

Grado en Bioloxía

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Análisis filogenético de las especies del género *Panthera*

Análise filoxenético das especies do xénero *Panthera*

Phylogenetic analysis of G. *Panthera* species



Rocío Roca Couso

Junio 2016

Junio 2016

Rocío Roca Couso

Tutor: Andrés Martínez Lage

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'AmL', written over a horizontal line.

Asdo: Andrés Martínez Lage

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Roco', written over a horizontal line.

Asdo: Rocío Roca Couso

ÍNDICE

CONTENIDO

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS.	18
MÉTODOS Y MATERIALES.....	19
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

RESUMEN

En este trabajo se llevan a cabo tres tipos de análisis en cinco de los genes mitocondriales presentes en las especies y subespecies del género *Panthera*. Se realizó un primer análisis de sesgo de codones para averiguar si hay preferencia por unos codones sinónimos específicos. Un segundo análisis para saber las diferencias sinónimas y no sinónimas entre las especies, que es un indicativo de la importancia de la deriva genética y la selección natural a la evolución de estos genes en este género. Y por último un análisis filogenético de las especies que permite dar una idea general de los mecanismos de divergencia de la especies de este género.

PALABRAS CLAVE: *Panthera*, sesgo de codones, análisis filogenético, sustituciones sinónimas y no sinónimas.

RESUMO

Neste traballo lévanse a cabo tres tipos de análises en cinco xens mitocondriais presentes nas especies e subespecies do xénero *Panthera*. Unha primeira análise do sesgo de codons para averiguar se hai preferencia por uns codons sinónimos específicos. Unha segunda análise para coñecer as diferenzas sinónimas e non sinónimas entre as especies, que é un indicativo da importancia da deriva xenética e da selección natural na evolución destes xens deste xénero. E por último unha análise filoxenética das especies que permite dar unha idea xeral dos mecanismos de diverxencia nas especies deste xénero.

PALABRAS CRAVE: *Panthera*, sesgo de codons, análise filoxenético, substitucións sinónimas e non sinónimas.

ABSTRACT

In this work three types of analysis are taken in five mitochondrials genes of the species and two subspecies of genus *Panthera*. The first analysis is a codon bias usage in order to find out if some synonymous codons are preferred. The second analysis in order to know the synonymous and non synonymous substitutions between the species, which shows the importance of genetic drift and natural selection in the evolution of these genes in that genus. Finally a phylogenetic analysis among the species which give us a general idea of the divergence mechanism of the species in that genus.

KEY WORDS: *Panthera*, codon bias, phylogenetic analysis, synonymous and no synonymous substitutions.



INTRODUCCIÓN

El género *Panthera* se localiza dentro de la subfamilia Pantherinidae, en la familia Felidae, la clase Mammalia, el orden Carnivora, el reino Animalia y la división Eukaryota (Itis.gov, 2016) (Tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía del género *Panthera*

TAXONOMÍA	
Superreino	Eukaryota
Reino	Animalia
Infrarreino	Deuterostomia
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrata
Infrafilo	Gnathostomata
Superclase	Tetrapoda
Clase	Mammalia
Subclase	Theria
Infraclase	Eutheria
Orden	Carnivora
Suborden	Feliformia
Familia	Felidae
Subfamilia	Pantherinae
Género	<i>Panthera</i>

Los miembros de este género son animales vertebrados, tetrápodos, mamíferos, carnívoros y placentarios con la típica morfología de un felino. Además, estos poseen una característica que los separa del resto de los félidos, esta es, la capacidad de rugir. Mientras que en el resto de las especies el *Epihyoideum*, el ligamento que une los músculos laterales de la faringe y el *Musculus thyroglossus* es un elemento óseo, el de los miembros del género *Panthera* es un elemento cartilaginoso (Fig. 1) y, por lo tanto, más elástico, lo que les permite rugir pero no ronronear (Weissengruber et al., 2002). La anatomía del aparato hioides es la que ha permitido establecer la distinción del género *Panthera*.

Se cree que los primeros carnívoros que más se parecían a los actuales felinos aparecieron en el Oligoceno, hace aproximadamente 35 MA en Asia (Johnson, 2006) y que a partir de ahí se han creado ocho linajes (Fig. 2). Sin embargo los miembros de cada uno y su aparición aún permanecen inciertos debido a los rápidos y recientes eventos de especiación. La radiación de los primeros félidos propiamente dicho comenzó hace 10,8 MA en el Mioceno tardío, con la diferenciación del género *Panthera*, que incluye, como ya sabemos, a los félidos que rugen y al leopardo de las nieves. Los miembros de este género permanecieron en Asia hasta el Plioceno tardío, momento en el cual se produjeron migraciones hacia África y América, dando lugar a la aparición de nuevas especies, facilitadas por el bajo nivel del mar del momento y las glaciaciones, que unían los continentes asiático y americano por el norte (Fig. 3).

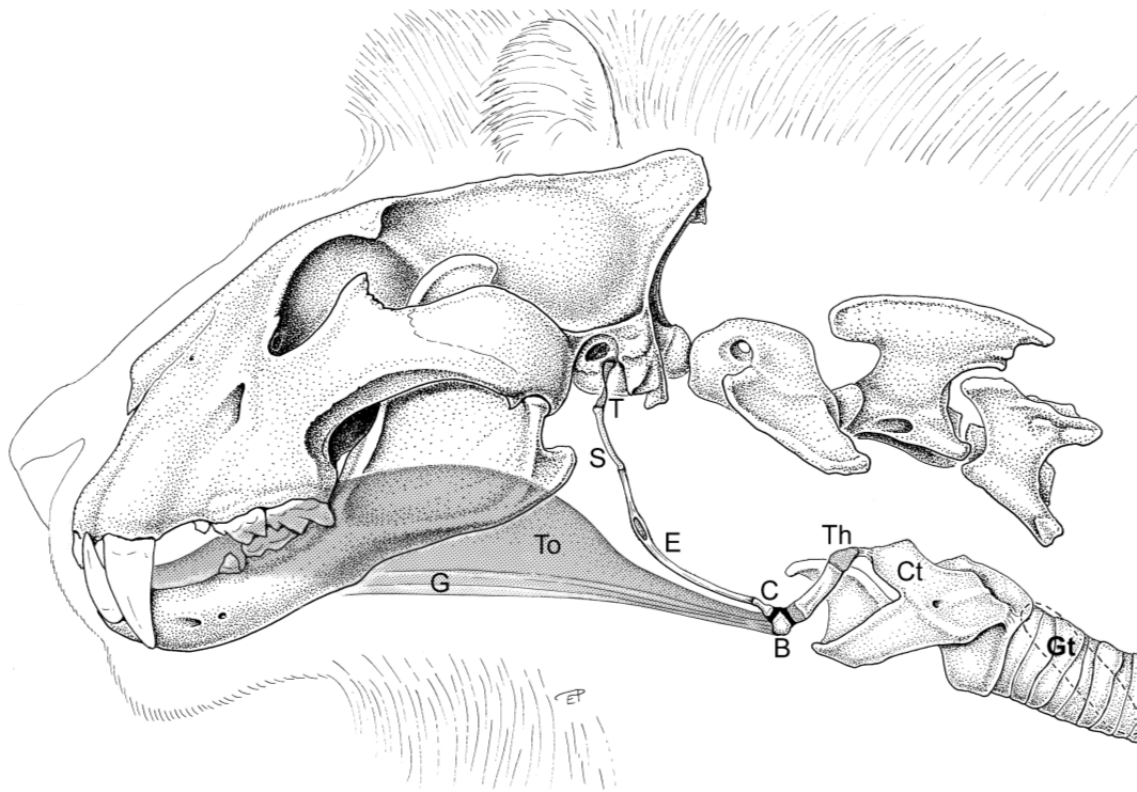


Fig. 1. Aparato hioides, laringe y parte craneal de la tráquea en el león. G: *M. geniohyoideus*; To: lengua; T: *Tympanohyoideum*; S: *Stylohyoideum*; E: *Epihyoideum*; C: *Ceratohyoideum*; B: *Basiyoideum*; Th: *Thyrohyoideum*; Ct: *Cartilago thyroidea*; Gt: *Glandula thyroidea* (línea de puntos). (Weissengruber et al., 2002).

