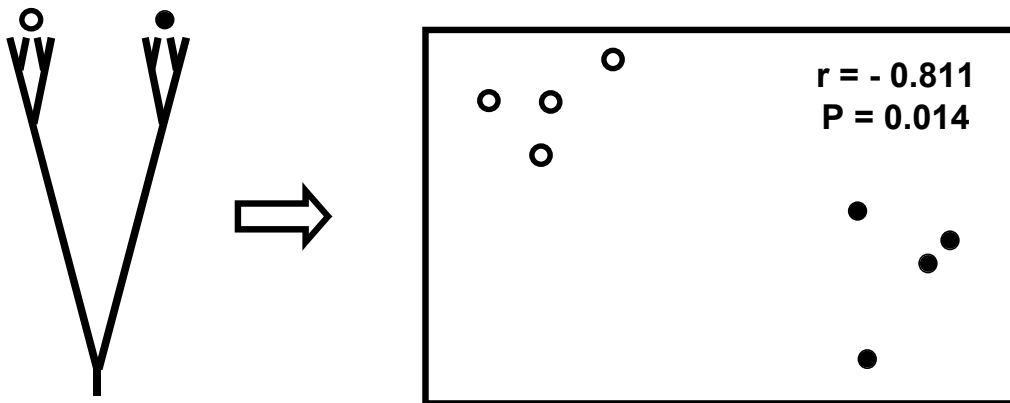


Figura 6.- Representación de las tasas de calentamiento ajustadas por el tamaño frente a la temperatura media ambiental a lo largo de la estación de actividad para las 8 especies de lacértidos de la Figura 4. A) Datos reales (Figura 8): correlación simple (no filogenética) e hipótesis evolutiva implícita. B) Una filogenia más realista y un posible resultado de simular la evolución *al azar* de X e Y (con $r = 0$ para los cambios en X e Y) a lo largo de dicha filogenia.

La solución propuesta por Felsenstein (1985)²¹ requiere: 1) disponer de una hipótesis filogenética en la que las longitudes de las ramas reflejen la varianza esperada del cambio en los caracteres; y 2) asumir que el cambio en los fenotipos a lo largo del tiempo se asemeja al movimiento browniano^{22, 36} (movimiento al azar de una molécula de fluido afectada por ruido térmico). Este segundo requisito, que puede parecer menos obvio, se traduce en aceptar que el cambio en los caracteres es gradual, distribuyéndose según una normal con media cero y varianza proporcional a la longitud de las ramas. Es decir, bajo el supuesto de evolución gradual y no direccional representado estadísticamente por un modelo de movimiento browniano, los cambios sucesivos en un carácter son independientes unos de otros (no están correlacionados a lo largo del tiempo) y es igualmente probable que sean positivos ($\Delta X > 0$) o negativos ($\Delta X < 0$; por tanto, $E[\Delta X] = 0$). El que la varianza sea proporcional a las longitudes de las ramas puede comprobarse examinando la figura 7A, que representa una simulación de movimiento browniano útil para describir la evolución de las ocho especies de la figura 6A. Alternativamente, podría interpretarse que la figura 7A representa ocho iteraciones del mismo proceso evolutivo en una sola especie, lo que permite entender que la varianza del cambio evolutivo es proporcional al tiempo transcurrido (si repitiéramos el proceso muchas veces, la varianza de los fenotipos a una altura dada sería una estima de la varianza del cambio para esa longitud de las ramas). Conviene caer en la cuenta de que el supuesto de movimiento browniano, desde un punto de vista biológico, resulta realista cuando los caracteres evolucionan por deriva genética (esto es, sin que intervenga la selección), o cuando se trata de caracteres sometidos a selección direccional que cambia de signo aleatoriamente (por ejemplo cuando la selección depende de factores ambientales que fluctúan de forma aleatoria^{17, 58}).

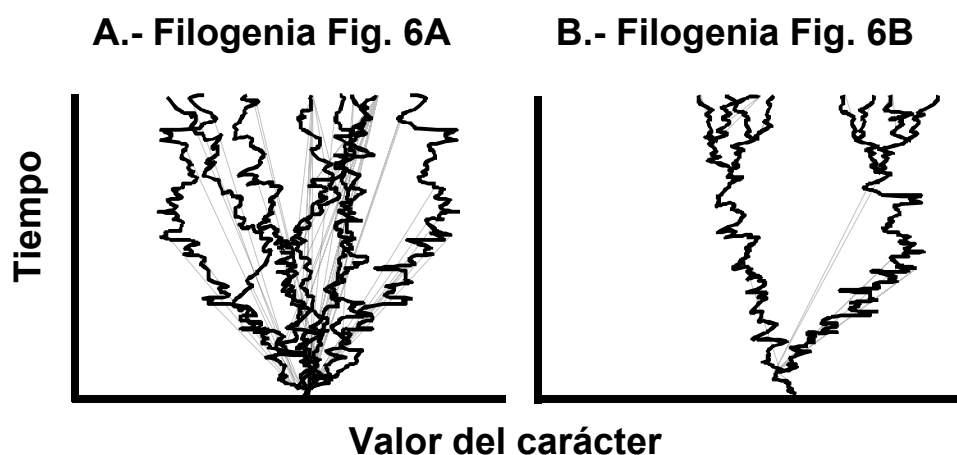


Figura 7.- Cambios en un carácter continuo que evoluciona de forma gradual según paseos aleatorios (movimiento browniano). El eje horizontal representa el valor del carácter mientras que el eje vertical representa el tiempo. A) Cambios en ocho linajes como los de la Figura 6A que evolucionan independientemente a partir de un ancestro común en el tiempo cero. B) Cambios en ocho linajes como los de la Figura 6B que, tras sucesivos episodios de cladogénesis, comparten distintas cantidades de historia común. Modificado de Harvey y Pagel (1991)³⁶.

En cualquier caso, en la figura 7A los cambios evolutivos han sido independientes en cada una de las ocho ramas, con lo que las ocho especies pueden contemplarse como datos independientes a efectos del análisis. Sin embargo, en la figura 7B tendríamos una filogenia semejante a la de la figura 6B: al principio de la secuencia hay un único “paseo aleatorio”, pero luego tiene lugar una bifurcación temprana seguida de un largo periodo de estasis (sin episodios de especiación). Al final, las especies 1 a 4 están más próximas que las especies 5 a 8, lo que introduce una correlación para cualquier par de caracteres que queramos medir, aunque dichos caracteres evolucionen con total independencia uno de otro y la inercia filogenética sea el resultado de procesos enteramente aleatorios (Figura 6B).

Pues bien, Felsenstein cayó en la cuenta de que bajo el supuesto de movimiento browniano las diferencias o “contrastos” entre taxones hermanos (puntas o nodos adyacentes) son independientes entre sí. En la Figura 8, por

ejemplo, el contraste *Ph-Pm* depende sólo de lo ocurrido desde que ambas especies divergieron a partir de su ancestro común *n7*, mientras que el contraste *n6-Ls* depende sólo de lo ocurrido después de su diferenciación a partir de *n3*; así, las diferencias entre pares de especies (o nodos de orden superior) son independientes unas de otras.

