

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA**

**Unidad Irapuato**

**Discordancia filogenética  
mitonuclear en nemátodos**

**TESIS QUE PRESENTA:**

**Lic. B.E. GUILLERMO GERARDO HERNANDEZ  
ROBLES**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN BIOLOGIA INTEGRATIVA**

**Dr. RAFAEL MONTIEL DUARTE**

**IRAPUATO, GUANAJUATO.**

**AGOSTO 2020**

Dr. Rafael Montiel Duarte  
Director de Tesis/Asesor.

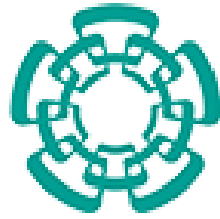
Dr. Sean Rovito.  
Asesor.

Dr. Luis Delaye Arredondo.  
Asesor.

El presente trabajo de tesis de maestría se realizó en el Laboratorio de Interacción Núcleo-Mitocondrial y Paleogenómica, del CINVESTAV UGA-LANGEBIO, bajo la dirección del Dr. Rafael Montiel Duarte.

Guillermo Gerardo Hernandez Robles (CVU: 896744) agradece el apoyo obtenido por parte de CONACYT.

**Agradecimientos.**



**Cinvestav**  
**UGA-LANGEBIO**



Posgrado en  
**Biología**  
**Integrativa**

## **Dedicatoria**

Dedico mi travesía a lo largo de la maestría y la elaboración de una tesis que confirma su culminación, en primer lugar, a mí mismo. Pues algo he de tener que me ha permitido rodearme de un fantástico grupo de gente y que por decisión propia se han mantenido a mi lado tras el paso de los días que se convierten en años.

Viniendo desde hace muchos años, Tony, Mauri y Vane, les agradezco los momentos y anécdotas que hemos cumplido y redactado desde aquellos días en que éramos unos infantes tontos, pasando por adolescentes payasos hasta el día de hoy que hemos completado la transformación en unos adultos payasos y tontos. A una amiga, fiera y compañera de equipo, Claudia, que siempre estuvo convenciéndome de no salirme de la carrera y que incluso hoy recuerda aquel día del 2013 en el que CASI me caigo. A Judith, Espe, Longoria, Cecilia y Alonso que han hecho hoy sus vidas pero que sé que siguen los mismos bioamigos de aquellos días de universidad.

A los compañeros con quienes comparto las quejas y frustraciones del posgrado, así como las ventajas y dichas que brindó. Les agradezco las conversaciones sin sentido alguno y que en más de una ocasión nos trajeron miradas de quienes se sentaban a nuestro lado. Era una mirada particular la que arrojaban, una que, hacía cuestionar la calidad del posgrado, al escuchar la gran cantidad de tonterías que la nueva generación podía decir en tan poco tiempo. Aquellas discusiones que pudieron no ocurrir y la vida tendría su misma dirección, pero que se agradecen con cariño. A Barradas, PacoMax, Víctor, Luna, Gonzalo, Isaac y Fercho, gracias.

A la gente del laboratorio de Paleogenómica. A mis compañeros del laboratorio que me aconsejaron y recibieron con cariño. No dudaban en cuestionar lo que estaba haciendo mal, para casi enseguida aconsejar como mejorarlo. Gracias a Ivan, Noé, Juan, Dulce, Mau, Samanta, Miguel y Lalo.

A mi mentor el doctor Rafael Montiel quien siempre mostró apoyo a lo largo del proyecto y compartió sus conocimientos con una alegría que se ha vuelto poco común en el gremio, le agradezco la paciencia y el crecimiento que tuve bajo su tutela. Un hombre que no dudaría en acompañarte en los momentos cuando se necesita más de la compañía. Gracias Rafa.

A los amigos que trascienden galiones. Para humanizar a la ciencia se deben de conocer los chismes detrás de ella. Esos chismes y comentarios que se comparten en las horas de comida y en camino al comedor. Con quienes se contaron historias de los años previos a conocernos, resultando en redes y caminos cruzados con anterioridad. Comentando los gustos de

películas y series, emocionándonos o mostrando el mayor desdén posible. Les agradezco a Nelly, César y Arely. Así como a Hilda, quien siempre mostraba una alegría que mejoraría el día a quien sea que entre al galerón. Golpeando sus botas para que todos los que estábamos en el tapanco supiéramos que era ella quien subía. Antes de que supieras que necesitabas un abrazo, ella ya estaba ahí.

En el tapanco del laboratorio de paleogenómica pase la mayoría de los días de los últimos dos años. Un lugar al cual le pegaba el sol prácticamente todo el día y en los días fríos se reía de ti por desear esos días calurosos. Siempre es bueno pasar aquellos días con alguien como Christian. Una persona a quien considero un maestro, consejero y amigo. Un amigo que estuvo ahí explicándome lo que estaba pasando, que sabía que no tenía idea de qué hacía al principio. Con el paso de los días tu apoyo y ayuda me permitió avanzar en el proyecto. Otros tantos días más me encontraba pensando “a huevo, ahorita le cuento al Christian”. Eres un gran amigo, a quien le agradezco una gran amistad.

Hay un grupo de personas que se unieron a mi historia de vida con el tiempo que pase aquí. Una expansión a una familia pequeña, producto de una relación que más adelante desarrollaré. Un grupo de gente con quienes comparto mi vida, que me han dado más de lo que he pedido y merecido. Son pilares de lo que fue mi vida en la maestría. A Avelina, Ana, Lupe, Arturo, Arturo, y Arturo, los quiero mucho y les agradezco estén hoy conmigo. Aprendí también la importancia que es el volverse una figura a quien se admira, y que se emocionen con tu llegada. A Aurora, Constanza y Nano, les agradezco que me enseñen eso.