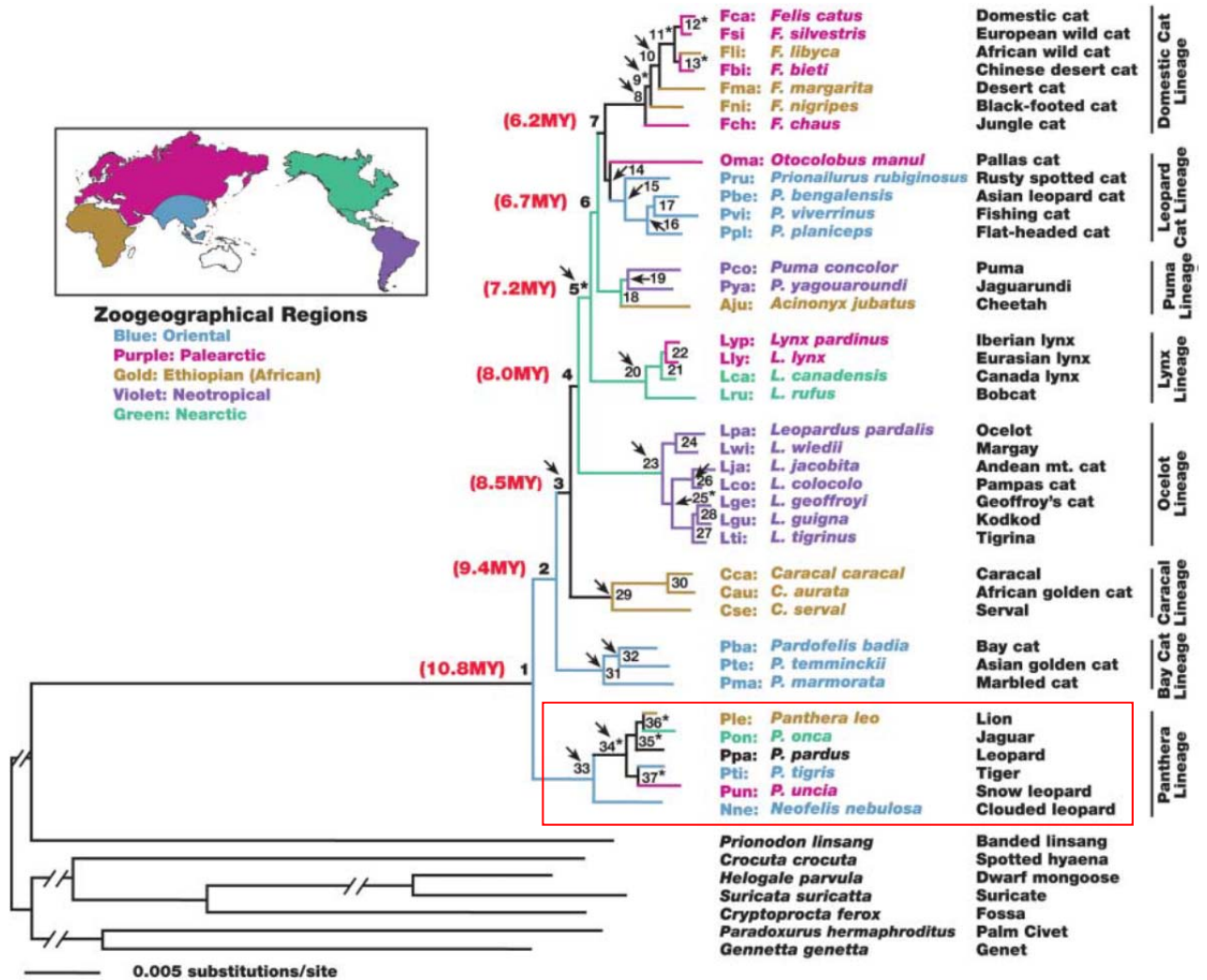


Fig. 2. Relaciones filogenéticas entre las especies de los félidos y los grupos externos representados en un árbol de máxima verosimilitud a partir de 18853 pares de bases del ADN nuclear. Las ramas terminales están etiquetadas con un código de tres letras, el nombre científico y el nombre común. Los nombres científicos y las ramas tienen un código de colores que indica sus regiones históricamente geográficas, extrapoladas de su distribución actual, su registro fósil y los análisis filogenéticos. Las ramas negras indican o unas interpretaciones históricas menos precisas o unas distribuciones geográficas de más de una zona zoogeográfica. Las ramas marcadas con un asterisco indican una baja resolución. El cuadro rojo indica la posición del género *Panthera*. (Johnson, 2006).

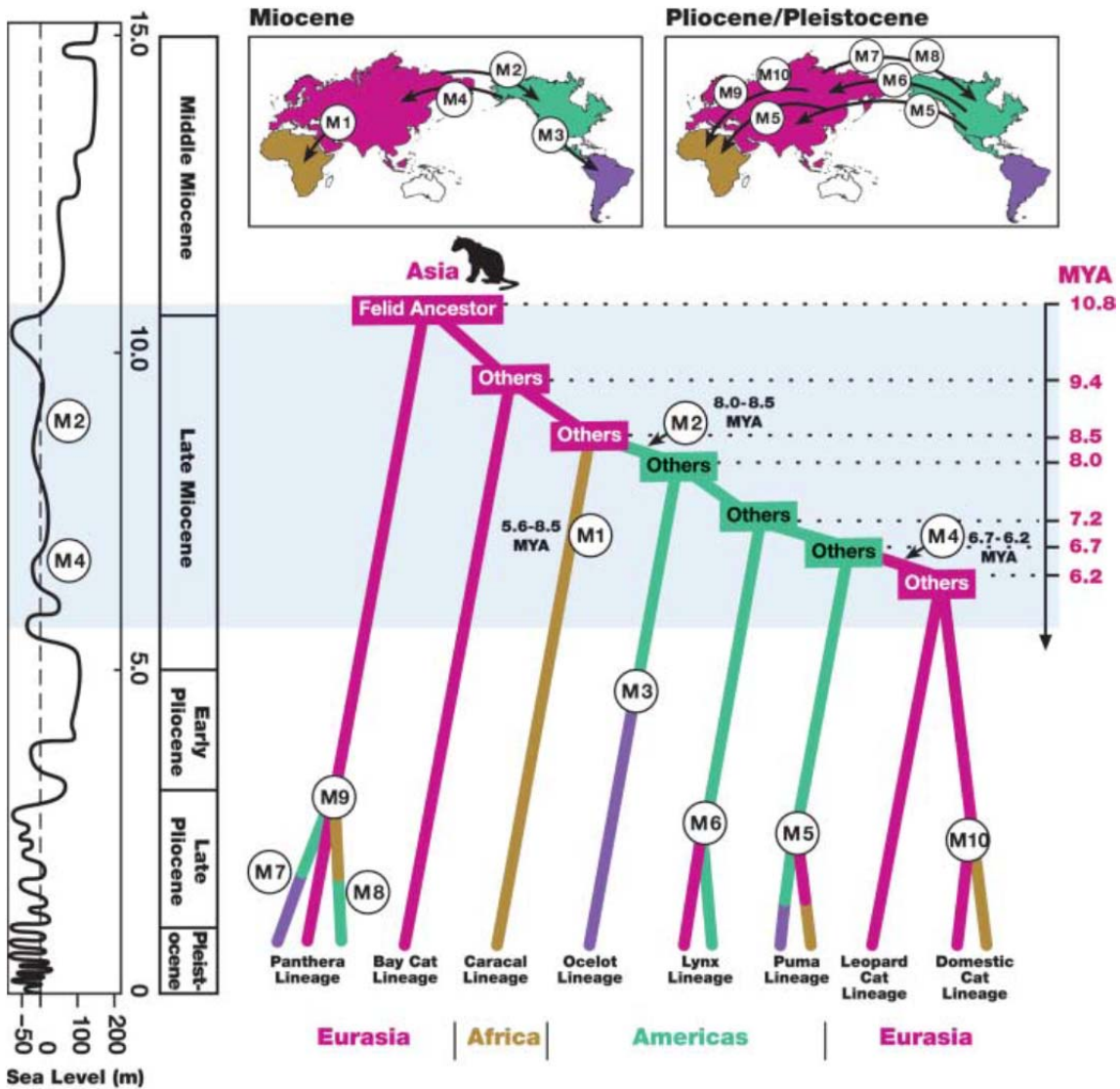


Fig. 3. Esquema de la divergencia de los félidos inferidos a partir de migraciones intercontinentales a lo largo de los linajes filogenéticos de la Fig. 3 sacados de datos Bayesianos, análisis filogenéticos, el registro fósil, la distribución actual de las especies y un análisis de posibles escenarios de migración. (Johnson, 2006).

Aunque antiguamente había sobre diez especies y numerosas subespecies, actualmente las especies que comprenden el género son solamente cuatro:

Panthera tigris (Linnaeus, 1758) o tigre fue la primera especie en diferenciarse. Es el más grande de los félidos y se caracteriza por un pelaje de naranja a rojizo con un patrón de rayas negras (Fig. 4). Se encuentran en gran variedad de hábitats, prefiriendo aquellos con vegetación densa. En la actualidad su distribución se reduce a unas pocas zonas de Asia, concretamente la India, regiones rusas y el oeste de China (Fig. 5). En nuestro trabajo se estudiarán dos subespecies de tigre, el *P. tigris altaica* y el *P. tigris amoyensis* que se localizan en la región de Amur (Siberia) y en la región de Amoy (sur de China) respectivamente (Tigers-world.com, 2016).



Fig. 5. Distribución actual de *Panthera tigris*

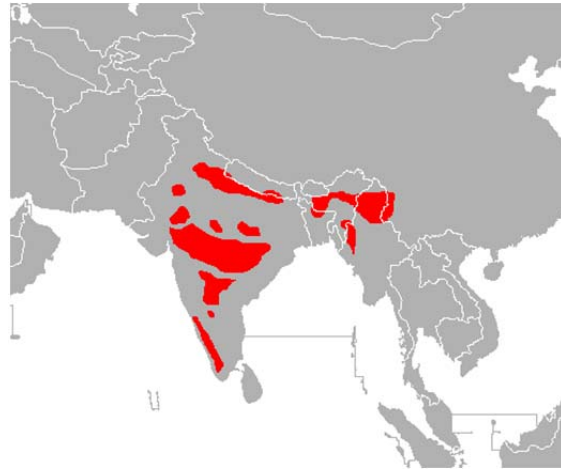


Fig. 4. *Panthera tigris*

Panthera pardus (Linnaeus, 1758) o leopardo (Fig. 6). Se caracteriza por un pelaje amarillento salpicado por manchas negras. En la naturaleza también puede aparecer una variante de leopardo con el pelaje negro (Fig. 7), comúnmente conocido como pantera, pero que no es en absoluto una especie aparte. Se adapta fácilmente a muchos tipos de hábitats, desde la selva tropical hasta el desierto. Este felino se encuentra más anchamente distribuido por el África Subsahariano, el sur de Asia y con poblaciones fragmentadas en el norte de África, Medio este, India, Malasia, Indochina y China oeste (Fig. 8), (Felineworlds.com, 2016).