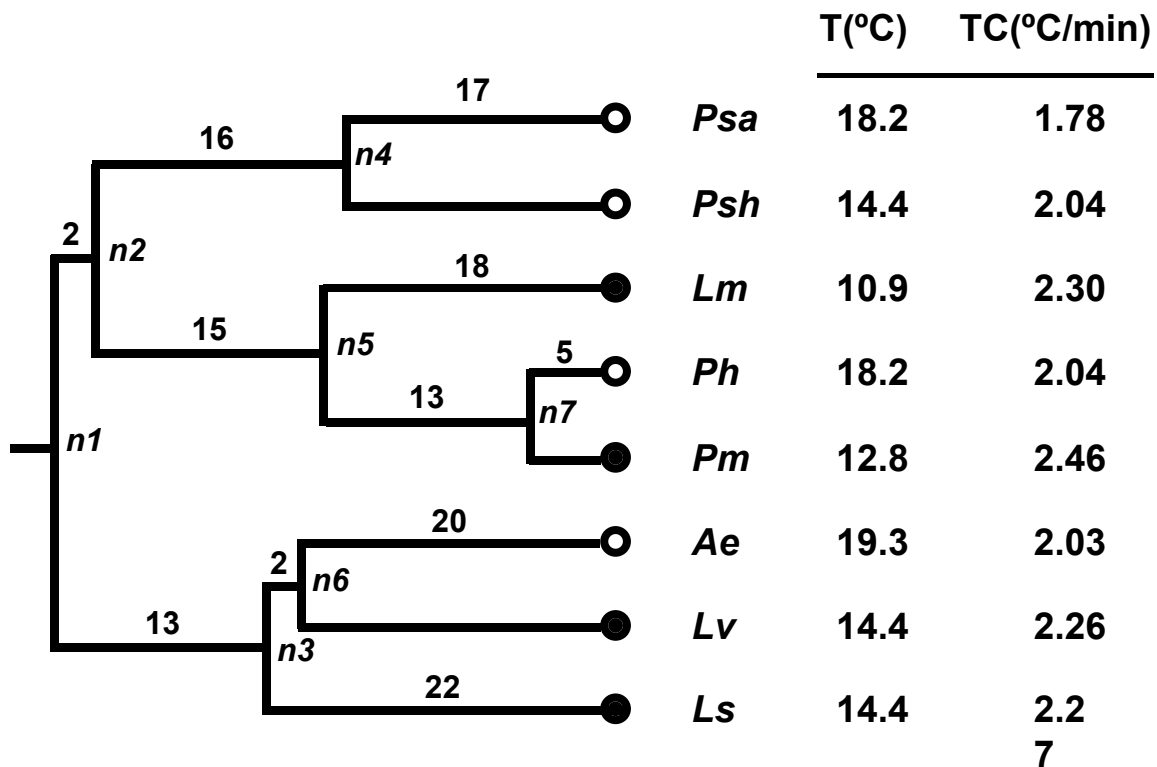


Figura 8.- Una segunda filogenia, apoyada en datos morfológicos y con longitudes de las ramas basadas en distancias inmunológicas y en el registro fósil, para las especies de lacértidos de la Figura 4. Se muestran también los códigos de la Figura 4 y los valores para la temperatura media a lo largo de la estación de actividad (T) y para la tasa de calentamiento (TC) ajustada por el tamaño, asumiendo un peso de 6.9 g (media interespecífica) para cada una de las 8 especies. Éstos son los datos necesarios para poder aplicar el método de los contrastes independientes de la filogenia (véase el texto y la Tabla 3).

Las especies *Podarcis hispanica* y *P. muralis* por un lado, y *Lacerta schreiberi* y *n6* por el otro, tendrán fenotipos que serán probablemente parecidos (y distintos de los del otro par) como consecuencia de su historia, es decir, de las características que en su día evolucionaron en sus antepasados *n7* y *n3* tras

Temas actuales en Etología

haberse diferenciado de su ancestro común *n1*. Pero las diferencias entre *Podarcis hispanica* y *P. muralis* dependen sólo de los cambios que han tenido lugar desde que se separaron de su ancestro común; de este modo, cualquier parecido entre ellas que se deba a su historia común es eliminado del análisis. Por este procedimiento, y tras desarrollar los cálculos oportunos (véase a continuación), es posible calcular *n-1* contrastes para *n* especies que son filogenéticamente independientes unos de otros. De este modo, se aprovecha toda la información suministrada por los datos comparados mediante una especie de “transformación estadística” que, al redistribuir la variación de forma coherente con nuestra hipótesis filogenética, evita los problemas analíticos de falta de independencia.

Tabla 3.- El método de los contrastes independientes de la filogenia²¹ aplicado a los datos de la Figura 8. T = temperatura; TC = tasa de calentamiento ajustada por el tamaño (asumiendo un peso de 6.9 g, que coincide con la media interespecífica, para cada una de las 8 especies). CI = contraste independiente; sd = desviación típica (raíz cuadrada de la suma de las longitudes de las ramas); CIE = contraste estandarizado (CI / sd).

Contraste	Nodo basal	CI (T)	CI (TC)	sd	Nodo basal (T)	Nodo basal (TC)	CIE (T)	CIE (TC)
<i>Ae-Lv</i>	<i>n6</i>	4.90	-0.230	6.324	16.85	2.145	.775	-.036
<i>n6-Ls</i>	<i>n3</i>	2.45	-0.125	5.831	15.98	2.189	.420	-.021
<i>Ph-Pm</i>	<i>n7</i>	5.40	-0.420	3.162	15.50	2.250	1.708	-.133
<i>Lm-n7</i>	<i>n5</i>	-4.60	0.050	5.788	13.37	2.273	-.795	.009
<i>Psa-Psh</i>	<i>n4</i>	3.80	-0.260	5.831	16.30	1.910	.652	-.045
<i>n4-n5</i>	<i>n2</i>	2.93	-0.363	6.916	14.80	2.096	.424	-.052
<i>n2-n3</i>	<i>n1</i>	-1.18	-0.093	5.892	15.28*	2.133*	-.200	-.016

* Los valores estimados de T y TC para el nodo basal *n1* no son necesarios para el cálculo de más contrastes, pero representan medias de T y TC ponderadas por la filogenia que pueden ser útiles para situar la recta obtenida forzando la regresión por el origen (PICs) en el plano correspondiente a los datos originales³⁰ (a partir de la pendiente de mínimos cuadrados o de eje mayor reducido ajustada a los PICs, y del punto correspondiente a los valores estimados para el nodo basal, puede calcularse el intercepto).

El algoritmo para el cálculo de los contrastes es el siguiente:

1.- Seleccionar dos puntas o nodos adyacentes (i y j ; por ejemplo Ae y Lv en la Figura 8) que compartan un ancestro común (k ; en el ejemplo, $n6$).

2.- Calcular el contraste $X_i - X_j$ (si X es la Temperatura, $X_i - X_j = 19.3 - 14.4 = 4.9$), que tiene esperanza 0, varianza $v_i + v_j$ (suma de las longitudes de las ramas: $20 + 20 = 40$) y desviación típica igual a la raíz cuadrada de la varianza ($sd = \sqrt{40} = 6.32$).

3.- Eliminar i y j , quedándonos sólo con el ancestro k . Asignarle un valor fenotípico X_k como media de X_i y X_j ponderada por la inversa de las longitudes de las ramas²¹:

$$X_k = \frac{\frac{X_i}{v_i} + \frac{X_j}{v_j}}{\frac{1}{v_i} + \frac{1}{v_j}}$$

En el ejemplo, al ser las dos ramas de igual longitud, $n6$ sería simplemente la media de Ae y Lv : $n6 = (19.3 + 14.4) / 2 = 16.85$. Nótese que la fórmula anterior para inferir los nodos internos pondera los caracteres dando más peso al descendiente más cercano (es decir, con la rama de menor longitud): se multiplica cada descendiente por la longitud de la rama del otro y se divide por la suma de ambas. En efecto, multiplicando el numerador y el denominador del cociente anterior por el producto $v_i v_j$ resulta:

$$X_k = \frac{X_i v_j + X_j v_i}{v_i + v_j}$$

4.- Alargar la rama bajo el nodo k aumentando su longitud de v_k a $v_k + v_i v_j / (v_i + v_j)$. Este alargamiento se debe a que X_k no se mide sino que se estima, por lo que hay que añadir un componente de variación (o, lo que es lo mismo, incertidumbre) estadísticamente indistinguible de un arranque adicional de evolución después del nodo k (y tanto mayor cuanto mayores sean v_i y v_j y, por

Temas actuales en Etología

tanto, más incierta la estima de X_k). En el ejemplo, la longitud de la rama que va de n_3 a n_6 pasaría a ser $2 + [(20 \times 20) / (20 + 20)] = 2 + 10 = 12$.

Después de los pasos 1 a 4, tenemos un contraste con su varianza y hemos eliminado un par de especies, reduciendo en uno el número de contrastes. A continuación repetimos los pasos 1 a 4 hasta llegar al nodo basal. Así, el contraste n_6 - L_s es $16.85 - 14.4 = 2.45$, y el valor de la temperatura media para n_3 , el ancestro común de n_6 y L_s , resulta:

$$n_3 = \frac{(n_6 \times 22) + (L_s \times 12)}{22 + 12} = \frac{(16.85 \times 22) + (14.4 \times 12)}{34} = 15.98$$

La varianza y desviación típica correspondientes serán $v = 22 + 12$ y $sd = \sqrt{34} = 5.83$. Finalmente (paso 4), habrá que alargar la rama subyacente, que va de n_1 a n_3 , de 13 a 20.76 (puesto que $13 + [(22 \times 12) / (22 + 12)] = 13 + 7.76 = 20.76$).

En la Tabla 3 aparecen los resultados completos tanto para la temperatura como para la tasa de calentamiento; se recomienda al lector practicar realizando él mismo los cálculos paso a paso.

De esta forma, tras repetir los pasos 1 a 4 cuantas veces sea necesario, y una vez llegados al contraste basal (en este caso n_2 - n_3 , con nodo basal n_1), para n especies habremos obtenido $n-1$ PICs que podremos estandarizar dividiendo cada uno por su correspondiente desviación típica (raíz cuadrada de la suma de las longitudes de sus ramas). La estandarización es necesaria para evitar dar más peso a los contrastes más largos²⁶: en el supuesto más sencillo e intuitivo, los contrastes serán tanto mayores cuanto más tiempo hayan tenido para diferenciarse las dos especies que se comparan, lo que puede dar lugar a que el valor absoluto de los contrastes, aunque no dependa de la historia común (puesto que los PICs son filogenéticamente independientes), sí que dependa de las longitudes de sus ramas. En consecuencia, la estandarización es un requisito previo para que los datos se ajusten a los supuestos de la estadística paramétrica y puedan ser analizados mediante técnicas convencionales de correlación y regresión. Así, aunque cualquier punto de partida es bueno para estimar las longitudes de las ramas (distancias genéticas, tiempos de divergencia obtenidos a

partir del registro fósil o de relojes moleculares, número de cambios en los caracteres en un análisis cladista, etc. ^{26, 33, 23}), es importante verificar que las longitudes obtenidas estandarizan efectivamente los contrastes²⁶. De aquí que haya que comprobar que la correlación entre el valor absoluto de los contrastes estandarizados y su desviación típica no es significativa; de hecho, si esta correlación es lo suficientemente baja, los PICs funcionan bien incluso con datos simulados (véase más abajo) que no se ajustan al supuesto de movimiento browniano^{17, 18, 61}. Conviene, por último, representar los contrastes estandarizados en valor absoluto frente a su desviación típica (lo que equivale a representar cualquier cociente frente a su denominador para ver que los efectos distorsionadores de éste han sido efectivamente eliminados), para corroborar que en el gráfico resultante no se detecta ninguna tendencia, ni positiva ni negativa, ni lineal ni de ningún otro tipo.