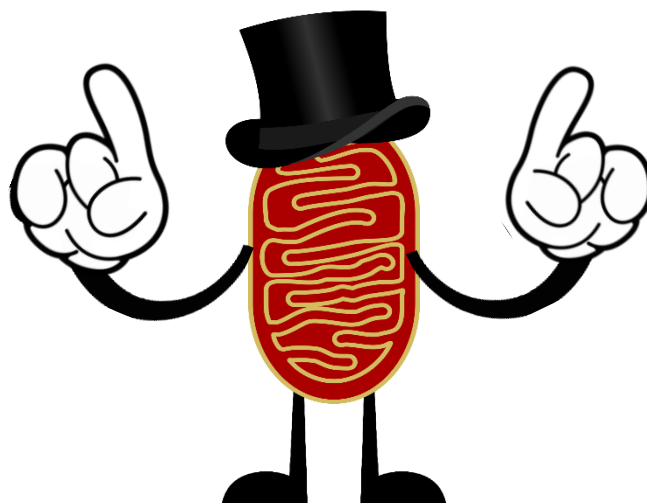
A mi pequeña familia, les agradezco los años que nos llevaron a esto. Sin tu apoyo y preocupación no habría podido terminar ni la primaria. Esos días en los que pasábamos las tardes tratando de que pudiera aprender cuáles eran los beneficios que trajo el Porfiriato al país, o cómo funcionan las fracciones, parecen haber quedado atrás y rendido su fruto. Ahora entiendo el 0.5 de las veces que pude haber dicho “un medio”. Te amo mamá, Claudia Robles Ortiz, porque no dejaste de apoyarme ni un solo día.

El ser hermano es una relación curiosa, pues es la única otra persona que sabe qué pasa mientras ambos están creciendo, y aun así encuentran la razón perfecta para estarse peleando todo el tiempo por las cosas más absurdas. Sigo resintiendo aquellos días en que llegaba con el tazón de cereal más perfecto y eras tú quien se lo comía. A mi hermana con quien discutí en más de una ocasión y jamás me dio la razón, gracias, Mariana.

“Sobre hombros de gigantes”, una frase trillada en el mundo de la ciencia, pero aquí la usare porque estuve literalmente sobre tus hombros. Fuiste Goku, Darth Vader y Batman. Aquella anécdota que tanto contabas

sobre mí volando, inició porque quería que vieras qué tan rápido podía ir en la bicicleta. Gracias Papá.

Diariamente tomamos decisiones sobre cosas mundanas. ¿Qué camión tomar? ¿Qué película ver? ¿Qué comeré hoy? Quien me conoce sabe que he tenido problemas en la toma de decisiones. Podían pasar horas mientras contemplaba las posibilidades sobre qué película ver, odiando el día en que llego Netflix y las opciones aumentaron. Contigo me encontraba pensando en ti, en el tiempo que pasaba a tu lado y en las ansias que tenía para verte de nuevo. Claro, seguía pensando en todas esas cosas, en mis ansiedades y preocupaciones, pero lo hacía feliz. Pensaba contigo, Monse. Eres la persona que se chutó las inseguridades y complejos de inferioridad, las decidías y enojos, pero yo te amo por cómo las transformaste en muchos de nuestros mejores momentos y risas. Cómo expandiste una biblioteca de 100 comics en 200 comics y 1000 libros, y que posteriormente uniríamos los libros de ambos. Tu consejo que transforma mis malas ideas en buenas ideas, que te toca escuchar incluso en momentos que estas cayendo dormida. Te agradezco que me quitaras muchos miedos, muchos por los cuales tenemos ahora a nuestra familia chiquita, a Jack, Coquito y Pan. Amo como son tus ojos cuando sonríes tras nuestros logros y momentos compartidos. Amo que tras estas palabras y el escrito que enseguida continua, tu escuchaste primero los renglones que lo componen. Amo que sostuviste mi mano durante este tiempo y que estamos juntos hoy. De todas las decisiones que se toman todos los días, eres la más lógica.



**GRACIAS**

## **Índice.**

<b>1.- Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2.- Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>3.- Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Interacción Núcleo-Mitocondrial.....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Genoma mitocondrial como marcador filogenético.....</b>	<b>7</b>
<b>3.3 Discordancia filogenética.....</b>	<b>9</b>
<b>3.3.1 Causas de discordancia.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3.1.1 Introgresión/Hibridación.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3.1.2 Sorteado incompleto de linajes.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4 Selección natural en el genoma mitocondrial.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4.1 Evidencia de neutralidad en el ADNmt.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4.2 Evidencia de selección positiva en el ADNmt.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Discordancias filogenéticas en el filo <i>Nematoda</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>4.- Hipótesis.....</b>	<b>26</b>
<b>5.- Objetivo General.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1- Objetivos Particulares.....</b>	<b>26</b>
<b>6.- Metodología.....</b>	<b>27</b>
<b>7.- Resultados.....</b>	<b>33</b>
<b>8.- Discusión.....</b>	<b>52</b>
<b>9.- Conclusión.....</b>	<b>59</b>
<b>10.- Perspectivas.....</b>	<b>60</b>
<b>11.- Literatura citada.....</b>	<b>60</b>



## 1. Resumen

La historia evolutiva de los organismos eucariontes está ligada a la interacción entre los dos genomas presentes en sus células, uno contenido en el compartimiento nuclear (ADNnu) y otro en la mitocondria (ADNmt). La suposición de que ambos genomas compartían su historia evolutiva permitió hacer inferencias sobre las relaciones filogenéticas entre especies. Sin embargo, el aumento de estudios filogenéticos con mayor información genómica ha hecho evidente la existencia de filogenias discordantes entre las resueltas con el ADNmt y las del ADNnu, que presentan relaciones filogenéticas distintas entre especies. Biológicamente, estas discordancias se han atribuido principalmente a factores demográficos como lo es el sorteo incompleto de linajes, la hibridación y la introgresión. El papel de la selección natural como causante de la discordancia ha sido de poco estudio. En este trabajo, se investigaron las causas de la discordancia existente en un grupo de nemátodos. Se construyeron dos filogenias, una mitocondrial y una nuclear, de un grupo de 21 especies de nemátodos. Al comparar ambas filogenias, 6 especies forman relaciones filogenéticas distintas, estudiando con mayor énfasis el caso del nemátodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*, del clado IV, el cual se integra en el clado V de la filogenia mitocondrial. Para investigar las razones de esta discrepancia se analizó por medio del estadístico-D la presencia de señales moleculares de introgresión y sorteo incompleto de linajes y se hizo una búsqueda de sitios con selección positiva en el ADNmt los cuales fueron concatenados para la construcción de una filogenia exclusivamente de sitios positivos. Esta filogenia que consta de solo 77 sitios de aminoácidos recapitula la filogenia discordante de la mitocondria. Esto es un indicio de la participación de la selección en la evolución del genoma mitocondrial.