Fig. 6. *Panthera pardus*



Fig. 7. *Panthera pardus nigripa*

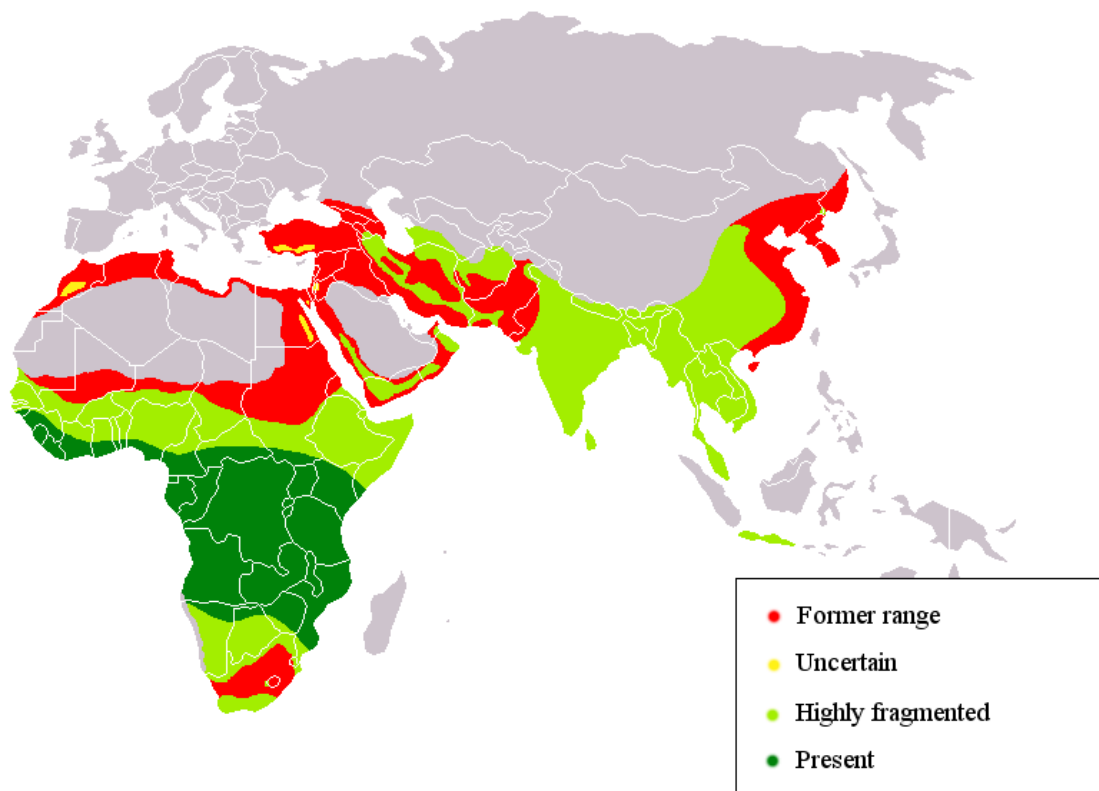


Fig. 8. Distribución de *Panthera pardus*

Panthera onca (Linnaeus, 1758) o jaguar (Fig. 9). Al igual que el leopardo este espécimen también posee un pelaje entre amarillo y marrón moteado, sin embargo sus manchas poseen



una morfología diferente. Su hábitat se asocia a la presencia de agua y prefiere los bosques y/o selvas con densa vegetación. Esta especie es la única del género *Panthera* que se encuentra en el Nuevo Mundo, concretamente en México, América Central y Sudamérica (Fig. 10) (Felineworlds.com, 2016).



Fig. 9. *Panthera onca*



Fig. 10. Distribución de *Panthera onca*: el área rosa representa los lugares donde solía estar presente mientras que el área roja representa los lugares donde el animal está presente actualmente.

Panthera leo (Linnaeus, 1758) o león (Fig. 11). Se caracteriza por ser el único felino con un claro dimorfismo sexual, la presencia de melena en los machos (Fig. 12). Es también el único felino con organización social, la mayoría de los individuos viven en manadas donde abundan las hembras en comparación con los machos. Sin embargo, también existen los llamados leones nómadas que viven en solitario o en parejas. Los leones habitan en gran variedad de



Filogenia del género *Panthera*

hábitats y actualmente existen dos subpoblaciones localizadas en África (*P. leo leo*) y Asia (*P. leo persica*), localizándose este último únicamente en el Bosque de Gir, India (Fig. 13 y 14) (Felineworlds.com, 2016).



Fig. 11. *Panthera leo*



Fig. 12. Familia de leones: hembra a la izquierda y macho con melena a la derecha.

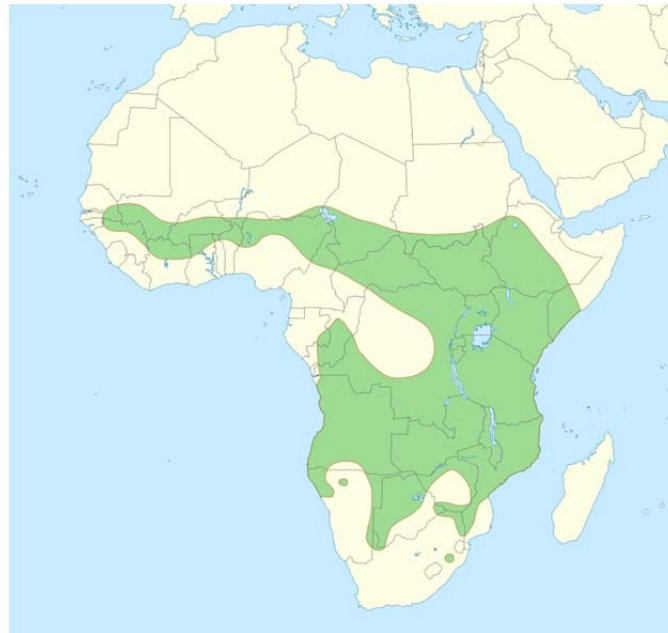


Fig. 13. Distribución del león africano (*P. leo leo*)



Fig. 14. Distribución del león asiático (*P. leo persica*)



Filogenia del género *Panthera*

Panthera uncia o leopardo de las nieves (Fig. 15). Se caracteriza por un pelaje de gris a blanco con manchas y por poseer rasgos de adaptación a la nieve como una larga cola que usan para termorregularse. Habita en zonas montañosas de Asia Central, con predominancia en China y Mongolia (Fig. 16) (Felineworlds.com, 2016). Esta especie es la única del género que no es capaz de rugir dado que no posee la morfología adecuada en su aparato hioides, es por esto que su posición filogenética dentro de este grupo sigue siendo una incógnita.



Fig. 15. *Panthera uncia*.

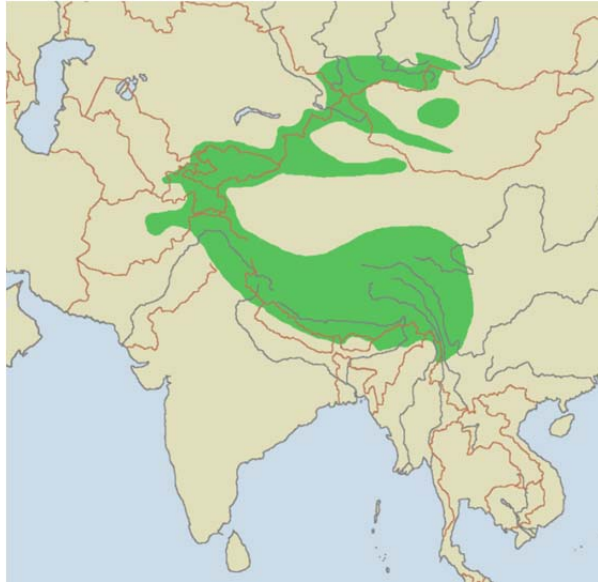


Fig. 16. Distribución de *Panthera uncia*.

En la mayoría de los mamíferos la identificación de las especies se hace basándose en la morfología de las calaveras y las mandíbulas, sin embargo, estas morfologías son muy similares dentro del género *Panthera*, por lo que se debe recurrir a otros métodos, como puede ser el análisis de genes mitocondriales.

La mitocondria es uno de los orgánulos que se encuentran en el citoplasma de casi todas las células. Éstas están encargadas de la producción de energía en la célula y además poseen un material genético propio, independiente del ADNnc. A la hora de construir relaciones filogenéticas el uso del ADNmt en vez del nuclear proporciona varias ventajas. En el ADNmt el ratio de sustitución nucleotídico entre genes es más rápido que el ADNnc. Además, este material genético se hereda como una única unidad haploide que posee una tasa de recombinación muy baja, por lo que el tamaño efectivo de la población es más pequeña, dándonos un menor tiempo de coalescencia por loci mitocondrial (Springer et al., 2001).