Si la estandarización no es adecuada, es decir, si la correlación entre el valor absoluto de los contrastes estandarizados y su desviación típica es significativa, el procedimiento habitual consiste en transformar los datos originales (mediante los procedimientos habituales: logaritmo, raíz cuadrada, transformación angular, etc.) y/o, sobre todo, las longitudes de las ramas²⁶. Si la correlación inicial es negativa, lo más apropiado suele ser trabajar con los logaritmos de las longitudes de las ramas, que acortan más las ramas más largas; si es positiva, puede convenir más la transformación raíz cuadrada. En realidad, se trata de un asunto empírico: es cuestión de probar hasta lograr la mejor estandarización posible. Además, hay que tener en cuenta que distintos caracteres pueden requerir distintas transformaciones. En cualquier caso, las transformaciones de las longitudes de las ramas tienen implicaciones interesantes desde un punto de vista evolutivo. Así por ejemplo, Garland et al.²⁶, trabajando con 49 especies de carnívoros y ungulados, encuentran que las longitudes de las ramas en millones de años, estimadas a partir del registro fósil, estandarizan adecuadamente los contrastes para el tamaño (un rasgo morfológico que puede evolucionar de forma gradual y con tasas más o menos constantes a lo largo del tiempo), pero sobre-estandarizan los contrastes más largos en el caso del área de campeo (un rasgo comportamental susceptible de evolución rápida), dando lugar a una

Temas actuales en Etología

correlación negativa y significativa entre el valor absoluto de los PICs y su desviación típica. Sin embargo, al tomar el logaritmo de las longitudes de las ramas – lo que supone postular un modelo de evolución distinto, más “saltacionista”, para la misma hipótesis filogenética – se logra una estandarización casi perfecta; esto sugiere que la evolución de las diferencias interespecíficas en el área de campeo es rápida al principio, justo después de producirse la especiación, pero luego se ralentiza, lo que hace que los contrastes sean linealmente proporcionales, no a la raíz cuadrada de su longitud, sino a la raíz cuadrada del logaritmo de su longitud (Figura 9).

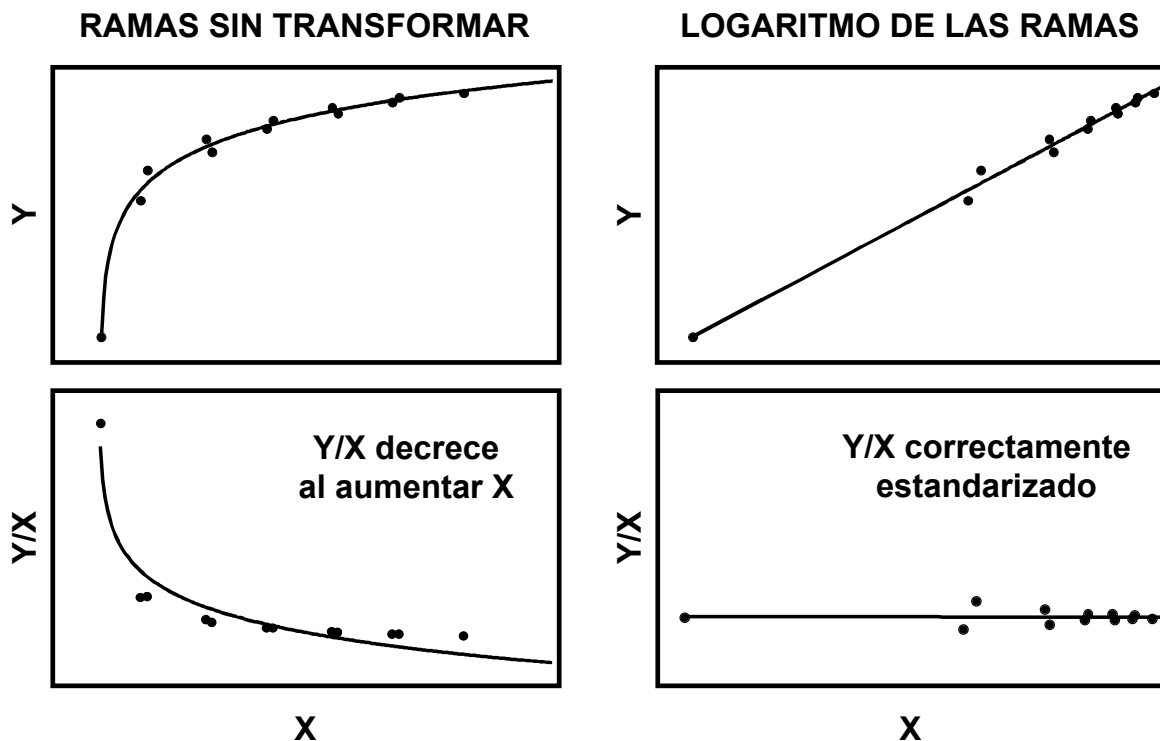


Figura 9.- La estandarización de los contrastes implica a menudo efectuar supuestos sobre los modelos de evolución de los caracteres. A la izquierda se muestra un rasgo que diverge muy deprisa justo después de la especiación y cuya evolución se va ralentizando a medida que transcurre el tiempo. En ese caso, las ramas sin transformar no permiten una buena estandarización de los contrastes (gráfico inferior). A la derecha se muestra el mismo carácter pero con las longitudes de las ramas transformadas logarítmicamente, lo que hace que los datos se ajusten al supuesto de movimiento browniano y permite una buena estandarización de los contrastes. X = desviación típica de los contrastes (raíz cuadrada de la suma de las longitudes de las ramas); Y = contrastes en valor absoluto; Y/X = contrastes estandarizados en valor absoluto.