## 2. Abstract

It is common the assumption that the mitochondrial and nuclear genomes share the same evolutionary history. Mitochondrial data are widely used to infer the relationships of a group of species. Recently, an increasing amount of studies show a discordance between the phylogenetic relationships generated with nuclear versus mitochondrial data. This discordance is largely attributed to introgression and incomplete lineage sorting. The role of natural selection, mainly positive selection, as the reason for discordance has not been explored. The mitochondrial genome is a central part of multiple cell functions so any variation could be under strong selection. We tested if the phylogenetic discordance between mitochondrial and nuclear topologies are caused by natural selection in a group of nematodes. First, we found six species that represent different relationships in both phylogenies. Second, we built a mitochondrial phylogeny excluding sites with positive selection signals that may cause the discordance, expecting a shared topology between both data sets, and a parallel search for any genomic sign for introgression or incomplete lineage sorting in the nuclear data. Third we looked for nuclear genes that shared the same phylogenetic topology as the mitochondrial topology. We found mitochondrial sites that are subject to positive selection that could cause the discordance, these few sites are phylogenetically informative enough to recapitulate the mitochondrial topology. We ruled out the possibility of incomplete lineage sorting in one of the four nematode species, *Steinernema carpocapsae* and found nuclear genes with mitochondrial topology. This could suggests an ancient introgression event or coevolution between both genomes.

**Key words:** mitochondria, phylogenetic-discordance, positive selection, mito-nuclear interaction, phylogeny.

### **3. Introducción**

En sus orígenes, la idea de la filogenética presentaba solo utilidad para relacionar a las especies según sus caracteres compartidos. En la actualidad representan una herramienta de mayor importancia, pues son un punto de partida en técnicas como identificación de genes y comparación entre genomas (Yang y Rannala, 2012). El pensamiento filogenético aplicado en diversas ramas de la biología ha permitido la resolución de preguntas con mayor congruencia y relevancia, expandiendo el conocimiento de la historia evolutiva de las especies. Representan el proceso de evolución de un carácter, si este ocurrió de manera independiente, el número de veces que aparece dentro de un linaje, o si tiene su origen en un carácter ancestral. Para el estudio de estos patrones evolutivos, se requiere conocer la relación entre las especies, reflejada en marcadores genéticos, el más comúnmente usado ha sido el ADN mitocondrial (ADNmt), debido a la biología de la molécula (Hurst y Jiggins, 2005). Con el aumento de datos moleculares, obtenidos a partir del ADN nuclear (ADNnu), la inferencia filogenética, haciendo uso de esta mayor cantidad de información genética, ha dado como resultado filogenias discordantes que representan patrones de divergencia distintos entre las especies (Degnan y Rosenberg, 2009). En la mayoría de los casos, estas filogenias presentan topologías similares, sin embargo, en notables ocasiones dependiendo de si se usaba ADNmt o ADNnu, la historia evolutiva de las especies era diferente.

#### **3.1 Interacción Núcleo-Mitocondrial.**

El origen de los linajes mitocondriales, propuesto en la teoría endosimbiótica, se da a partir de una  $\alpha$ -proteobacteria, cuyo genoma contenía entre 3000-5000 genes, que fue adquirida por una arqueobacteria (Margulis, 1967; Ballard y Rand, 2005; Koonin, 2010). Esta interacción tiende a ser simplificada como el engullimiento del ancestro mitocondrial por un huésped y que la subsecuente coexistencia de dos genomas ocurrió de manera armoniosa. Sin embargo, la

dinámica entre genomas ha resultado de gran interés, tomando parte en hipótesis que intentan explicar la gran diversidad existente y complejidad en los organismos eucariontes (Lane y Martin, 2010; Poole y Gribaldo, 2014; Garg y Martin, 2016; Hood *et al.*, 2018; Rand y Mossman, 2020), discutiendo su naturaleza cooperativa (Radzvilavicius y Blackstone, 2015), y sus conflictos iniciales (Havird *et al.*, 2019). La participación de la mitocondria como catalizador en la aparición de la vida eucariota, su papel en la evolución del sexo, la membrana nuclear y la capacidad energética para la comunicación intracelular, aún se encuentra ampliamente discutida (Radzvilavicius y Blackstone, 2015; Garg y Martin, 2016; Havird *et al.*, 2019). La integración inicial entre la proteobacteria y la arqueobacteria se vio beneficiada de manera mutualista dando lugar eventualmente en una endosimbiosis, donde la interacción entre ambos genomas sería fundamental para facilitar la funcionalidad celular.

La presencia de dos genomas dentro de un sistema puede ser causante de conflicto entre los genes codificados en ambas partes, esto es, que existan diferentes presiones de selección actuando en cada genoma y que sus demandas adaptativas no sean similares. A lo largo del proceso evolutivo de la interacción, diversos mecanismos eliminaron las posibles causas de conflicto mitonuclear, como fue la cesión de control de replicación mitocondrial al núcleo, el modo de herencia uniparental y la distribución del contenido genético (Greiner *et al.* 2015; Havird *et al.*, 2019). La gran mayoría de los genes codificados en la  $\alpha$ -proteobacteria fueron transferidos al núcleo del hospedero o perdidos, a causa de redundancias con los genes nucleares. La reducción genómica dio lugar a una molécula circular pequeña que contiene genes involucrados en la cadena respiratoria, variando entre 1 y 100 genes, dos ARN ribosomales, 22 ARN de transferencia, y la región de control para el inicio de la transcripción e inicio de replicación (Sloan *et al.*, 2017; Klucnika y Ma, 2019). En algunos linajes animales ha ocurrido la pérdida total del genoma mitocondrial (John *et al.*, 2019), mientras que en otros se encuentra muy reducido (Vaidya y Mather, 2009), y hasta la ausencia del organelo

(Karnkowska *et al.*, 2019).