El genoma mitocondrial es básicamente igual en todos los mamíferos, posee los mismos genes. En el caso de *Panthera* contiene 13 genes (Fig. 17), de los cuales usaremos 5 en este trabajo:

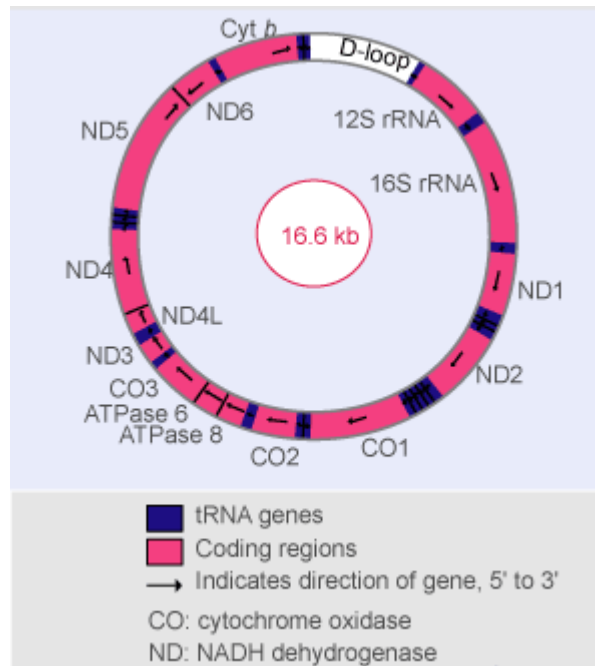


Fig. 17. ADN mitocondrial de mamíferos

ND1: codifica para la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa.

COX1: codifica para la subunidad 1 del citocromo c oxidasa.

APT8: codifica para la subunidad 8 de la ATP sintetasa F0.

CYTB: codifica para el citocromo B

16S: produce el RNA ribosómico 16S.

Rocío Roca Couso



Filogenia del género *Panthera*

OBJETIVOS

Establecer relaciones filogenéticas entre las especies y subespecies del género *Panthera*.

Averiguar las diferencias entre las sustituciones nucleotídicas de cinco genes mitocondriales de las especies.

Saber si estas diferencias están influenciadas por la selección natural.



MÉTODOS Y MATERIALES

- a) Obtención de las secuencias nucleotídicas.

Para la obtención de las secuencias nucleotídicas de los genes específicos de cada especie se recurrió a la base de datos GenBank del NCBI. Los códigos de las especies son KP202262 para *Panthera leo leo*, JQ904290 para *Panthera leo persica*, KF483864 para *Panthera onca*, EF551002 para *Panthera pardus*, EF551003 para *Panthera tigris altaica*, HM589215 para *Panthera tigris amoyensis* y EF551004 para *Panthera uncia* (Ncbi.nlm.nih.gov, 2016).

- b) Alineamiento de secuencias.

Los alineamientos múltiples de nucleótidos se llevaron a cabo con el programa Clustal X (Thompson et al., 1997) con los parámetros que da el programa por defecto (*gap opening* 15; *gap extension* 6,6).

- c) Análisis de sesgo de codones y de sustituciones nucleotídicas.

El análisis del sesgo en el uso de codones se llevó a cabo con el programa DNAsp5 (Librado and Rozas, 2009) y es plasmado como Número Efectivo de Codones (ENC), Índice de Tendencia de Codones (CBI) y Chi Cuadrado Escamosa (Schi2).

ENC es un índice que asigna a un gen un número del 20 al 61 que nos dice en qué grado el código genético es usado. Un valor de 20 indica que solamente un codón es usado para cada aminoácido, mientras que un valor de 61 indica que todos los codones son usados por igual. Para calcularlo es necesario conocer la homocigosidad de un codón (\hat{F}_{aa}) para aminoácidos individuales. ENC se calcula con la siguiente formula (Fuglsang, 2005):

$$ENC = 2 + \frac{9}{\hat{F}_2} + \frac{1}{\hat{F}_3} + \frac{5}{\hat{F}_4} + \frac{3}{\hat{F}_6}$$

\hat{F}_i : homocigosidad media para la clase con x codones sinónimos. Se calcula con la siguiente fórmula (Fuglsang, 2005):

$$\hat{F}_{aa} = \frac{\sum n_i \times \sum p_i^2 - 1}{\sum n_i - 1}$$

Donde n_i es el número de codones y p_i es la probabilidad de que dos codones aparezcan juntos.

Los coeficientes 9, 1, 5 y 3 aparecen por el número de aminoácidos pertenecientes a las diferentes clases; es decir, en el código genético nuclear hay nueve aminoácidos con dos codones sinónimos cada uno, un aminoácido con tres, cinco aminoácidos con cuatro y tres



Filogenia del género *Panthera*

con seis. En nuestro caso la fórmula varía un poco debido a que usamos el código genético mitocondrial de mamíferos y no el nuclear.

CBI es un índice que asigna un número del 0 al 1. Un valor de 0 nos indica un uso uniforme de codones mientras que un valor de 1 nos indica que hay sesgo. La fórmula para calcularlo es:

$$CBI = \sum_{i=1}^{18} n_i / n_{tot} \left(\sum_{j=1}^{S_i} \frac{(1 - R_{ij})}{(S_i - 1)} \right)$$

S_i : número de codones sinónimos para cada aminoácido i .

n_i : número de apariciones de cada aminoácido x .

n_{tot} : número total de residuos Excluyendo metionina y triptófano debido a que sólo tiene un codón (en el código genético nuclear).

R: uso relativo de los codones sinónimos.

Por último, SChi2 es un índice calculado a partir de una Chi Cuadrada que se calculó para la desviación del uso igualitario de codones dentro de los grupos sinónimos, divididos por el número total de codones en el gen, quitando metionina y triptófano.

Por otra parte, las sustituciones nucleotídicas también fueron analizadas por el DNAsp5. Se calcularon la proporción de diferencias sinónimas (p_s) y no sinónimas (p_n) (Nei and Gojobori, 1986):

$$p_s = \frac{S_d}{S}$$

$$p_n = \frac{N_d}{N}$$

Donde S y N son el número medio de sitios sinónimos y no sinónimos entre dos secuencias comparadas. Para estimar el número de sustituciones sinónimas (d_s) y no sinónimas (d_n) se usó la siguiente fórmula (Nei and Gojobori, 1986).

$$d = -\frac{3}{4} \log_e \left(1 - \frac{4}{3} p \right)$$

Donde p , puede ser tanto p_n como p_s .

Por último se calcularon los índices K_s y K_a , que son el número de sustituciones sinónima por sitio sinónimo y el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo respectivamente. Es decir:



$$K_s = d_s/p_s$$

$$K_a = d_n/p_n$$

d) Análisis filogenético.

La reconstrucción de los árboles filogenéticos a partir de los alineamientos fue llevado a cabo siguiendo el mejor modelo ADN/proteína para cada alineamiento. Esto se realizó mediante el método de Posada que se encuentra implementado en el MEGA6, el cual somete a un archivo de datos a una bondad de ajuste para algunos modelos evolutivos y devuelve los valores de varios criterios para que podamos usar el modelo más apropiado en cada uno de nuestros análisis (Nei and Kumar, 2000; Tamura et al. 2013). Para el árbol basado en el gen ND1 el modelo fue el de Hasegawa-Kihino-Yano usando una distribución Gamma (HKY+G). Para el árbol basado en el gen COX1 fue el modelo de Tamura 3-parameter con distribución Gamma (T92+G). Para el árbol basado en el gen CYTB fue el modelo Hasegawa-Kishino-Yano asumiendo que cierta fracción de los sitios son evolucionariamente invariables (HKY+I). El siguiente árbol, el basado en el gen ATP8, siguió el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY). El árbol basado en el gen 16S siguió el modelo de Tamura-Nei con distribución Gamma (TN93+G). Por último, el árbol basado en los genes concatenados siguió el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano con distribución Gamma (HKY+G). y usándose el método Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987). Esta reconstrucción fue llevada a cabo con el programa MEGA6 (Tamura et al. 2013). Además se verificó la fiabilidad de las ramas mediante la estima de los valores de bootstrap.

**RESULTADOS**

a) Análisis de tendencia del uso de codones.

Se calcularon los índices ENC, CBI y SChi2 para cada gen y cada especie (Tabla 2)

Tabla 2. Índices de sesgo de codones para los cuatro genes y las especies.

Especies	ND1			COX1			ATP8			CYTB		
	ENC	CBI	SChi2	ENC	CBI	SChi2	ENC	CBI	SChi2	ENC	CBI	SChi2
<i>P. tigris altaica</i>	40,37	0,50	0,62	48,21	0,29	0,23	55,24	0,50	0,63	41,10	0,45	0,49
<i>P. tigris amoyensis</i>	40,76	0,50	0,59	48,38	0,28	0,23	53,52	0,57	0,83	41,31	0,44	0,47
<i>P. pardus</i>	43,22	0,51	0,59	47,86	0,32	0,27	43,05	0,61	0,97	45,09	0,41	0,42
<i>P. onca</i>	37,71	0,54	0,61	47,95	0,32	0,26	55,41	0,66	0,89	42,90	0,47	0,47
<i>P. leo</i>	41,60	0,56	0,59	46,57	0,35	0,28	44,82	0,61	0,75	43,80	0,42	0,42
<i>P. leo persica</i>	41,71	0,56	0,58	46,17	0,35	0,29	44,82	0,61	0,75	44,33	0,41	0,42
<i>P. uncia</i>	40,56	0,53	0,58	48,64	0,29	0,24	59,22	0,58	0,62	42,71	0,49	0,50

ENC: Effective Number of Codons. CBI: Codon Bias Index. SChi2: Scaled Chi Square.