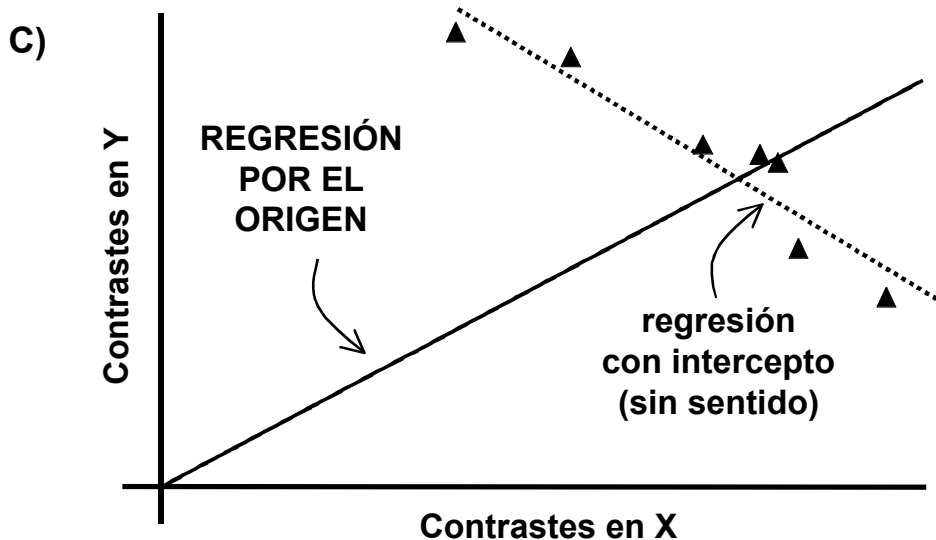
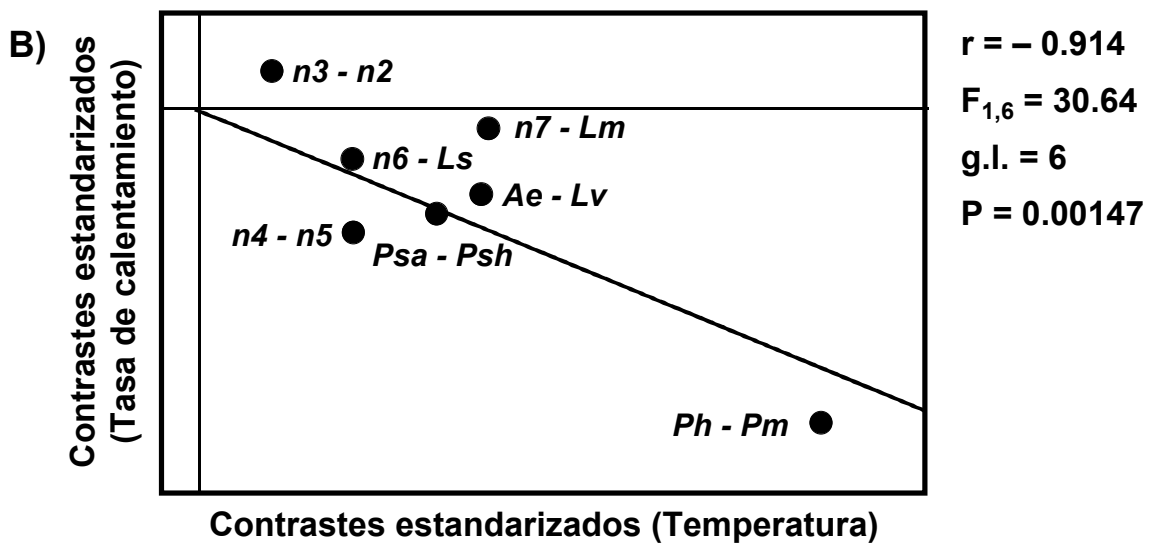
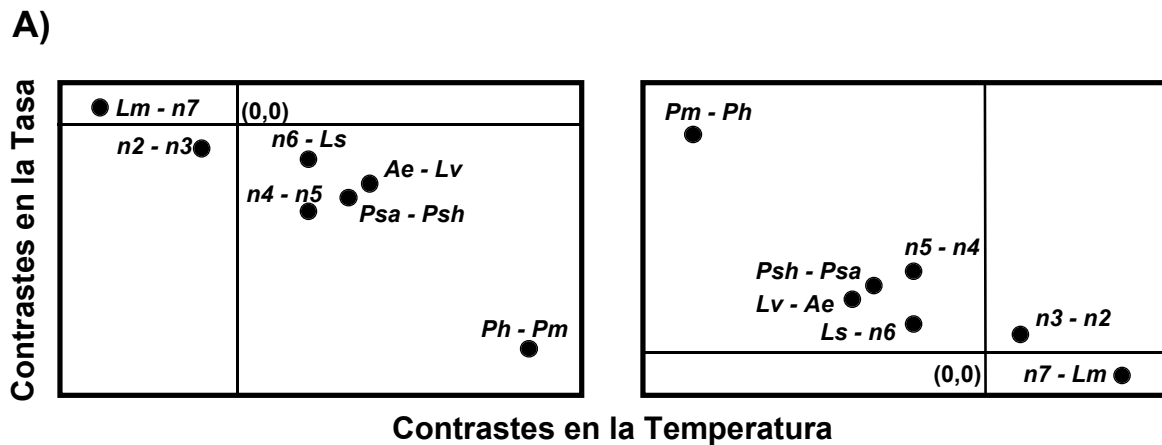


Figura 10.- El signo arbitrario de los contrastes independientes de la filogenia, según que dirección de la resta sea “especie 1 – especie 2” o “especie 2 –

Temas actuales en Etología

especie 1”, hace obligado forzar las regresiones a través del origen. A) Dos posibles representaciones de los contrastes estandarizados de la Tabla 3. B) Representación “ortodoxa” de los contrastes estandarizados de la Tabla 3, positivizando los contrastes en X (de forma que si la temperatura de la especie 1 es mayor que la de la especie 2 el contraste será “especie 1 – especie 2” y viceversa) y asignando signo a los de Y (tasa de calentamiento) según su dirección coincida (contrastos de Y positivos: primer cuadrante) o no (contrastos de Y negativos: segundo cuadrante) con la de los contrastes en X. Se muestran también los estadísticos de la regresión a través del origen. C) Un ejemplo extremo en el que la inspección visual del gráfico con los contrastes positivizados en el eje X podría llevar a pensar que la asociación entre X e Y es negativa, cuando en realidad la asociación entre los contrastes en X e Y es positiva. Véase el texto para más detalles.

En el ejemplo de la Figura 8 y de la Tabla 3, el lector puede comprobar que las longitudes originales sobre-estandarizan los contrastes para ambos rasgos (correlaciones entre el valor absoluto de los contrastes estandarizados y su desviación típica; tasa: $r = -0.776$, $n = 7$, $P = 0.04$; temperatura: $r = -0.857$, $P = 0.014$) y que los mejores resultados se obtienen tomando los logaritmos de las longitudes de las ramas y de los datos originales (tasa: $r = -0.446$, $P = 0.315$; temperatura: $r = -0.735$, $P = 0.059$). No obstante, y aunque habría que utilizar esas transformaciones, seguiremos trabajando con los contrastes de la Tabla 3 sin transformar (Figura 10B) en aras de una mayor claridad expositiva (además, la relación entre tasa de calentamiento y clima es negativa y significativa independientemente de que los datos y longitudes de las ramas se transformen o no¹⁶).

Conviene por último indicar que, además de servir para testar hipótesis sobre evolución correlacionada, los contrastes independientes de la filogenia pueden también ser útiles para comparar tasas de evolución entre clados distintos²⁵. En efecto, los contrastes estandarizados en valor absoluto son estimadores independientes de la mínima cantidad de cambio en el fenotipo que ha tenido lugar durante los procesos de cladogénesis, ajustada por las diferencias en potencial de cambio (i.e., desviación típica) entre contrastes “largos” y “cortos”.

Una vez obtenidos los contrastes estandarizados para ambos caracteres, y tras haber comprobado que la estandarización funciona correctamente, el siguiente paso es proceder al contraste de hipótesis forzando las regresiones a través del origen^{21, 26, 53}, esto es, calculando una recta de regresión del tipo $Y = bX$. Se trata de aplicar las fórmulas

$$r = \frac{\sum(X_i Y_i)}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}} \quad \text{y} \quad b = \frac{\sum(X_i Y_i)}{\sum X_i^2},$$

donde X_i e Y_i son los contrastes estandarizados para las variables X e Y , r es el coeficiente de correlación, y b la pendiente de regresión de mínimos cuadrados. Alternativamente, si se utilizan paquetes estadísticos convencionales, hay que activar la opción “intercepto igual a cero”, “regresión por el origen”, o similares. El hecho de que se deba forzar la regresión por el origen obedece a que durante el cálculo de los contrastes la dirección de las restas es arbitraria, lo que da lugar a que el signo de los contrastes también lo sea. Así por ejemplo, en la Tabla 3 el primer contraste puede ser $Ae-Zv$, con un valor de 4.9 para la temperatura y de -0.23 para la tasa, o puede ser $Zv-Ae$, con un valor de -4.9 para la temperatura y de 0.23 para la tasa. Es decir, el valor de un contraste cualquiera entre dos nodos i y j puede ser $\Delta X = X_i - X_j$ ó $-\Delta X = X_j - X_i$, donde ΔX puede ser positivo ($X_i > X_j$) o negativo ($X_i < X_j$). Por tanto, cualquier par de contrastes puede representarse indistintamente como $(\Delta X, \Delta Y)$ o como $(-\Delta X, -\Delta Y)$. La estima de los estadísticos de correlación y regresión debe tener en cuenta este efecto de “imagen especular”. Más formalmente, si $\Delta Y(\Delta X)$ es un estimador de ΔY en función de ΔX , se tiene que cumplir que $\Delta Y(\Delta X) = -\Delta Y(-\Delta X)$, de manera que el resultado no se vea afectado por la elección (arbitraria) del signo de ΔX . Evidentemente, la línea de ajuste así obtenida debe pasar por el punto $(0,0)$: se trata, por tanto, de una regresión por el origen, que mantiene los grados de libertad de los datos originales ($n - 2$, siendo n el número de especies; a los $n - 1$ contrastes hay que restar únicamente el grado de libertad que se pierde al estimar la pendiente, pero no el intercepto).

Temas actuales en Etología

La arbitrariedad del signo de los contrastes hace que ningún gráfico bivalente sea único (Figura 10A). Debido a esta ambigüedad, se recomienda³⁶ representar las correlaciones dando signo positivo a los contrastes del eje X (variable "independiente") y, a continuación, asignar a los contrastes del eje Y signo positivo cuando su dirección coincide con la de X ($X_i > X_j \Leftrightarrow Y_i > Y_j$) y signo negativo cuando su dirección se opone a la de X ($X_i > X_j \Leftrightarrow Y_i < Y_j$) (Figura 10B). La inspección visual de un gráfico construido de esta forma, con el eje X positivizado, puede sugerir un intercepto distinto de cero. Sin embargo, estos interceptos distintos de cero no pueden interpretarse de forma coherente, como pone de manifiesto el ejemplo de la Figura 10C: aunque pueda parecer que la regresión por el origen (que es significativa y positiva: $r = 0.879$, g.l. = 6, $P = 0.004$) no refleja la covariación "negativa" que se observa en los datos ($r = -0.942$, g.l. = 5 y $P = 0.0015$ en una regresión convencional con estima del intercepto), sigue siendo cierto que los siete puntos representados corresponden a contrastes en los que, si X_i es mayor que X_j , entonces Y_i es también mayor que X_j ; en consecuencia, los cambios evolutivos en X e Y están positivamente correlacionados (todos los puntos están en el primer o tercer cuadrante y no hay puntos en el segundo o cuarto cuadrante; un test binomial bilateral daría como resultado una P de 0.016).