La coevolución entre los dos genomas se dio como resultado de la interacción entre los genes codificantes contenidos en ambos compartimentos, y que forman parte de diversos procesos que son fundamentales en la célula, por lo que la expresión e interacción estructural coordinada de dichas proteínas son requeridas para un funcionamiento eficiente (Wade y Drown, 2016; Mossman *et al.*, 2016a). Sin considerar las diferencias en tamaño del genoma mitocondrial, la función mitocondrial permanece virtualmente similar en todos los organismos eucariontes, siendo la producción de ATP por medio de la fosforilación oxidativa su función principal. Para llevar a cabo esta función, ambos genomas codifican componentes, cuatro de los cinco complejos proteicos poseen subunidades codificadas tanto en la mitocondria como en el núcleo (Ballard y Rand, 2005), y la estrecha comunicación núcleo-mitocondria resulta indispensable para realizar correctamente la función (Ballard y Pichaud, 2014). Algunas proteínas codificadas en el núcleo tienen dos tipos de interacción con la mitocondria; de manera directa, como en la cadena respiratoria, e indirecta, proteínas codificadas en el núcleo que son transportadas al compartimento mitocondrial donde realizan sus funciones. Recientemente se ha observado que los genes que codifican a estas proteínas tienen tasas de sustitución similares a los genes mitocondriales, teniendo una mayor relación positiva entre las proteínas nucleares y mitocondriales que son partícipes de la cadena respiratoria (Ya *et al.*, 2019).

Debido a la importancia de la coadaptación entre las proteínas mitocondriales y nucleares, la selección purificadora remueve las variantes deletéreas que comprometen la interacción y su función en la producción de energía (Wade y Drown, 2016; Stojković y Đorđević, 2017). Los primeros experimentos realizados para determinar la coadaptación de los genes involucrados en la producción de energía se realizaron en un grupo de células humanas cuyo ADNmt fue remplazado por el de distintas especies de simios homínidos; gorila, orangután, chimpancé y bonobo, creando células con

genoma nuclear humano y mitocondrias pertenecientes a simios. Los genes codificantes de proteínas, los 13 genes involucrados en la cadena respiratoria, se encuentran conservados en los genomas mitocondriales de estas especies de homínidos. Se observó que la capacidad de realizar la fosforilación oxidativa solo fue recuperada en el escenario donde la célula humana poseía el ADNmt de las especies más cercanas filogenéticamente al humano, el chimpancé y el gorila (Kenyon y Moraes, 1997). Experimentos recientes, realizados en *Drosophila simulans* y *D. melanogaster*, apoyan la coadaptación existente entre los genes de ambos genomas, y el impacto del ambiente en estos, en distintos caracteres de historias de vida. Los resultados obtenidos demuestran el impacto que tiene la interacción entre genes mitocondriales y nucleares en algunos de los caracteres de historias de vida, principalmente el tiempo de desarrollo y la viabilidad de huevo a adulto, donde existe un efecto negativo en los individuos cuyos genomas mitocondriales no están coadaptados al genoma nuclear (Mossman et al., 2016b).

A pesar de compartir un espacio y tener interacción, la biología de la molécula mitocondrial la hace susceptible a distintas fuerzas evolutivas en comparación a las que moldean la evolución del núcleo. Un ejemplo de esto es la erosión molecular en el ADNmt, causado por varias razones: alta tasa mutacional, falta de protección por histonas, la recombinación en algunas especies esta reportada como ausente, al igual que la maquinaria de reparación (Rand, 2008; Chou y Leu, 2015). Esto provoca que exista la posibilidad de una degradación genómica, causada por una constante acumulación de mutaciones ligeramente deletéreas, conocida como el trinquete de Müller (Rand, 2001). Las mutaciones en el genoma mitocondrial comprometen su interacción con los componentes codificados en el núcleo y por lo tanto las funciones en las que es partícipe. Se ha sugerido que, para preservar la función de producción de energía, han ocurrido mutaciones compensatorias en los componentes proteicos nucleares que interactúan con los componentes mitocondriales (Hill et al., 2018). A su vez, estas mutaciones deletéreas pueden dar origen a una dinámica egoísta, moléculas de ADNmt

cuyas mutaciones le permiten una replicación más eficiente, a pesar de los conflictos a nivel fisiológico que esto conlleve (Chou y Leu, 2015). Tal es el caso de algunas poblaciones naturales de *Caenorhabditis briggsae*, que cuentan con una delección del gen que codifica a la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa, lo que provoca un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en comparación a las poblaciones que mantienen el gen intacto a causa de la disrupción de la cadena de transporte de electrones. Los efectos negativos de esta mutación no son eliminados pues la velocidad de replicación del ADNmt deletéreo es mayor y persiste dentro de las poblaciones naturales (Clark *et al.*, 2012).

A pesar de la importancia de la interacción entre los genomas nuclear y mitocondrial en el funcionamiento general de la célula y del organismo, esta parece exhibir un equilibrio dinámico, siendo parte de una carrera armamentista donde cada genoma tiene intereses y su historia evolutiva es moldeada de manera discordante.

### **3.2 Genoma mitocondrial como marcador filogenético.**

El ADNmt ha resultado útil como una herramienta molecular que ha permitido el análisis de los procesos evolutivos a los que las poblaciones y las especies están sujetos. Se ha utilizado para lograr una mejor resolución filogenética, analizar la dinámica de las poblaciones, estudios biogeográficos, y recientemente, en ecología molecular (Ballard y Pichaud, 2014).

El raciocinio detrás de su uso se basa en la facilidad de obtención y la biología de la molécula. Primero, las copias de ADNmt en la célula se encuentran en gran cantidad, incluyendo la alta conservación de los genes mitocondriales en los linajes animales han facilitado su estudio en gran variedad de taxones (Folmer *et al.* 1994; Hurst y Jiggins, 2005) . Folmer *et al.* (1994) describieron el uso de cebadores “universales” para la amplificación del gen citocromo oxidasa I (COXI) en 80 especies de vertebrados. Segundo, la herencia uniparental y la ausencia de recombinación en la molécula, permite considerarla como un solo locus, donde la historia filogenética de un sitio es

compartida entre todos los otros sitios. A diferencia de lo ocurrido en el núcleo, los genes codificados en la mitocondria comparten la misma topología (Hurst y Jiggins, 2005). Tercero, la evolución del genoma mitocondrial es más rápida, sus tasas de cambio en la secuencia son más veloces, resultando en una mayor acumulación de diferencias entre especies muy cercanas (Hebert *et al.* 2004). Cuarto, la ortología presente en los genes mitocondriales se sumó a las características que lo volvieron un valioso marcador genético, pues la ausencia de múltiples familias de genes y eventos de duplicación génica que tienen lugar en los genes del núcleo daba lugar a interpretaciones erróneas en la reconstrucción filogenética (Funk y Omland, 2003).