Se puede ver que el valor más bajo de ENC es 37,71 en el ND1 de *P. onca*, mientras que el valor más alto es 59,23 en el gen ATP8 de *P. uncia*. Sin embargo, señalar que los valores para el gen ND1 son más bajos que para el resto de los genes.

En el CBI el valor más alto es el 0,61 y aparece en el gen AT8 de *P. leo persica* mientras que el más bajo es 0,28 y aparece en el gen COX1 de *P. tigris amoyensis*. De hecho, se puede apreciar que en general todos los valores del gen COX1 son más bajos que en el resto de los genes.

Por último, en el SCh2 el valor más alto es 0,97 en el gen ATP8 de *P. pardus* y el más bajo es 0,23 en el gen COX1 de *P. tigris amoyensis*. Al igual que con el CBI, los valores para COX1 son considerablemente más bajos que en el resto de los genes.

b) Análisis de sustitución nucleotídica.

Se calcularon número total de diferencias sinónimas (SynDif), número total de sitios sinónimos (SynPos), número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (Ks), número total de diferencias no sinónimas (NSynDif), número total de sitios no sinónimos (NSynPos) y número total de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (Ka) para las especies por parejas, para cada gen (Tablas de 5 a 8).

Tabla 3. Diferencias sinónimas (por encima de la diagonal) y no sinónimas (por debajo de la diagonal) del gen ND1.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		3	81	74	87	88	84
<i>P. tigris amoyensis</i>	3		81	74	87	88	84
<i>P. pardus</i>	8	7		81	54	53	65
<i>P. onca</i>	12	11	6		77	78	65
<i>P. leo</i>	6	5	2	6		1	56
<i>P. leo persica</i>	6	5	2	6	0		55
<i>P. uncia</i>	7	6	3	7	1	1	

Tabla 4. Número total de sitios sinónimos (por encima de la diagonal) y no sinónimos (por debajo de la diagonal) en el gen ND1.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		245,00	246,69	546,50	246,50	246,50	246,17
<i>P. tigris amoyensis</i>	709,00		247,00	246,83	246,83	246,83	246,50
<i>P. pardus</i>	707,33	707,00		248,50	248,50	248,50	248,17
<i>P. onca</i>	707,25	707,17	705,50		248,33	248,33	248,00
<i>P. leo</i>	707,50	707,17	705,50	705,67		248,33	248,00
<i>P. leo persica</i>	707,50	707,17	705,50	705,67	705,67		248,00
<i>P. uncia</i>	707,83	707,50	705,83	706,00	706,00	706,00	

Filogenia del género *Panthera*

Tabla 5. Ks (por encima de la diagonal) y Ka (por debajo de la diagonal) del gen ND1.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		0,012	0,432	0,384	0,477	0,485	0,455
<i>P. tigris amoyensis</i>	0,003		0,431	0,383	0,476	0,484	0,454
<i>P. pardus</i>	0,011	0,010		0,428	0,257	0,251	0,322
<i>P. onca</i>	0,017	0,016	0,009		0,400	0,407	0,322
<i>P. leo</i>	0,009	0,071	0,003	0,009		0,004	0,269
<i>P. leo persica</i>	0,009	0,007	0,003	0,009	0,000		0,263
<i>P. uncia</i>	0,010	0,009	0,004	0,010	0,001	0,001	

Tabla 6. Diferencias sinónimas (por encima de la diagonal) y no sinónimas (por debajo de la diagonal) del gen COX1.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		8,0	145,0	112,5	138,0	140,0	148,0
<i>P. tigris amoyensis</i>	3,0		149,0	114,5	142,0	144,0	144,0
<i>P. pardus</i>	7,0	10,0		90,0	85,0	87,0	108,0
<i>P. onca</i>	9,5	12,5	7,0		82,5	84,5	83,0
<i>P. leo</i>	6,0	9,0	2,0	7,5		4,0	105,0
<i>P. leo persica</i>	7,0	10,0	3,0	8,3	1,0		105,0
<i>P. uncia</i>	9,5	8,0	3,0	8,0	3,0	4,0	

Tabla 7. Número total de sitios sinónimos (por encima de la diagonal) y no sinónimos (por debajo de la diagonal) en el gen COX1.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		387,50	387,50	388,17	388,17	388,17	387,17
<i>P. tigris amoyensis</i>	1157,50		387,00	387,67	387,67	387,67	386,67
<i>P. pardus</i>	1157,50	1158,00		387,67	387,67	387,67	386,67
<i>P. onca</i>	1156,83	1157,33	1157,33		388,33	388,33	387,33
<i>P. leo</i>	1156,67	1157,33	1157,33	1156,67		388,33	387,33
<i>P. leo persica</i>	1156,83	1157,33	1157,33	1156,67	1156,67		387,33
<i>P. uncia</i>	1157,83	1158,33	1158,33	1157,67	1157,67	1157,67	

Tabla 8. Ks (por encima de la diagonal) y Ka (por debajo de la diagonal) del gen COX1.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		0,021	0,518	0,366	0,482	0,492	0,366
<i>P. tigris amoyensis</i>	0,003		0,540	0,375	0,503	0,513	0,515
<i>P. pardus</i>	0,006	0,009		0,278	0,259	0,267	0,349
<i>P. onca</i>	0,008	0,011	0,006		0,250	0,257	0,252
<i>P. leo</i>	0,005	0,008	0,002	0,007		0,010	0,336
<i>P. leo persica</i>	0,006	0,009	0,003	0,007	0,001		0,336
<i>P. uncia</i>	0,004	0,007	0,003	0,007	0,003	0,004	



Filogenia del género *Panthera*

Tabla 9. Diferencias sinónimas (por encima de la diagonal) y no sinónimas (por debajo de la diagonal) del gen ATP8.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		14,0	17,5	12,0	18,0	18,0	16,0
<i>P. tigris amoyensis</i>	4,0		9,5	6,0	12,0	12,0	8,0
<i>P. pardus</i>	6,5	4,5		7,5	8,0	8,0	11,5
<i>P. onca</i>	6,0	4,0	6,5		8,0	8,0	4,0
<i>P. leo</i>	3,0	1,0	3,0	3,0		0,0	12,0
<i>P. leo persica</i>	3,0	1,0	3,0	3,0	0,0		12,0
<i>P. uncia</i>	4,0	4,0	6,5	6,0	3,0	3,0	

Tabla 10. Número total de sitios sinónimos (por encima de la diagonal) y no sinónimos (por debajo de la diagonal) en el gen ATP8.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		49,17	49,00	48,83	48,17	48,17	49,50
<i>P. tigris amoyensis</i>	154,83		48,17	49,00	48,33	48,33	49,67
<i>P. pardus</i>	155,00	154,83		48,83	48,17	48,17	49,50
<i>P. onca</i>	155,17	155,00	155,17		48,00	48,00	49,33
<i>P. leo</i>	155,83	155,67	155,83	156,00		47,33	48,67
<i>P. leo persica</i>	155,83	155,67	155,83	156,00	156,67		48,67
<i>P. uncia</i>	154,50	154,33	154,50	154,67	155,33	155,33	

Tabla 11. Ks (por encima de la diagonal) y Ka (por debajo de la diagonal) del gen ATP8.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		0,358	0,485	0,298	0,517	0,517	0,423
<i>P. tigris amoyensis</i>	0,026		0,223	0,134	0,302	0,302	0,181
<i>P. pardus</i>	0,043	0,030		0,172	0,188	0,188	0,278
<i>P. onca</i>	0,040	0,026	0,043		0,189	0,189	0,086
<i>P. leo</i>	0,019	0,006	0,019	0,019		0,000	0,299
<i>P. leo persica</i>	0,019	0,006	0,019	0,019	0,000		0,299
<i>P. uncia</i>	0,026	0,026	0,043	0,040	0,019	0,019	

Tabla 12. Diferencias sinónimas (por encima de la diagonal) y no sinónimas (por debajo de la diagonal) del gen CYTB.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		9,0	103,0	106,5	103,0	103,0	104,0
<i>P. tigris amoyensis</i>	5,0		103,0	104,5	101,0	101,0	104,0
<i>P. pardus</i>	19,0	16,0		97,0	77,0	75,0	86,0
<i>P. onca</i>	14,5	13,5	16,0		96,0	96,0	102,0
<i>P. leo</i>	17,0	14,0	18,0	12,0		6,0	84,0
<i>P. leo persica</i>	17,0	14,0	18,0	12,0	0,0		84,0
<i>P. uncia</i>	26,0	23,0	22,0	23,0	25,0	25,0	

Filogenia del género *Panthera*

Tabla 13. Número total de sitios sinónimos (por encima de la diagonal) y no sinónimos (por debajo de la diagonal) en el gen CYTB.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		283,00	283,83	284,67	283,17	283,33	284,17
<i>P. tigris amoyensis</i>	857,00		283,83	284,67	283,17	283,33	284,17
<i>P. pardus</i>	856,17	856,17		285,50	284,00	284,17	285,00
<i>P. onca</i>	855,33	855,33	854,50		284,83	285,00	285,83
<i>P. leo</i>	856,83	856,83	856,00	855,17		283,50	284,33
<i>P. leo persica</i>	856,67	856,67	855,83	855,00	856,50		284,50
<i>P. uncia</i>	855,83	588,83	855,00	854,17	855,67	855,50	

Tabla 14. Ks (por encima de la diagonal) y Ka (por debajo de la diagonal) del gen CYTB.