El método de los contrastes independientes de la filogenia fue originalmente concebido para examinar hipótesis sobre la evolución correlacionada de rasgos que se transmiten de ancestros a descendientes^{21, 26}. Sin embargo, esta herencia no tiene por qué ser genética, sino que el único requisito es que se trate de rasgos que presenten una distribución continua y que sean transmitidos de ancestros a descendientes. La latitud o la temperatura, por ejemplo, no se heredan en el sentido genético convencional, pero sí en el sentido de que los organismos nacen en lugares y bajo la influencia de factores ambientales que, en el momento de su nacimiento, coinciden con los que experimentan sus parentales (así, el ancestro de dos especies desérticas es probable que viviera también en zonas desérticas⁴², o el ancestro de una especie

ecuatorial y otra de latitudes elevadas es probable que viviera en zonas de latitud intermedia). Por otra parte, si una característica ambiental depende única o principalmente de los procesos de selección de hábitat, y éstos tienen una base genética, entonces esa característica ambiental tendrá también una base genética. En consecuencia, el método de los contrastes independientes de la filogenia puede ser utilizado para documentar el carácter potencialmente adaptativo de determinados rasgos fenotípicos (véase no obstante^{46, 47, 34}).

Cuando se dispone de varias hipótesis filogenéticas para el mismo conjunto de organismos (e.g. la filogenia inmunológica de la Figura 4 y la filogenia morfológica de la Figura 8), conviene comprobar la robustez de los resultados aplicando el método de los PIC's a cada una de ellas^{3, 4, 16}. Asimismo, puede ser interesante probar con distintos métodos (e.g. PICs²¹, autocorrelación filogenética^{8, 32}, métodos de mínima evolución⁴³) para verificar que las conclusiones obtenidas no dependen de la técnica particular escogida para el análisis^{49, 54, 66}.

Simulaciones de Ordenador. Análisis de la (Co)Varianza Filogenéticos.

Por último, cabe resaltar la utilidad de las simulaciones de ordenador para comprobar la eficacia de todos los métodos, pero sobre todo de los que utilizan variables continuas^{53, 28, 56, 16, 17, 61}. En efecto: se trata de llevar a cabo pruebas de aleatorización que, a partir de una hipótesis filogenética y de un modelo de cambio evolutivo (por ejemplo evolución gradual de signo aleatorio, evolución concentrada en los episodios de especiación, etc.), permitan simular repetidas veces (e.g. 1000 veces) la evolución de dos rasgos continuos a lo largo de la filogenia. De esta forma, y bajo la hipótesis nula habitual de que la correlación entre los cambios en los dos rasgos es igual a cero (es decir: sabiendo que, por diseño, los dos caracteres evolucionan con total independencia uno de otro), es posible obtener múltiples series de datos para las especies objeto de estudio. Analizando estas series de datos mediante cualquiera de los métodos propuestos se tendrá una **distribución nula empírica** de coeficientes de correlación; así,

Temas actuales en Etología

podrán obtenerse series de, por ejemplo, 1000 coeficientes de correlación utilizando el método de Felsenstein, o el cálculo estándar, “ingenuo”, que ignora las relaciones de parentesco (como en el caso de la Figura 6B). A continuación, el contraste de hipótesis con los datos reales puede realizarse comparando su coeficiente de correlación con esa distribución empírica (en vez de con las tablas estadísticas convencionales), de forma que resulten tasas razonables de error de tipo I a pesar de los problemas de no independencia filogenética. Así por ejemplo, si de 1000 coeficientes de correlación, 81 son mayores que el correspondiente a los datos reales, ambos en valor absoluto, la P empírica será de 0.081 en un test bilateral (de dos colas). Tanto las simulaciones como el análisis de los datos simulados se llevan a cabo con programas específicamente diseñados a tal efecto (véase el apartado siguiente).

En la Tabla 4 aparecen los resultados de aplicar la lógica de las simulaciones a los datos de la Figura 8 y, a continuación, a esos mismos datos pero suponiendo que las relaciones de parentesco se ajustan a lo representado en la Figura 11. Nótese que en la Figura 11 los problemas de no independencia filogenética se han agravado (la correlación “ingenua” tiene una P empírica de 0.213, frente a la P nominal de 0.024), ya que la inercia filogenética de los caracteres que se comparan es mucho mayor que la real (esto es, la correspondiente a las mejores, o al menos más probables, hipótesis filogenéticas disponibles; véanse las Figuras 4 y 8). De hecho, la falta de consistencia filogenética de la tasa de calentamiento constituye en sí misma un claro indicio de la posible naturaleza adaptativa de ese rasgo fisiológico¹⁶. En cualquier caso, puede comprobarse que, tanto en un caso como en otro, el método de los PIC's proporciona resultados mucho más fiables (la P empírica y la nominal coinciden casi exactamente en ambos casos) que la correlación ingenua que ignora las relaciones de parentesco⁵³. Además, el error medio (resultado de promediar los cuadrados de las mil correlaciones obtenidas, ya que por definición la correlación real es 0, y por tanto la suma de cuadrados será $\Sigma[r - 0]^2$) es también menor para los PICs que para la correlación ingenua. Por tanto, y a efectos del contraste de hipótesis, deben evitarse los análisis comparativos que no tienen en cuenta las relaciones de parentesco, utilizando en su lugar técnicas filogenéticas apropiadas (e.g. contrastes independientes de la filogenia)⁵³.

Tabla 4.- Rendimiento de los contrastes independientes independientes de la filogenia (PICs) en comparación con la correlación ingenua que ignora las relaciones de parentesco (CORR), en base a 1000 simulaciones de ordenador generadas y analizadas con los módulos del programa CMAP⁵³ asumiendo evolución gradual de signo aleatorio y con correlación 0 para los cambios en X e Y. Se muestran, para los datos de la Figura 8 y las hipótesis filogenéticas de las Figuras 8 y 11, el coeficiente de correlación real (r) con sus correspondientes grados de libertad (g.l.), la P nominal, el número de coeficientes de correlación mayores que r o menores que $-r$ (N), la P empírica (igual a $N/1000$), el valor crítico empírico de r para $\alpha = 0.05$ (percentil 95 de la distribución de coeficientes de correlación en valor absoluto), y el error medio (EM, igual a $\Sigma r^2/1000$) con su desviación típica (SD).

SIMULACIÓN 1.- Datos Figura 8, Filogenia Figura 8								
	r	g.l.	P_{nominal}	N	$P_{\text{empírica}}$	$r_{\text{crítica}}$	EM	SD
PICs	-0.914	6	0.0015	2	0.002	0.697	0.150	0.162
CORR	-0.773	6	0.024	53	0.053	0.774	0.197	0.203

SIMULACIÓN 2.- Datos Figura 8, Filogenia Figura 11								
	R	g.l.	P_{nominal}	N	$P_{\text{empírica}}$	$r_{\text{crítica}}$	EM	SD
PICs	-0.649	6	0.082	79	0.079	0.709	0.134	0.163
CORR	-0.773	6	0.024	213	0.213	0.913	0.333	0.275

Por otra parte, las simulaciones de ordenador son el único modo de evitar los problemas de no independencia filogenética cuando se emplean métodos de mínima evolución⁴³ o se efectúan análisis de la (co)varianza empleando como datos los fenotipos de distintas especies agrupadas en base a criterios taxonómicos, ecológicos o fisiológicos (e.g. carnívoros vs. herbívoros, ovíparos vs. vivíparos, etc.)²⁸. Así por ejemplo, uno puede plantearse si las tasas de calentamiento ajustadas por el tamaño de la Figura 8, o de la Figura 11, difieren entre especies mediterráneas (círculos blancos) y especies de clima frío (puntos

Temas actuales en Etología

negros), bien directamente (ANOVA) o utilizando la masa corporal como covariante en un diseño de ANCOVA¹⁶ con la tasa de calentamiento como variable dependiente y el tipo de clima como factor de clasificación.