La aceptación del ADNmt se extendió hasta ser considerado un código de barras entre especies, usándose la subunidad Citocromo oxidasa I (COXI) como uno de los principales identificadores (Hurst y Jiggins, 2005; Hill, 2016), argumentando que los individuos de una especie son menos diversos en su secuencia de COXI al ser comparado entre otras especies. El razonamiento detrás del uso de este gen no tiene una particularidad especial, más allá de su alta conservación al ser un componente importante de la cadena respiratoria en la célula.

Finalmente, durante muchos años se mantuvo el supuesto de que el ADNmt evoluciona de manera neutral, siendo la mutación y deriva génica las principales fuerzas evolutivas que lo afectaban (Ballard y Rand, 2005). Esto fue suficiente para justificar su uso como marcador filogenético, y a pesar de que los debates sobre el papel de la selección en la evolución mitocondrial han aumentado desde hace 30 años (Rand *et al.*, 1994), su uso como marcador filogenético sigue siendo constante en años recientes. La neutralidad en la molécula se ha dejado de mencionar como la razón principal de su uso, pero, su forma de transmisión, alta tasa mutacional y ausencia de recombinación, así como el amplio acceso de genes mitocondriales de múltiples especies en bases de datos siguen siendo la razón biológica para su empleo en análisis filogenéticos (Jiang *et al.*, 2016, Bronstein *et al.*, 2018, Mackiewicz *et al.*,



2019).

Actualmente existen dos opiniones con respecto al uso del ADNmt como un marcador filogenético. Existiendo aquellos grupos que aun determinan la posición de los organismos vivos con base al código de barras que es el gen mitocondrial COI. La estrategia del código de barras se ha vuelto importante en los primeros pasos para los estudios filogenéticos puesto que permite una identificación rápida de los distintos linajes. Por otro lado, otros grupos cuestionan la representación de la historia evolutiva de las especies basándose en un solo locus de pequeño tamaño con relación a todo el genoma y cuya historia evolutiva no resulta consistente con la del núcleo (Rubinoff y Holland, 2005). Esto último ha sido más evidente con el aumento de análisis filogenéticos que tienen acceso a la información genética de ambos compartimentos genómicos.

### **3.3 Discordancia filogenética.**

Las filogenias son hipótesis sobre la relación evolutiva que existe entre las especies, reflejando los eventos de divergencia pasados. Su uso se ha vuelto de gran utilidad en todas las ramas de la biología como una herramienta que permite entender la historia de las poblaciones, la historia de un gen, dinámica en interacciones ecológicas, conocer las bases moleculares de las adaptaciones, desarrollo celular o incluso de la cultura y el lenguaje (Yang y Rannala, 2012). Su construcción está basada en la suposición de que existe una transmisión del material genético proveniente de un ancestro en común (Liu *et al.*, 2009).

El protocolo clásico en estudios filogenéticos comenzaba con la secuenciación de un gen de interés en un grupo de especies e inferir la historia evolutiva de ese gen con la inferencia de un árbol de genes. Posteriormente se estimaba que la relación filogenética entre este grupo de especies debía ser similar a la representación de la historia evolutiva de dicho gen (Pamilo y

Nei, 1988; Wiens *et al.*, 2010). Como fue mencionado previamente, uno de los marcadores más comunes es el gen COI del genoma mitocondrial. La utilidad del genoma mitocondrial dio paso a un aumento en publicaciones que llegaban a conclusiones sobre la historia evolutiva de las especies y las poblaciones con base en la información y estudio de la variación en su secuencia (Zink y Barrowclough, 2008).

El advenimiento de la genómica dentro del campo de la filogenética presentaba el surgimiento de conceptos interesantes al tener acceso a explorar nueva información, múltiples loci no-ligados que podrían ser útiles para la estimación de filogenias. Con este incremento de información molecular, que permitían conocer la distribución y la variación dentro y entre las poblaciones, los métodos de análisis para la estimación del árbol filogenético incrementaron su popularidad y se vieron beneficiados por los aportes de los conceptos en genética de poblaciones para mejorar la reconstrucción de un árbol de especies (Fisher-Reid y Wiens, 2011).

Una vez que se posicionaron estas metodologías como parte de los protocolos clásicos y se tuvo mayor disponibilidad de la información nuclear, la frecuencia de reportes con filogenias que reflejan un conflicto entre los marcadores mitocondriales y nucleares sobre los patrones de divergencia entre las especies fue cada vez mayor (Degnan y Rosenberg, 2009). A esto se le ha denominado discordancia mitonuclear, definiéndose como una diferencia significativa en los patrones de divergencia entre los dos marcadores (Ivanov *et al.*, 2018). La discordancia filogenética, o conflicto filogenético, puede tener lugar cuando los árboles de genes individuales difieren del patrón de divergencia de las especies y que las relaciones discordantes se encuentran soportadas con valores altos. (Pamilo y Nei, 1988; Liu *et al.*, 2009). Este problema denominado “árboles de genes vs árbol de especies” da a notar el estudio de la relación evolutiva entre especies y la discrepancia que existen entre los genes que comparten (Pamilo y Nei, 1988; Franco *et al.*, 2015).

Aunque en la década entre los años 1990 y 2000 ya existían publicaciones con filogenias discordantes, su aparición en aumento impulsó el debate sobre la utilidad del ADNmt como marcador filogenético e incitó a la duda de las conclusiones que se obtuvieron bajo su uso (Funk y Omland, 2003). Los principales argumentos en estos debates eran sobre su corto tamaño en comparación al genoma nuclear, por lo que la historia evolutiva completa de la especie podría no verse reflejada, y de la alta tasa de mutaciones que daban lugar a homoplasias, la similitud entre las secuencias es a causa de múltiples mutaciones con un origen independiente (Hebert *et al.*; Ballard y Whitlock, 2004; Fisher-Reid y Wiens, 2011). En casos en que el ADNmt reflejaba las relaciones entre especies o clados con altos soportes, y la información nuclear se encontraba igualmente soportada, se consideraba que la historia evolutiva de la molécula podía ser discordante de la historia evolutiva general de la especie (Platt *et al.*, 2018).