	<i>P. tigris altaica</i>	<i>P. tigris amoyensis</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. onca</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. leo persica</i>	<i>P. uncia</i>
<i>P. tigris altaica</i>		0,033	0,496	0,518	0,500	0,497	0,502
<i>P. tigris amoyensis</i>	0,006		0,496	0,504	0,484	0,484	0,502
<i>P. pardus</i>	0,020	0,020		0,453	0,337	0,325	0,386
<i>P. onca</i>	0,017	0,016	0,019		0,448	0,447	0,484
<i>P. leo</i>	0,020	0,016	0,021	0,014		0,021	0,376
<i>P. leo persica</i>	0,020	0,016	0,021	0,014	0,000		0,375
<i>P. uncia</i>	0,031	0,027	0,026	0,027	0,030	0,030	

En las tablas anteriores podemos ver como los datos varían dependiendo de las especies involucradas y del gen que se esté analizando. Los índices más interesantes parecen ser Ks y Ka, pues son los que nos indican el porcentaje de sustituciones sinónimas y no sinónimas respectivamente. Vemos que en el caso de la Ks los valores oscilan entre el 0 y el 0,52, es decir, entre el 0% y el 52%. Mientras que si echamos un vistazo a la Ka los valores oscilan entre 0 y 0,04, es decir, entre el 0% y el 4%, mucho menores que en el caso anterior.

Un dato curioso que podemos observar en las gráficas es que, en general, el número de diferencias sinónimas y no sinónimas está más o menos directamente relacionado con la longitud de la secuencia, es decir, cuanto más larga sea la secuencia más diferencias sinónimas tiene. Así vemos que las secuencias más largas, las del COX1 con 1554 pb, son las que tienen unos valores de SynDif (Tabla 6) y de NSynDif (Tabla 7) más elevados, mientras que las secuencias más cortas, las del gen ATP8 con 204 pb, poseen valores de SynDif (Tabla 9) y de NSynDif (Tabla 10) más bajos.

c) Análisis filogenético.

Se reconstruyeron cinco árboles basándose en las secuencias nucleotídicas de cada gen individualmente y, a mayores, uno basado en la de los genes concatenados (Figuras de 18 a 23).

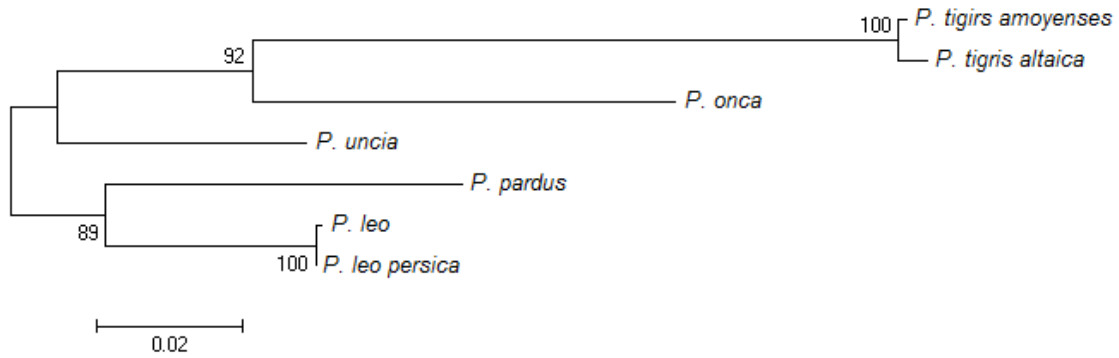


Fig. 18. Árbol filogenético basado en la secuencia nucleotídica del gen ND1 y el modelo evolutivo HKY+G. Sobre los nodos se indican los valores de bootstrap.

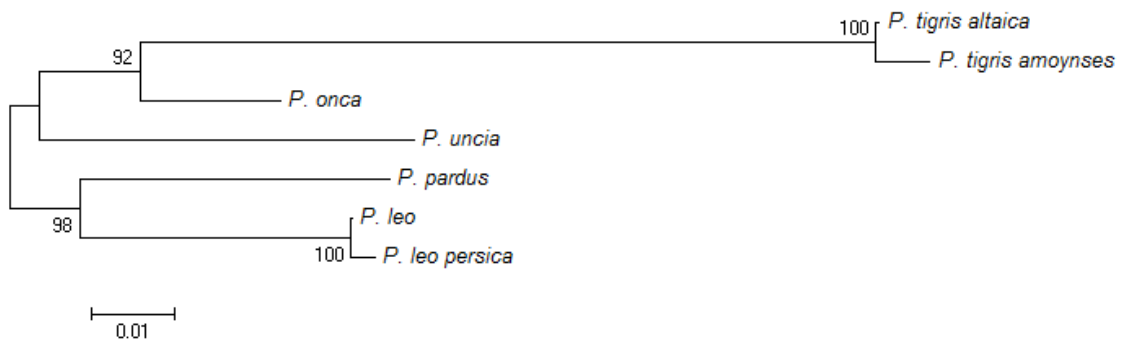


Fig. 19. Árbol filogenético basado en la secuencia nucleotídica del gen COX1 y el modelo evolutivo T92+G. Sobre los nodos se indican los valores de bootstrap.

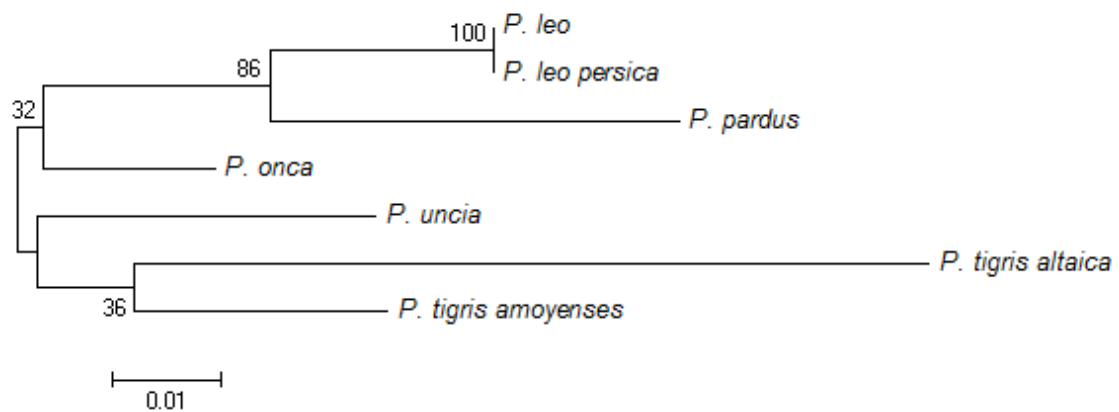


Fig. 20. Árbol filogenético basado en la secuencia nucleotídica del gen ATP8 y el modelo evolutivo HKY. Sobre los nodos se indican los valores de bootstrap.



Filogenia del género *Panthera*

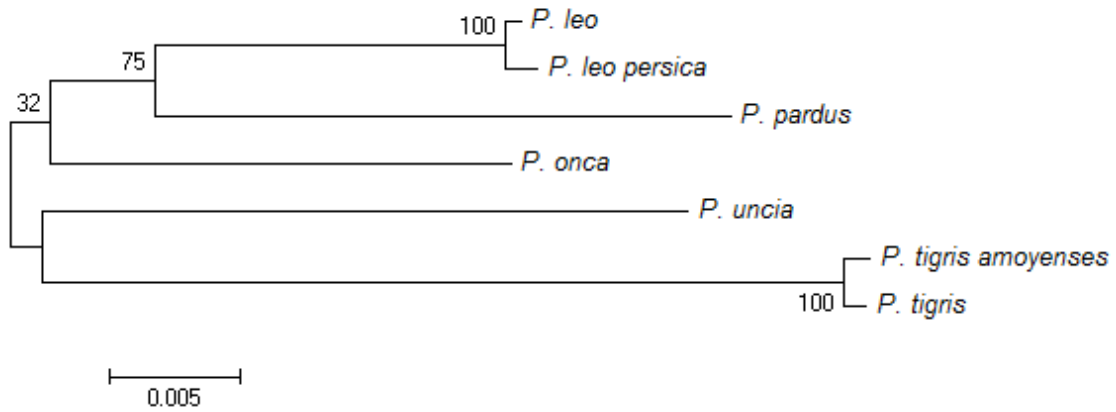


Fig. 21. Árbol filogenético basado en la secuencia nucleotídica del gen 16S y en el modelo evolutivo TN93+G. Sobre los nodos se indican los valores de bootstrap.