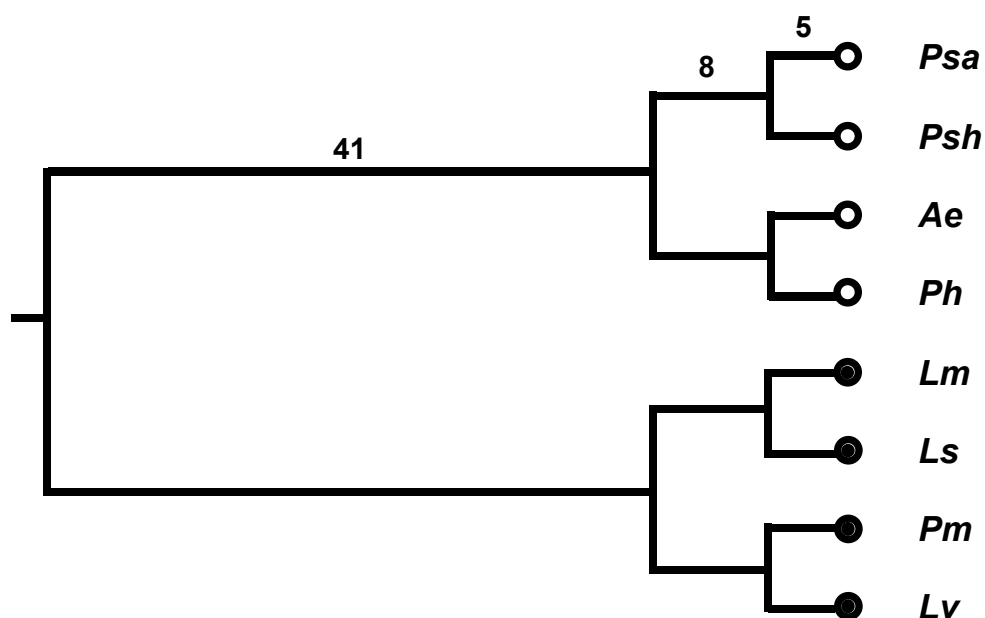


Figura 11.- Una filogenia alternativa para las especies de lacértidos de las Figuras 4 y 8. Aunque NO se trata de una hipótesis apoyada por los datos disponibles^{3, 4, 16}, resulta coherente con la distribución de los caracteres objeto de estudio, al separar dos clados monofiléticos que corresponden, respectivamente, a especies de distribución mediterránea y calentamiento lento en relación a su tamaño (círculos blancos), y a especies de clima frío y calentamiento rápido en relación a su tamaño (puntos negros). Se trata, pues, de una hipótesis de parentesco que agrava el problema de la no independencia filogenética.

En cualquier caso, el problema que se plantea es el mismo de siempre: debido a la naturaleza jerárquica de la “descendencia con modificación”¹⁴, cabe esperar que las especies no puedan utilizarse como datos estadísticamente independientes, lo que puede dar lugar a que los niveles de significación de las tablas estadísticas convencionales no resulten fiables. Los programas de la serie PDAP^{28, 16, 17, 29, 30}, diseñados por Ted Garland y sus colaboradores, permiten efectuar simulaciones de evolución al azar bajo una amplia gama de modelos de cambio evolutivo y, a continuación, analizarlas mediante diseños de AN(C)OVA.

De este modo, es posible generar distribuciones nulas empíricas de los correspondientes estadísticos F que, análogamente a lo explicado en los párrafos anteriores para los coeficientes de correlación, permiten comparar la F obtenida con la esperada a partir de datos generados al azar (es decir, siendo cierta la hipótesis nula de igualdad de medias) pero que respetan, eso sí, las relaciones de parentesco, longitudes de las ramas y modelos de cambio asociados a la historia del grupo. Es decir, las simulaciones resuelven el problema de la no independencia filogenética en la medida en que contemplan los factores que dan lugar a dicho problema.

Tabla 5.- Comparación del ANOVA convencional con los ANOVAs filogenéticos (basados en 1000 simulaciones de ordenador generadas y analizadas con los módulos del programa PDAP²⁸ asumiendo evolución gradual de signo aleatorio) para comparar las tasas de calentamiento ajustadas por el tamaño (Figura 8) entre los dos grupos biogeográficos (puntos negros = clima frío y círculos blancos = clima mediterráneo) de las Figuras 8 y 11. Se muestran el resultado convencional no filogenético (F) con sus correspondientes grados de libertad (g.l.), la P nominal, y, para las simulaciones, el número de F 's mayores que 19.05 (N) y la P empírica (N/1000). La última columna corresponde al valor crítico de F para $\alpha = 0.05$ en el ANOVA convencional, y a los valores críticos empíricos para las simulaciones (percentil 95 de las correspondientes distribuciones del estadístico F).

	F	g.l.	P_{nominal}	N	$P_{\text{empírica}}$	$F_{\text{crítica}}$
ANOVA convencional	19.05	1,6	0.0047	---	---	5.99
ANOVA filogenético: filogenia de la Figura 8	19.05	1,6	0.0047	1	0.001	5.06
ANOVA filogenético: filogenia de la Figura 11	19.05	1,6	0.0047	336	0.336	129.77

En la Tabla 5 se muestran los resultados de aplicar el ANOVA filogenético a los datos de la Figura 8, que no plantean problemas especiales dado que el factor de clasificación – tipo de clima – está perfectamente entremezclado con la filogenia, lo que hace que la P nominal y la empírica coincidan casi exactamente. A continuación se muestran también los resultados del ANOVA filogenético aplicado a esos mismos datos pero con la filogenia de la Figura 11. En este segundo caso (filogenia hipotética “empeorada”), las especies de clima mediterráneo y las de clima frío forman parte de sendos clados separados desde el inicio mismo de la evolución del grupo, lo que da lugar a una perfecta confusión de las fuentes de variación filogenética (herencia ancestral) y ecológica (factor de clasificación). En consecuencia, no es de extrañar que la P nominal sea mucho menor que la empírica y que el recurso a las simulaciones de ordenador adquiera una importancia crucial con vistas a evitar el error estadístico de tipo I (Tabla 5).

Programas Disponibles en Internet

Varias de las técnicas contempladas en esta revisión pueden aplicarse a cualquier base de datos mediante el empleo de programas informáticos gratuitos que están disponibles en Internet, y cuyo uso y distribución requieren únicamente mantener el copyright y, por supuesto, citar a los autores en los trabajos que utilicen esos programas.

PHYLIP (the *PHY*Logeny *I*nference *P*ackage)²³ es un conjunto de programas creados y mantenidos por Joe Felsenstein, de la Universidad de Washington en Seattle, que realizan una amplia variedad de tareas relacionadas con la inferencia filogenética y, en general, con la utilización de las filogenias en los distintos ámbitos de la Biología Evolutiva. Su página principal es <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> [Consulta: 18 mayo 2002]. Desde allí, se accede en la parte inferior (“Phylogeny programs available elsewhere”) a un completísimo listado de paquetes y programas “filogenéticos”

agrupados según tipos de métodos, incluyendo una sección de “Comparative method analysis”. PHYLIP tiene además un módulo (CONTRAST.EXE; documentación en Contrast.doc) que calcula contrastes independientes de la filogenia. El formato de entrada es el Newick o New Hampshire, así llamado por haber sido propuesto en una reunión informal de J. Archie, W. H. E. Day, W. Maddison, F. J. Rohlf y J. Felsenstein durante el Congreso de la “Society for the Study of Evolution” en Durham, New Hampshire, en 1986, habiéndose adoptado finalmente en la segunda y última reunión de ese mismo comité informal en la marisquería Newick de Dover. El formato Newick es el más ampliamente utilizado por los programas filogenéticos (e.g. PHYLIP, PAUP, COMPARE, PDAP, etc.) y se basa en la correspondencia lógica, casi intuitiva, entre los cladogramas y los paréntesis anidados; así, la filogenia de la Figura 8 sería:

```
((Sa:17,Sh:17):16,(Am:18,(Ph:5,Pm:5):13):15):2,((Ae:20,Lv:20):2,Ls:22):13):0;
```

(nótese que los paréntesis, las comas y el punto y coma final son parte obligada del formato Newick, a diferencia de las longitudes de las ramas que van precedidas por los dos puntos).

CMAF (*Comparative Methods Analysis Programs*⁵³) es un conjunto temprano de programas, calificado como “antipático” por su autora (Emilia Martins), pero que permite llevar a cabo toda una serie de tareas no tan fáciles de implementar, cuando no sencillamente ausentes, en versiones posteriores escritas por Martins (COMPARE) o por el equipo de Ted Garland (PDAP). Puede pedirse a Garland en la dirección que aparece en su página web (véase más adelante). La documentación del paquete está en Cmreadme.doc o Cmreadme.asc. El formato de entrada de los archivos (datos y filogenia con longitudes de las ramas) es *.INP, ciertamente complicado de escribir con un procesador de textos pero de fácil edición gráfica en el módulo PDTREE del paquete PDAP^{28, 29, 30}. CMAF incluye:

- CMSINGLE.EXE, que calcula 9 tipos de correlaciones entre los datos: TIPS, la correlación “ingenua” o no filogenética, más cuatro versiones “FL—”

Temas actuales en Etología

(contrastes independientes de la filogenia²¹), y otras otras tantas versiones “ME—” (métodos de mínima evolución⁴³).

- CMSIMUL.EXE, que simula la evolución de los fenotipos a lo largo de la filogenia, y requiere información sobre el número de especies, el máximo común divisor de las longitudes de las ramas y la longitud total del árbol (ambos en millones de años), y las medias y correlación de las distribuciones de los cambios en los dos caracteres que se analizan (0 en los tres casos bajo el supuesto de movimiento browniano).
- CMLTPANALEXE, CMFLANALEXE, y CMMEANALEXE, que analizan los datos simulados calculando las correlaciones “ingenuas” o no filogenéticas (CMLTPANAL), obteniendo cuatro variantes de los contrastes filogenéticamente independientes (CMFLANAL; la variante FLIG corresponde a la propuesta original de Felsenstein²¹), y utilizando cuatro versiones de los métodos de mínima evolución⁴³ (CMMEANAL). Estos tres módulos permiten obtener distribuciones empíricas nulas como las utilizadas para confeccionar la Tabla 4.