Con el estudio de los genomas nucleares se observó que esta discordancia filogenética podría ocurrir en ambos compartimentos genómicos. La existencia de genes nucleares que exhibían topologías distintas a la estimada en el árbol de especies dio como resultado a un cuidado extensivo en la interpretación de las filogenias que se estimaban con el uso de esta información genética (Degnan y Rosenberg, 2009). El reporte de este fenómeno ha sido demostrado en varios grupos de especies, atribuyéndosele múltiples razones evolutivas como las causantes de dichas discordancias.

### **3.3.1 Causas de discordancia.**

Es parte de la práctica común, para el estudio de las especies, el uso de una amplia variedad de marcadores genéticos para entender los procesos biológicos que han tenido lugar durante su historia evolutiva. Como se refirió previamente, esta variedad de marcadores incluye loci pertenecientes a los genomas mitocondrial y nuclear. El uso de múltiples marcadores moleculares permitió descubrir señales de diversidad interespecífica que los caracteres morfológicos no podían determinar. En los estudios que hacían uso de la

información contenida en ambos genomas, obtenida a partir de un amplio muestreo y combinada con datos geográficos y poblacionales, las inferencias filogenéticas generalmente eran concordantes al compararse entre genomas (Toews y Brelsford, 2012). Sin embargo, existen casos en los cuales la concordancia parecen no ser un escenario común, lo que ha complicado la determinación por una de las historias filogenéticas a causa de los distintos eventos evolutivos que tienen un efecto en cada genoma.

La importancia de la aparición de estas discordancias entre filogenias no se ha limitado solamente a la incapacidad de delimitar e identificar a las especies (Papakostas *et al.*, 2016). Este fenómeno ha sido evidente y puede ser causado por diversos factores biológicos tales como el sorteo incompleto de linajes, introgresión y la transferencia lateral de genes; este último más prominente en organismos procariontes (Mendes *et al.*, 2016). De acuerdo con Funk y Omland (2003), una vez que se descartan las discordancias artificiales, a causa de un muestreo limitado o la incorrecta previa identificación de especies, los casos reportados de discordancias entre marcadores ocurren en diversos grupos de taxones, animales invertebrados y vertebrados. Las historias discordantes, las no artificiales, resultan en distintas explicaciones alternativas causantes del fenómeno biológico.

Los métodos para la distinción entre las causas específicas han sido desarrollados en los últimos años, algunos de estos aun presentan conclusiones no muy claras, pero la mayoría parten del supuesto de discordancia filogenética existente entre los marcadores de origen mitocondrial y nuclear, y que las causas probables son las mencionadas previamente.

### **3.3.1.1 Introgresión.**

Entre las potenciales causas de discordancia se encuentra la introgresión, este evento resulta del contacto entre dos especies durante los procesos de

especiación, o un posterior segundo contacto. Este fenómeno es causado por la transferencia de alelos de una especie al conjunto de genes de una segunda especie (Choleva *et al.*, 2014). A este evento le sigue una cruce entre los individuos híbridos y sus poblaciones parentales, dando lugar a un incremento en la frecuencia de los alelos transferidos (Funk y Omland, 2003).

Debido a la naturaleza de su transmisión uniparental, la introducción completa del ADNmt de una población a la otra ha sido considerada como una de las causas de discordancia filogenética. El resultado de esta introducción daría como resultado el remplazo total del genoma mitocondrial en una de las dos especies, observándose una filogenia que representa relaciones entre especies que difieren del patrón real de divergencia. Las características de la mitocondria hacen que sea susceptible a efectos que dan como resultado filogenias discordantes a causa de la introgresión de este material genómico. El hecho de que no exista recombinación y el ligamiento entre sus distintos loci provoca que todo el bloque genético sea introgresado, reflejando en su lugar la historia evolutiva del genoma mitocondrial de la especie de origen (Funk y Omland, 2003; Sloan *et al.*, 2017).

Uno de los ejemplos recientes de detección de introgresión en animales ha sido en un grupo de 20 especies de peces pertenecientes al género *Catostomus*, en el cual los análisis filogenómicos resultaron discordantes en la posición del taxón *Xyrauchen texanus*, especie cuya posición filogenética ha resultado dudosa dentro de la familia *Catostomidae* en las distintas filogenias mitocondriales, nucleares y morfológicas. Haciendo uso del estadístico-D de Patterson, o ABBA-BABA (Green *et al.*, 2010; Durand *et al.*, 2011), las discrepancias parecen coincidir con el escenario explicado por introgresión. A su vez, se detectaron señales moleculares de introgresión en otras seis especies pertenecientes al género *Catostomus* (Bangs *et al.*, 2018). De igual manera se reportaron señales de introgresión en regiones del gen nuclear *optix* dentro del género *Heliconius*, un grupo de mariposas neotropicales distribuidas a lo largo del continente de América del Sur (Zhang

*et al.*, 2016). En estudios previos, se había reportado la discordancia filogenética dentro del grupo, y así como resultados que confirman eventos de introgresión entre distintos miembros del género. En este grupo de mariposas se dan casos de mimetismo Mülleriano en el patrón de coloración de sus alas, siendo indicativo de la toxicidad en algunas especies del género. El interés dentro de este grupo y el gen involucrado se da para entender si este mimetismo se explica por convergencia adaptativa o por cuestiones de flujo genético entre especies. Para este estudio, se usaron SNPs provenientes de genomas completos nucleares de 73 muestras que representaban 29 especies del género. Nuevamente, mediante el uso del estadístico-D se determinó que existen señales moleculares que permiten inferir un evento de flujo genético entre haplotipos de *H. besckei* y su clado hermano *H. melpomene*, ocurriendo el flujo genético en dirección del último al primero. En otros casos, el mismo origen del estadístico-D se encuentra ligado a la detección de señales de introgresión dentro del género *Homo* (Green *et al.*, 2010), siendo una herramienta que permite la identificación de ventanas con señales de flujo genético entre el genoma del Neandertal y humanos No-africanos. En dicho análisis se determinó que la cercanía genética, la probabilidad de compartir alelos derivados, con el Neandertal es mayor al compararse con humanos pertenecientes a los continentes europeo y asiático, en contraste con los que tienen ascendencia africana.