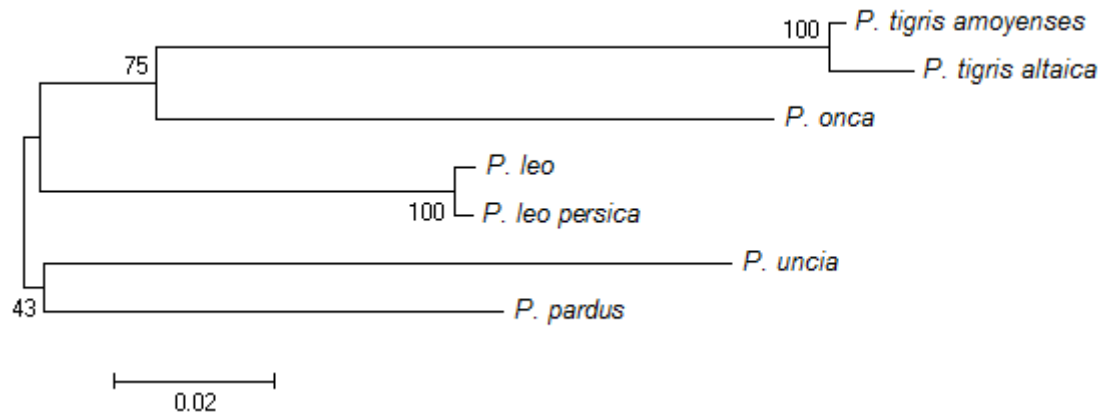


Fig. 22. Árbol filogenético basado en la secuencia nucleotídica del gen CYTB y en el modelo evolutivo HKY+I. Sobre los nodos se indican los valores de bootstrap.

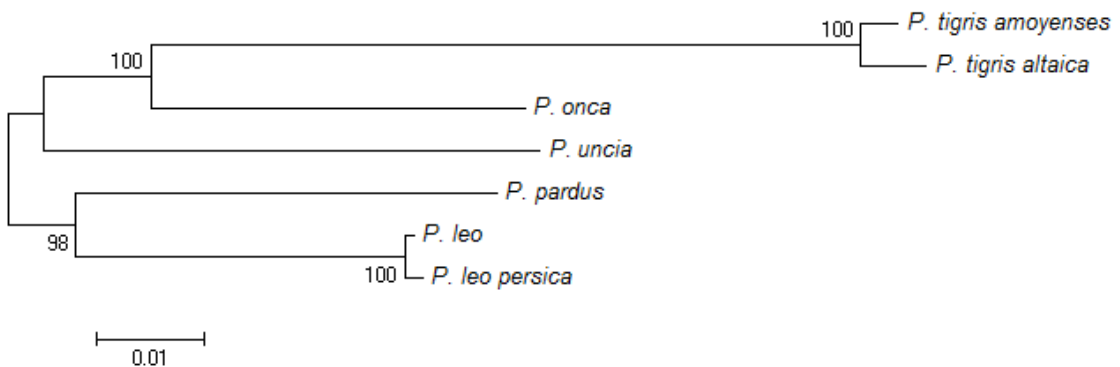


Fig. 23. Árbol filogenético basado en las secuencias nucleotídicas concatenadas de los genes ND1, COX1, ATP8, 16S y CYTB y por el modelo evolutivo HKY+G. Sobre los nodos se indican los valores de bootstrap.



Como vemos las morfologías de los árboles varían, tanto en la disposición de las ramas como en el orden de aparición de las especies. Por otro lado, los datos de bootstrap también varían, apareciendo de vez en cuando valores inferiores a 50, los cuales carecen de significancia.

En general se puede ver como las dos subespecies de *P. leo* comparten nodo con un valor de bootstrap del 100%, siendo la especie más cercana a ellas la *P. pardus* para todos los genes excepto para el CYTB. De forma similar, las dos subespecies de *P. tigris* también comparten nodo con elevados valores de bootstrap y, en este caso, la especie más próxima a ellas es *P. onca* para los genes ND1, COX1, CYTB y para los genes concatenados, mientras que la más próxima para los genes ATP8 y 16S es *P. uncia*. Llegados a este punto habría que aclarar que nosotros estamos reconstruyendo árboles de genes y no de especies, en los cuales se usan más genes para cada árbol.



DISCUSIÓN

a) Análisis de sesgo de codones.

Como bien sabemos, el código genético está degenerado, es decir, hay varios codones que codifican para el mismo aminoácido, los llamados codones sinónimos (Fig. 15). Un ejemplo son CAU y CAC que ambos codifican para la histidina.

UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys
UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Trp
UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp
CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
AUA Met	ACA Thr	AAA Lys	AGA Stop
AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Stop
GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

Fig. 15. Código genético mitocondrial de mamíferos: Los codones sinónimos aparecen en el mismo color.

Como vemos en la tabla anterior hay 64 codones, de los cuales 62 codifican para aminoácidos; sin embargo sólo hay 22 ARN transferentes en el genoma de las mitocondrias. Esto nos quiere decir que no hay un único ARNt para cada codón, si no que se repiten. Esto es debido al llamado tambaleo, la degeneración del código genético permite que haya una menor discriminación en la tercera base. En esta posición las Cs y las Us pueden ser leídas como Gs en el anticodon, así mismo que las As y las Gs pueden ser leídas como Us. Por otro lado, algunos ARNt contienen un nucleótido modificado, la inosina, que si está en la tercera posición puede emparejarse con As, Us o Cs (Fig. 16) (Nobelprize.org, 2016). Esto explica por qué sólo hay 22 ARNt para 62 codones.

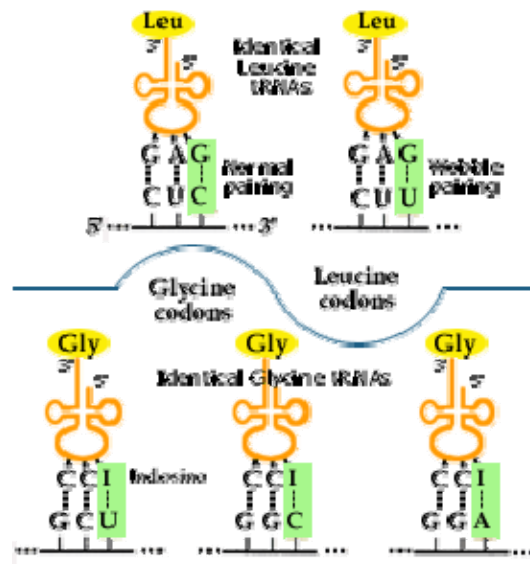


Fig. 16. Representación gráfica del tambaleo en los ARNt. Se puede ver cómo una G se une a una U (arriba) y como la inosina puede unirse tanto a la U, como a la C, como a la A (abajo).

El sesgo de codones es el fenómeno en el que codones específicos son usados en mayor frecuencia que sus sinónimos (Behura and Serverson, 2012), la cual varía entre y dentro de las especies. Se han hecho varias suposiciones acerca del sesgo de codones como que sea debido al resultado de un equilibrio entre selección mutacional y transduccional, que este fenómeno se expanda a través de las especies y que pueda contribuir a la evolución del genoma (Behura and Serverson, 2012).

El ENC (Effective Number of Codons), que nos tendría que dar valores entre 20 y 61, nos da valores entre 37 y 43 para el gen ND1 (Tabla 2), mientras que para el resto de los genes nos da valores entre 41 y 59. Por lo tanto, está claro que la tercera base del codón es un carácter totalmente neutral y por lo tanto la selección debería haber tendido a valores muy cercanos a 61. Por esto es relativamente interesante que en el ND1 los valores sean más o menos intermedios, pues nos quiere decir que en algunos aminoácidos hay cierto sesgo de codones, como en el caso de la prolina, cuyos codones sinónimos se usan en un 13,63%, 45,45%, 40,90% y 0%, en lugar del 25%, que sería lo equitativo (Tabla 24). Este caso parece coincidir con el uso de la inosina, pues como vemos el codón que no aparece es el que tiene una G en la tercera posición que, causalmente es la única base incapaz de unirse a la inosina.

Tabla 24. Sesgo de codones en el gen ND1 de *P. leo*.

Codon	Nº de veces que aparece
CCU-P	3
CCC-P	10
CCA-P	9
CCG-P	0



Filogenia del género *Panthera*

En los otros genes, la mayoría de los valores rondan el 45, lo cual quiere decir que están a medio camino entre el sesgo y el uso equitativo de codones, aunque con una clara tendencia hacia lo segundo. Por otro lado, hay genes como el ATP8 en *P. onca*, *P. tigris altaica*, *P. tigris amoyensis* y *P. uncia* (Tabla 2) que registran unos valores muy próximos a 61.

En el CBI (Codon Bias Index), como cabía esperar, los datos discrepan un poco con los obtenidos con el índice anterior; muchos de los casos nos dan datos superiores a 0.5, lo cual nos indica que hay tendencia hacia un codon, mientras que el ENC nos indicaba lo contrario. Esto podría ser debido a la diferente forma que tienen los algoritmos de estimar el sesgo. En general los autores consideran al ENC como el estadístico más fiable. Como ya hemos dicho, los datos rondan el 0,5 para todos los genes excepto para el COX1 que nos da valores en torno al 0.3, el cual nos indica un uso más uniforme de los codones para este gen. Esto se puede apreciar en el ácido aspártico del gen COX1 de *P. leo*, cuyos codones tiene un uso del 47% y del 53% (Tabla 25).

Tabla 25. Sesgo de codones del gen COX1 en *P. leo*.

Codon	Nº de veces que aparece
GAU-D	8
GAC-D	7

El Schi2 (Scaled Chi Square) es el estadístico menos usado para medir el sesgo de codones, pero como vemos en este caso, nos da valores similares a los obtenidos con CBI, confirmando que en el gen COX1 el uso de codones es más uniforme.