COMPARE^{58,59} es la versión actualizada de CMAP desarrollada por Emilia Martins, quien la distribuye a través de Internet en <http://compare.bio.indiana.edu/>⁶⁰ [Consulta: 18 mayo 2002]; puede ejecutarse directamente en la red o descargarse para ser ejecutado localmente. Se trata de una aplicación escrita en lenguaje JAVA que requiere tener preparados los datos en formato Newick y utilizar un procesador de textos para ir copiando y pegando los resultados (por motivos de seguridad, COMPARE no lee el disco duro ni graba en él). La documentación de COMPARE está disponible en Readme.txt y, sobre todo, en la ventana de ayuda del programa. Los distintos módulos analizan con diversas técnicas (contrastes independientes de la filogenia²¹, autocorrelación espacial^{8, 32}, etc.) datos tanto reales como simulados, y permiten generar simulaciones que aleatorizan no sólo la evolución de los fenotipos a lo largo de la filogenia sino también las longitudes de las ramas y la propia topología del cladograma, lo que puede ser útil para comprobar la robustez de los resultados frente a hipótesis

filogenéticas más o menos “favorables” (cfr. Figura 8 vs. Figura 11) cuando la filogenia no se conoce o se conoce sólo parcialmente^{50, 57, 41}. Desde la página principal del programa se accede al guión de una práctica de laboratorio que ilustra y ejemplifica varias de las tareas que pueden llevarse a cabo con COMPARE.

PDAP (*Phenotypic Diversity Analysis Programs*) es el conjunto de programas desarrollados por Ted Garland y colaboradores^{28, 29, 30}. Garland lo distribuye por e-mail desde la dirección indicada en:

<http://cnas.ucr.edu/~bio/faculty/Garland/PDAP.html> [Consulta: 18 mayo 2002], donde se describen también las características y funciones de los distintos módulos del paquete. El formato de entrada puede ser *.INP, Newick o PDP. Los módulos más interesantes son:

- PDTREE.EXE^{29, 30}, que permite crear y editar gráficamente filogenias y datos fenotípicos asociados en distintos formatos (*.INP, *.BRK, *.PDP), transformar los datos y/o longitudes de las ramas, y llevar a cabo distintas tareas de diagnóstico (e.g. estandarización de los contrastes), análisis y representación gráfica mediante el método de los contrastes filogenéticamente independientes.
- PDSIMUL.EXE, que simula la evolución de los fenotipos a lo largo de una filogenia especificada por el usuario; su función es semejante a la de CMSIMUL.EXE en CMAP, pero su flexibilidad es mayor, ya que permite marcar límites realistas a la evolución de los fenotipos e implementar distintos modelos de cambio evolutivo (e.g. movimiento browniano, selección direccional, selección estabilizadora de tipo Ornstein-Uhlenbeck, etc.).
- PDANOVA.EXE, que ejecuta análisis de la (co)varianza (AN(C)OVAS) con series de datos simuladas, permitiendo obtener distribuciones empíricas nulas como las utilizadas para confeccionar la Tabla 5. Éste es, con PDTREE, el módulo más útil y original del paquete.

- PDERROR.EXE y PDTIPS.EXE^{17,18}, que analizan mediante el método de los contrastes filogenéticamente independientes (PDERROR) y mediante correlaciones “ingenuas” o no filogenéticas (PDTIPS) series de datos simuladas con PDSIMUL, desempeñando funciones análogas a las de CMFLANAL y CMLTPANAL en CMAP.

La lógica de los paseos aleatorios (e.g. esperanza cero, varianza proporcional al tiempo transcurrido, etc.) puede visualizarse visitando el simulador de movimiento browniano disponible en el Curso Interactivo de Física de Angel Franco García²⁴ en la dirección:

<http://www.sc.ehu.es/sbweb/fisica/transporte/brownian/brownian.htm>

[Consulta: 18 mayo 2002].

CONCLUSIONES

Recientemente, varios autores han discutido las limitaciones de los métodos comparativos filogenéticos¹⁹, subrayando la dificultad de separar los efectos fenotípicos de la inercia filogenética (ancestría) y de la selección natural (adaptación)^{38, 39, 72-74}, o de discriminar a partir de datos obligadamente correlacionales los fenómenos de adaptación – asociación entre ambiente y fenotipo atribuible al efecto de la selección natural – de otros tipos de asociaciones (pleiotropías, correlaciones genéticas, plasticidad fenotípica, etc.)^{46, 47}. Además, hay también dificultades prácticas: así por ejemplo, en muchos casos no se conocen adecuadamente las relaciones de parentesco, o falta información sobre los modelos de cambio evolutivo más plausibles. Sin embargo, las simulaciones de ordenador están facilitando la exploración de las consecuencias, a menudo menos graves de lo que se pensaba, de incumplir o ignorar los supuestos de las distintas técnicas^{53, 17, 18, 61}, confirmando su superioridad frente a los análisis convencionales no filogenéticos.

En resumen: los recientes desarrollos del método comparativo no pueden ser ignorados cuando se utilizan las comparaciones entre especies como herramienta metodológica para estudiar la evolución de fenotipos complejos. En palabras de Felsenstein²¹, a quien corresponde probablemente el mayor mérito en la revolución sufrida por el método comparativo desde los años 80, "los investigadores que hacen Biología Comparada pueden sentirse frustrados al saber que necesitan conocer con detalle las filogenias de los grupos en los que trabajan, pues éste es un tema que tradicionalmente ha interesado sólo a los sistemáticos. Sin embargo, los esfuerzos encaminados a contemplar los efectos de la inercia filogenética no pueden obviarse. Las filogenias son coesenciales al propio concepto de Biología Comparada, y ésta no puede llevarse a cabo sin tomarlas en consideración."

Agradecimientos

A Juan Carlos Senar por brindarme la ocasión, largamente deseada, de escribir una revisión en castellano sobre un tema que siempre me ha parecido intelectualmente estimulante. A Luis M^a Carrascal, Vicente Polo y Dirk Bauwens por fructíferas discusiones al respecto. A Javier Pérez-Tris por su revisión crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arsuaga, J.L., y Martínez, I. 1998. La especie elegida. Ediciones Temas de Hoy. Madrid.
2. Barraclough, T.G., Harvey, P.H., y Nee, S. 1995. Sexual selection and taxonomic diversity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society of London B* 259: 211-215.
3. Bauwens, D., Garland, T., Castilla, A.M., y van Damme, R. 1995. Evolution of sprint speed in lacertid lizards: morphological, physiological, and behavioral covariation. *Evolution* 49: 848-863.

Temas actuales en Etología

4. Bauwens, D. y Díaz-Uriarte, R. 1997. Covariation of life-history traits in lacertid lizards: a comparative study. *American Naturalist* 149: 91-111.
5. Brooks, D.R., y D.A. Mc Lennan. 1991. *Phylogeny, ecology, and behavior*. The University of Chicago Press. Chicago.
6. Charnov, E.L. 1993. *Life history invariants - some explorations of symmetry in evolutionary ecology*. Oxford University Press. Oxford.
7. Chesser, T.R., y Levey, D.J. 1998. Austral migrants and the evolution of migration in new world birds: diet, habitat, and migration revisited. *American Naturalist* 152: 311-319.
8. Cheverud, J.M., Dow, M.M., y Leutenegger, W. 1985. The quantitative assessment of phylogenetic constraints in comparative analyses: sexual dimorphism in body weight among primates. *Evolution* 39: 1335-1351.
9. Clutton-Brock, T.H., y Harvey, P.H. 1977. Primate social organization. *Journal of Zoology London* 183: 1-39.
10. Crook, J.H. 1964. The evolution of social organization and visual communication in the weaver birds (Ploceinae). *Behaviour Suppl.* 10: 1-178.
11. Crook, J.H., y Gartlan, J.S. 1966. Evolution of primate societies. *Nature* 210: 1200-1203.
12. Cunningham, C.W., Omland, K.E., y Oakley, T.H. 1998. Reconstructing ancestral character states: a critical reappraisal. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 361-366.
13. Damuth, J. 1987. Interspecific allometry of population density in mammals and other animals: the independence of body mass and population energy-use. *Biological Journal of the Linnean Society* 31: 193-246.
14. Darwin, C. 1859. *On the Origin of Species*. John Murray. Londres.
15. Dial, B.E., y Grismer, L.L. 1992. A phylogenetic analysis of physiological-ecological character evolution in the lizard genus *Coleonyx* and its implications for historical biogeographic reconstruction. *Systematic Biology* 41: 178-195.