Existen complicaciones en la detección de eventos de introgresión o hibridación, una vez que tuvo lugar el intercambio de material genético entre dos especies, las fuerzas de selección en la integración o eliminación de aquellos genes transferidos entre especies (Martin *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Burgarella *et al.*, 2019). Es debatible qué tan común el evento de introgresión ocurre dentro de los animales bilaterales. Las justificaciones para argumentar la introgresión del ADNmt, su ausencia de recombinación y ligamiento, continúan siendo discutidas por aquellos que apoyan la idea del ADNmt como un código de barras genético, pues resaltan la particularidad del genotipo mitocondrial que permite distinguir entre especies (Hill, 2019).

Recientemente se ha comenzado a tomar un interés en la interacción entre los genes nucleares que interactúan con la mitocondria como participantes del proceso de especiación, creando límites entre las especies. Esto ha llevado a proponer que el proceso de introgresión conlleva a la transferencia y mantenimiento de genes nucleares que interactúan con la mitocondria (Sloan *et al.*, 2017). En conclusión, una vez que ocurre este fenómeno, existen diversas fuentes de información genética que darían lugar a una discordancia filogenética.

### **3.3.1.2 Sorteo incompleto de linajes.**

Otro de los fenómenos que dan como resultado filogenias discordantes es el sorteo incompleto de linajes (SIL), esto ocurre cuando polimorfismos ancestrales continúan manteniéndose en múltiples linajes después de que han ocurrido eventos de especiación y presentan patrones de fijación incongruentes con la historia general de la especie (Degnan y Rosenberg, 2009). Este fenómeno da origen a filogenias que muestran grupos polifiléticos entre las especies y puede tener efecto en cualquier locus del genoma (Funk y Omland, 2003). El SIL es considerado como probable causante de discordancia en eventos de especiación recientes y en radiaciones ancestrales rápidas (Degnan y Rosenberg, 2009).

En un escenario de SIL, los alelos ancestrales son mantenidos a lo largo de los eventos de especiación, y debido a que los alelos divergen de manera estocástica, estos alelos pueden encontrarse en las especies más recientes. Al tener un tamaño efectivo poblacional de menor tamaño, los genes mitocondriales completan su proceso de sorteo de linajes antes que los genes nucleares. En el caso de los genes nucleares, a causa de su tamaño poblacional mayor, este proceso tiende a ser más lento. Por lo tanto, los genes del núcleo son más susceptibles a presentar señales discordantes (Funk y Omland, 2003). Es debido a este fenómeno que la información genética proveniente de la mitocondria es mayormente utilizada en la inferencia filogenética. Sin embargo, en casos de radiaciones rápidas el SIL puede tener

un efecto al estimar las relaciones filogenéticas a partir del ADNmt, resultando en polifilias, como se ha reportado en los lagartos pertenecientes a la familia *Crotaphytidae* (McGuire *et al.*, 2007). Este fenómeno ha sido encontrado en gran variedad de especies con relación al ADNnu.

En el caso del grupo de los primates, principalmente el árbol de los primates homínidos: chimpancé, gorila y el ser humano, se han detectado señales que apoyan al chimpancé como especie hermana del clado de gorila y humano o el humano como especie hermana del clado integrado por el chimpancé y el gorila, y que esta es causada por sorteo incompleto de linajes en 30% del genoma (Som, 2014), contrario a la topología con mayor aceptación que es el clado del humano y chimpancé, y el gorila como especie hermana. En un segundo caso, el bisonte europeo, *Bison bonasus*, ha sido sujeto de estas discordancias filogenéticas. Al hacer uso del ADNmt el bisonte europeo forma parte del linaje que conformado por el toro y el cebú. En cambio, el bisonte americano y el bisonte europeo forman un clado hermano al usar la información proveniente del genoma nuclear, la cruce entre estas dos especies da como resultado descendencia fértil. La discordancia filogenética dentro de este grupo resultó interesante al ser causada por eventos de introgresión reciente entre el ganado taurino moderno y las especies pertenecientes al grupo de bisontes europeo, americano y yak. En adición a estos resultados, se compararon las topologías de 200,000 simulaciones provenientes de la información nuclear bajo el supuesto de sorteo incompleto de linajes, las cuales mostraron una similitud al compararse con las obtenidas empíricamente. Sin embargo, su hipótesis original postulaba que el fenómeno de SIL ocurría en el genoma mitocondrial.

La incongruencia multilocus y los eventos de SIL como su causante han sido explorados ampliamente en los cíclidos, familia de peces de gran interés por sus rápidas radiaciones y subsecuentes cruces interespecíficas, endémicas del lago victoria en África. El uso de múltiples marcadores moleculares, así como morfológicos, han resuelto las relaciones filogenéticas



entre las especies de esta familia, sin embargo, la existencia de discordancias entre estos marcadores y la suposición de que el árbol de genes no representa la historia evolutiva de las especies, generó interés en particular en este grupo. Takashi *et al.* (2001) utilizaron SINEs (elementos nucleares pequeños interdispersos, por sus siglas en inglés). Su uso como marcadores filogenéticos ha sido aceptada por su integración irreversible a sitios dentro del genoma y su inserción en sitios es de manera azarosa por lo que se reduce la probabilidad de homoplasias en su secuencia. Estos permitieron la detección de señales de SIL dentro de 14 loci nucleares de los 38 utilizados (Takahashi *et al.*, 2001). Dentro del grupo de los cíclidos ha habido reportes previos de SIL en las regiones de control del genoma mitocondrial (Parker & Kornfield, 1997; Takahashi *et al.*, 2001), por lo que estas evidencias apoyan la hipótesis de que este fenómeno es común en eventos de radiaciones rápidas.