El hecho de que haya unos codones que se usan más que otros nos indica que debe haber algún tipo de selección, en concreto la selección transduccional, es decir, la selección de aquellos codones que se puedan traducir de forma más rápida y precisa (Supek et al., 2010).

b) Análisis de sustitución nucleotídica.

Las sustituciones nucleotídicas son un tipo de mutaciones puntuales en las que un nucleótido es cambiado por otro. Estas sustituciones pueden ser de dos tipos, sinónimas o no sinónimas.

Las sustituciones sinónimas son aquellas en las que, aunque cambie la secuencia nucleotídica, la aminoacídica permanece intacta. Estas sustituciones producen un cambio neutral, que tengan un nucleótido u otro no afecta a la supervivencia del individuo, por lo tanto, no se ven afectados por la selección natural. Sin embargo, estos cambios pueden no ser neutrales si hay sesgo de codones, es decir, si es más fácil traducir un codon y no otro, aquellos individuos que tengan el codon favorable tendrán una ventaja sobre el resto.

Las sustituciones no sinónimas son aquellas que alteran la secuencia aminoacídica, produciendo un cambio biológico que puede ser afectado por la selección natural.



Se calcularon diferentes índices en las especies por parejas.

Si analizamos los datos gen a gen vemos que en el primer caso, en el gen ND1 (Tabla 5), el máximo de diferencias sinónimas es un 35% y el de no sinónimas un 1,5%. En el COX1 (Tabla 8), el número de diferencias sinónimas aumenta hasta el 54% mientras que el de no sinónimas se mantiene sobre el 1%. Para el gen ATP8 (tabla 11), los valores son del mismo rango con un porcentaje de diferencias sinónimas del 50% mientras que el de no sinónimas aumenta hasta el 4%. Finalmente en el gen CYTB (Tabla 14), el porcentaje máximo de diferencias sinónimas sigue siendo sobre 52% y el de no sinónimas está sobre el 3%.

En todos los genes, las parejas que menor porcentaje tienen son aquellas formadas por subespecies de la misma especie, es decir, la pareja de leones y la de tigres. Esto nos confirma como ya sabíamos que son subespecies muy relacionadas.

Por otra parte, aquellas parejas que presentan un mayor porcentaje de diferencias son las formadas por un *P. leo* y un *P. tigris*, lo cual nos coincide con que estas dos especies sean las más alejadas evolutivamente hablando, pues el tigre fue la primera especie en divergir y el león fue la última.

c) Análisis filogenético.

Como ya dijimos anteriormente, nuestros árboles nos indican que *P. tigris* y *P. onca* son especies próximas, al igual que *P. leo* y *P. pardus*. Sin embargo, si comparamos estos resultados con los obtenidos en la Fig. 2 vemos que esta agrupa a *P. tigris* y *P. uncia* como especies próximas y a *P. leo* con *P. onca* y *P. pardus*, es decir, algo completamente diferente de lo que hemos obtenido nosotros. Aunque si nos fijamos en los árboles reconstruidos a partir de los genes ATP8 y 16S (Fig. 20 y 21), vemos que hay coincidencia, que agrupa a las especies de la misma manera.

Las diferencias entre nuestros árboles y el de la Fig. 2 pueden ser debidas a que los nuestros están basados en ADNmt mientras que el otro está basado en ADNnc. La evolución de estos dos ADNs no siempre coincide debido a diversos factores. Por un lado el tamaño efectivo de la población es cuatro veces menor en el ADNmt, debido a que su transmisión es únicamente vía materna. Y por otro lado, en los momentos iniciales a la divergencia, los híbridos ancestrales podrían transmitir en algunos casos el ADNnc correctamente pero transmitir el ADNmt de forma defectuosa debido a que cuando dos especies están divergiendo suelen ser los machos de la F1 los primeros en ser estériles, mientras que las hembras son fértiles. Este hecho puede dar lugar a los sesgos en la divergencia entre los dos ADN.



CONCLUSIONES

Aunque se sabe que la tercera posición de los codones es un rasgo neutral que no está influenciado por la evolución y que por lo tanto el uso de los codones debería ser igual, vemos que no es así. Esto puede ser debido a la selección transduccional que favorece la permanencia de los codones cuya traducción sea más rápida y precisa.

En el caso de las sustituciones sinónimas y no sinónimas parece que están relacionadas con la longitud de las secuencias de los genes, aumentando en número cuando estas aumentan en longitud.

Por último, la mayoría de los análisis filogenéticos de nuestros genes colocan próximas a las especies *P. tigris* y *P. onca* y a las especies *P. leo* y *P. pardus*. Esto discrepa con análisis anteriores, sin embargo esto se puede deber a que nosotros usamos ADNmt mientras que los otros se realizaron a partir de ADNnc.

CONCLUSIÓNS

Aínda que se sabe que a terceira posición dos codons é un rasgo neutral que non está influenciado pola evolución e que polo tanto o emprego dos codons debera ser o mesmo, vemos que non é así. Isto pode ser debido á selección transduccional que favorece a permanencia dos codons cuxa tradución sexa máis rápida e precisa.

No caso das substitucións sinónimas e non sinónimas parece ser que están relacionadas coas lonxitudes das secuencias dos xenes, aumentando en número cando estas aumentan en lonxitude.

Por último, a mayoría das análises filoxenéticas dos nosos xenes colocan próximas as especies *P. tigris* e *P. onca* e as especies *P. leo* e *P. pardus*. Isto discrepa con análises anteriores, sen embargo isto pode ser debido a que nós usamos ADNmt mentres que os outros realizáronse a partir de ADNnc.

CONCLUSIONS

Even though it is known the third position in a codon is a neutral trait which is not influenced by the natural selection and therefore the codon usage should be the same, we see it is not like that. This may be due to the translational selection which keeps those codons whose translation is easier and more accurate.

Synonymous and non synonymous substitutions may be related with genes' length, the number of substitutions increase with the length.

Finally, most of ours phylogenetic analysis group *P. tigris* and *P. onca* together and *P. leo* and *P. pardus* together. This disagree with previous analysis but it may be due to the fact that we have used mtDNA and the others have used ncDNA.

**BIBLIOGRAFÍA**

Behura, S. and Severson, D. (2012). Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes. *Biological Reviews*, 88, pp. 49-61.

Darriba, D. Taboada, G.L. Doallo, R. Posada, D. (2012). jModelTest 2: mormodels, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, pp. 772.

Felineworlds.com. (2016). *Información sobre el Jaguar – Felinos Información y Características*. [online] Available at: <http://www.felineworlds.com/jaguar/informacion-sobre-el-jaguar/> [Accessed 15 Jun. 2016].

Felineworlds.com. (2016). *Información sobre el León – Felinos Información y Características*. [online] Available at: <http://www.felineworlds.com/leon/informacion-sobre-el-leon/> [Accessed 15 Jun. 2016].

Felineworlds.com. (2016). *Información sobre el Leopardo – Felinos Información y Características*. [online] Available at: <http://www.felineworlds.com/leopardo/informacion-sobre-el-leopardo/> [Accessed 15 Jun. 2016].

Fuglsang, A. (2005). Estimating the "Effective Number of Codons": The Wright Way of Determining Codon Homozygosity Leads to Superior Estimates. *Genetics*, 172, pp.1301-1307

Itis.gov. (2016). *ITIS Standard Report Page: Panthera*. [online] Available at: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=180592 [Accessed 4 Jun. 2016].

Johnson, W. (2006). The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. *Science*, 311, pp. 73-77.

Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, pp. 1451-1452.

Ncbi.nlm.nih.gov. (2016). *National Center for Biotchnology Information*. [online] Available at: <http://www.ncbi.nlm.gov/> [Accessed 15 Jun. 2016].

Nei, M. and Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol*, 3, pp. 418-426.

Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press.

Nobelprize.org. (2016). DNA-RNA-Protein. [online] Available at: http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/trna_wobble.html [Accessed 19 Jun. 2016].

Pendientedemigracion.ucm.es. (2016). *TRADUCCIÓN*. [online] Available at: <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/grupod/Traduccion/traduccion.htm> [Accessed 15 Jun. 2016].

Saitou, N. and M. Nei. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*, 4, pp. 406–425.

Springer, M., DeBry, R., Douady, C., Amrine, H., Madsen, O., de Jong, W. and Stanhope, M. (2001). Mitochondrial Versus Nuclear Gene Sequences in Deep-Level Mammalian Phylogeny Reconstruction. *Molecular Biology and Evolution*, 18, pp. 132-143.



Filogenia del género *Panthera*

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, pp. 2725-2729.

Thompson, JD., Gibs, TJ., Plewnia, F., Jeanougin, F., Higgins, DG. (1997). The Clustal winows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis toos. *Nuclid Acids Res*, 24, pp. 4876-482.

Tigers-world.com. (2016). Información sobre el Tigre – Tigres Información y Características. [online] Available at: <http://www.tigers-world.com/informacion-sobre-el-tigre/> [Accessed 15 Jun. 2016].

Weissengruber, G., Forstenpointner, G., Peters, G., Kubber-Heiss, A. and Fitch, W. (2002). Hyoid apparatus and pharynx in the lion (*Panthera leo*), jaguar (*Panthera onca*), tiger (*Panthera tigris*), cheetah (*Acinonyx jubatus*) and domestic cat (*Felis silvestris f. catus*). *J Anatomy*, 201, pp. 195-209.