16. Díaz, J.A., Bauwens, D., y Asensio, B. 1996. A comparative study of the relation between heating rates and ambient temperatures in lacertid lizards. *Physiological Zoology* 69: 1359-1383.
17. Díaz-Uriarte, R., y Garland, T. 1996. Testing hypotheses of correlated evolution using phylogenetically independent contrasts: sensitivity to deviations from Brownian motion. *Systematic Biology* 45: 27-47.
18. Díaz-Uriarte, R., y Garland, T. 1998. Effects of branch length errors on the performance of phylogenetically independent contrasts. *Systematic Biology* 47: 654-672.
19. Doughty, P. 1996. Statistical analysis of natural experiments in evolutionary biology: comments on recent criticisms of the use of comparative methods to study adaptation. *American Naturalist* 148: 943-956.
20. Farris, J.S. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology* 19: 83-92.
21. Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* 125: 1-15.
22. Felsenstein, J. 1988. Phylogenies and quantitative characters. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 445-471.
23. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distribuido por el autor. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
24. Franco García, A. 1998. Física con ordenador. Curso Interactivo de Física en Internet. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Industrial de Eibar, Universidad del País Vasco.
25. Garland, T. 1992. Rate tests for phenotypic evolution using phylogenetically independent contrasts. *American Naturalist* 140: 509-519.
26. Garland, T., Harvey, P.H., e Ives, A.R. 1992. Procedures for the analysis of comparative data using phylogenetically independent contrasts. *Systematic Biology* 41: 18-32.

Temas actuales en Etología

27. Garland, T., y Janis, C.M. 1993. Does metatarsal/femur ratio predict maximal sprint speed in cursorial mammals? *Journal of Zoology London* 229: 133-151.
28. Garland, T., Dickerman, A.W., Janis, C.M., y Jones, J.A. 1993. Phylogenetic analysis of covariance by computer simulation. *Systematic Biology* 42: 265-292.
29. Garland, T., Midford, P.E., e Ives, A.R. 1999. An introduction to phylogenetically based statistical methods, with a new method for confidence intervals on ancestral states. *American Zoologist* 39:374-388.
30. Garland, T., e Ives, A. R. 2000. Using the past to predict the present: Confidence intervals for regression equations in phylogenetic comparative methods. *American Naturalist* 155:346-364.
31. Gittleman, J.L. 1981. The phylogeny of parental care in fishes. *Animal Behaviour* 29: 936-941.
32. Gittleman, J.L., y Kot, M. 1990. Adaptation: statistics and a null model for estimating phylogenetic effects. *Systematic Zoology* 39: 227-241.
33. Grafen, A. 1989. The phylogenetic regression. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 326: 119-157.
34. Hansen, T.F. 1997. Stabilizing selection and the comparative analysis of adaptation. *Evolution* 51: 1341-1351.
35. Harcourt, A. 1995. Sexual selection and sperm competition in primates: what are male genitalia good for? *Evolutionary Anthropology* 4: 121-129.
36. Harvey, P.H., y M.D. Pagel. 1991. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford University Press. Oxford.
37. Harvey, P.H., y Purvis, A. 1991. Comparative methods for explaining adaptations. *Nature* 351: 619-624.
38. Harvey, P.H., Read, A.F., y Nee, S. 1995. Why ecologists need to be phylogenetically challenged. *Journal of Ecology* 83: 535-536.
39. Harvey, P.H., Read, A.F., y Nee, S. 1995. Further remarks on the role of phylogeny in comparative ecology. *Journal of Ecology* 83: 733-734.

40. Harvey, P.H., y Nee, S.N. 1997. The Phylogenetic Foundations of Behavioural Ecology. Pp. 334-349 en: Krebs, J. R. y Davies, N. B. (eds.). Behavioural Ecology. An evolutionary approach. 4ª edición. Blackwell, Oxford.
41. Housworth, E.A., y Martins, E.P. 2001. Conducting phylogenetic analyses when the phylogeny is partially known: Random sampling of constrained phylogenies. *Systematic Biology* 50: 628-639.
42. Huey, R.B. 1987. Phylogeny, history, and the comparative method. Pp. 76-98 en: Feder, M. E., Bennett, A. F., Burggren, W. W. y Huey, R. B. (eds.). *New directions in ecological physiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
43. Huey, R.B., y Bennett, A.F. 1987. Phylogenetic studies of coadaptation: preferred temperatures versus optimal performance temperatures of lizards. *Evolution* 41: 1098-1115.
44. Hurlbert, S.H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* 54: 187-211.
45. Krebs, J.R., y Davies, N.B. 1993. *An Introduction to Behavioural Ecology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
46. Lauder, G.V., Leroi, A.M., y Rose, M.R. 1993. Adaptations and history. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 294-297.
47. Leroi, A.M., Rose, M.R., y Lauder, G.V. 1994. What does the comparative method reveal about adaptation? *American Naturalist* 143: 381-402.
48. Losos, J.B. 1990. Ecomorphology, performance capability, and scaling of West Indian Anolis lizards: an evolutionary analysis. *Ecological Monographs* 60: 369-388.
49. Losos, J.B. 1990. The evolution of form and function: morphology and locomotor performance in West Indian Anolis lizards. *Evolution* 44: 1189-1203.
50. Losos, J.B. 1994. An approach to the analysis of comparative data when a phylogeny is unavailable or incomplete. *Systematic Biology* 43: 117-123.

Temas actuales en Etología

51. Maddison, W.P. 1990. A method for testing the correlated evolution of two binary characters: are gains or losses concentrated on certain branches of a phylogenetic tree? *Evolution* 44: 539-557
52. Maddison, W.P., Donoghue, M.J., y Maddison, D.R. 1984. Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology* 33: 83-103.
53. Martins, E.P. y Garland, T. 1991. Phylogenetic analyses of the correlated evolution of continuous characters: a simulation study. *Evolution* 45: 534-557.
54. Martins, E.P. 1993. A comparative study of the evolution of *Sceloporus* push-up displays. *American Naturalist* 142: 994-1018.
55. Martins, E.P. (ed.). 1996. *Phylogenies and the comparative method in animal behavior*. Oxford University Press. Nueva York.
56. Martins, E.P. 1996. Phylogenies, spatial autoregression, and the comparative method: a computer simulation test. *Evolution* 50: 1750-1765.
57. Martins, E.P. 1996. Conducting phylogenetic comparative studies when the phylogeny is not known. *Evolution* 50: 12-22.
58. Martins, E. P., y Hansen, T. F. 1996. The statistical analysis of interspecific data: A review and evaluation of phylogenetic comparative methods. Pp. 22-75 en Martins, E. P. (ed.). *Phylogenies and the comparative method in animal behavior*. Oxford University Press. Nueva York.
59. Martins, E. P., y Hansen, T. F. 1997. *Phylogenies and the comparative method: A general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data*. *American Naturalist* 149: 646-667. (Fe de erratas en *American Naturalist* 153: 448).
60. Martins, E.P. 2001. COMPARE, versión 4.4. Computer programs for the statistical analysis of comparative data. Distribuido por la autora a través de Internet en <http://compare.bio.indiana.edu/>. Department of Biology, Indiana University, Bloomington.
61. Martins, E.P., Diniz-Filho, J.A., y Housworth, E. A. 2002. Adaptation and the comparative method: A computer simulation study. *Evolution* 56: 1-13.

62. Marzluff, J.M., y Dial, K.P. 1991. Life history correlates of taxonomic diversity. *Ecology* 72: 428-439.
63. McMahon, T.A., y Bonner, J.T. 1986. *Tamaño y vida*. Biblioteca de Scientific American. Prensa Científica. Barcelona. McMahon y Bonner 1986
64. Meagher, T.R., y Futuyma, D.J. 2001. Executive document: Evolution, science, and society. *American Naturalist* 158: S1-S46.
65. Mitter, C., Farrell, B., y Wiegmann, B. 1988. The phylogenetic study of adaptive zones: has phytophagy promoted insect diversification? *American Naturalist* 132: 107-128.
66. Moreno, E., y Carrascal, L.M. 1993. Ecomorphological patterns of aerial feeding in oscines (Passeriformes: Passeri). *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 147-165.
67. Owens, J.P.F., Bennett, P.M., y Harvey, P.H. 1999. Species richness among birds: body size, life history, sexual selection or ecology? *Proceedings of the Royal Society of London B* 266: 933-939.
68. Polo, V., y Carrascal, L.M. 1999. Shaping the body mass distribution of Passeriformes: habitat use and body mass are evolutionarily and ecologically related. *Journal of Animal Ecology* 68: 324-337.
69. Ridley, M. 1983. *The explanation of organic diversity: the comparative method and adaptations for mating*. Oxford University Press.
70. Ridley, M. y Grafen, A. 1996. How to study discrete comparative methods. Pp. 76-103 en Martins, E. P. (ed.). *Phylogenies and the comparative method in animal behavior*. Oxford University Press. Nueva York.
71. Underwood, A. J. 1990. Experiments in ecology and management: their logics, functions and interpretations. *Australian Journal of Ecology* 15: 365-389.
72. Westoby, M., Leishman, M.R., y Lord, J.M. 1995. On misinterpreting the 'phylogenetic correction'. *Journal of Ecology* 83: 531-534.
73. Westoby, M., Leishman, M.R., y Lord, J.M. 1995. Further remarks on phylogenetic correction. *Journal of Ecology* 83: 727-734.
74. Westoby, M., Leishman, M.R., y Lord, J.M. 1995. Issues of interpretation after relating comparative datasets to phylogeny. *Journal of Ecology* 83: 892-893.