A nivel metodológico ha sido complicado distinguir las señales moleculares de SIL al compararlas con introgresión/hibridación, especialmente en las ventanas temporales posteriores al evento de especiación. Métodos de simulación, estadístico-D, y otros modelos estadísticos han sido empleados para la detección de SIL en la información molecular (Choleva *et al.*, 2014). Este evento ha sido detectado con análisis en múltiples especies y en ambos genomas; en el caso del genoma mitocondrial ocurriendo solamente en radiaciones rápidas (Parker y Kornfield, 1997; Takahashi *et al.*, 2001), por lo que su papel como causa de la discordancia filogenética puede dar lugar a interpretaciones erróneas de la historia evolutiva.

### **3.4 Selección natural en el genoma mitocondrial.**

La mitocondria es considerada en el ámbito científico y en la cultura popular como la fuente de energía de la célula. Este organelo ocupa un lugar central en la biología de los organismos eucariotas formando parte de gran cantidad de procesos que han sido investigados con mucho interés los últimos años. Como fue mencionado previamente, este organelo cuenta con un

genoma de menor tamaño que el contenido en el compartimento nuclear, en el cual están contenidos genes involucrados en el proceso de generación de energía química en forma de ATP.

Recientemente puede apreciarse un incremento en la literatura que contribuye al conocimiento de las funciones de la mitocondria dentro de la célula eucarionte. Es partícipe de diversos procesos como la síntesis de ácidos grasos, la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , regulación de la expresión de genes nucleares mediante especies reactivas de oxígeno, regulador de señalamiento celular, y en la regulación de muerte celular apoptótica, y recientemente ha tenido gran interés su aportación en la respuesta inmunitaria (Tait y Green, 2012; Nunnari y Suomalainen, 2012; Ballard y Pichaud, 2014; Breda et al., 2019).

Durante mucho tiempo se sostuvo que la evolución del genoma mitocondrial era de manera neutral, bajo el supuesto de que las frecuencias genéticas de este genoma estaban sujetas principalmente a mutación y deriva genética (Ballard y Kreitman, 1995). Mas adelante se destacó la importancia de la selección purificadora como fuerza que actuaba en el genoma mitocondrial, debido a que las funciones mitocondriales tienen un impacto en la adecuación (Ballard y Kreitman, 1995). En las últimas décadas, la importancia de la selección positiva en la evolución del genoma mitocondrial ha sido sustentada con evidencias sobre sus múltiples funciones, modo de herencia, por su interacción con componentes nucleares y el impacto de los genes que codifica en la adecuación de un organismo.

#### **3.4.1 Evidencia de neutralidad en el ADNmt.**

La neutralidad del ADNmt ha estado bajo constante debate, pues han surgido trabajos que sugieren el papel de fenómenos selectivos en la evolución de la molécula (Castoe et al., 2009; Morales et al., 2015; James et al., 2016).

Ballard y Kreitman, (1995), argumentaron que las evidencias usadas para explicar la neutralidad del ADNmt se deben a concepciones erróneas de

la teoría neutral y del modo de evolución de la mitocondria. La primera de esas evidencias que argumentan ambos autores es la cantidad de genes codificados en la mitocondria, el cual es menor que los contenidos dentro del genoma nuclear, lo que permite un sistema menos restrictivo al momento de traducir una cantidad menor de ARN mensajeros. Esto se visualizó en un análisis que encontró una mayor cantidad de polimorfismos en los genes de ARN de transferencia que reconocen los codones altamente degenerados, indicando una mayor tolerancia en errores de traducción para estos codones. Como segunda evidencia, la tasa promedio de divergencia entre el genoma mitocondrial resulta mayor que en el núcleo en diversas especies animales, la secuencia de ADNmt difiere más al divergir las especies que el ADNnu con el paso el tiempo. Bajo la neutralidad, se espera que la tasa de sustitución sea igual a la tasa de mutación, la cual es alta en el genoma mitocondrial. Sin embargo, se sabe que un codón posee tasas de cambio diferentes en cada posición, dependiendo de su importancia en la función. En los estudios para evaluar la tasa de divergencia entre genoma mitocondrial y nuclear se asume que los sitios comparten tasas de cambio constantes. Finalmente, se asumía que la uniformidad del cambio de un amino ácido era constante en toda la proteína. Contrario a esto, ahora se sabe que las tasas de cambio entre aminoácidos presentan variación de acuerdo con el tipo de amino ácido por el cual es sustituido, su posición en la proteína y su función. En el caso de los genes mitocondriales que interactúan con los genes nucleares, se sabe que estos últimos tienen tasas de cambio similares a las ocurridas en la mitocondria como respuesta a los cambios para el mantenimiento de la función (Zhang y Broughton, 2013).

Dado que el genoma mitocondrial es heredado vía materna y que se ha reportado la ausencia de recombinación en múltiples linajes animales, ofrecía información genética útil para estudios poblacionales y filogenéticos, bajo la premisa de que las fuerzas evolutivas de mutación y deriva genética eran las de mayor influencia en el genoma mitocondrial. Es hasta el inicio del milenio, y gracias al mejoramiento de modelos que estudian la selección, que

se comenzó a invocar la participación de la selección como una fuerza que explica la variación dentro del genoma mitocondrial (Rand, 2001; Ballard y Rand, 2005; James et al., 2016). Esto permitió reevaluar el uso de sitios mitocondriales que se consideraban neutrales en estudios poblacionales y filogenéticos, pues los sitios considerados neutrales como los del bucle-D y de la región de control se encuentran ligados a sitios que presentan señales de selección, por lo que se comenzó a dudar de su utilidad como marcadores estrictamente neutrales (Ballard y Rand, 2005).

### **3.4.2 Evidencias de selección positiva en el ADNmt**

La vida de los organismos depende de la producción de energía utilizable. Las condiciones en las que interactúan los organismos, bióticas y abióticas, y la dinámica dentro de los ecosistemas se encuentran en un estado de cambios, por lo que el mantenimiento de una producción inmutable de energía resulta inestable para el sistema (Hill, 2015). Es por esto por lo que cualquier variación en las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial involucradas en la producción de energía están sujetas a procesos de evolución adaptativa. Si la variación existente en el ADNmt tiene un impacto importante en la adecuación, se encontrará sujeta a la selección natural, donde las condiciones ambientales afectan diversos procesos metabólicos (Consuegra *et al.*, 2015). Recordando a su vez, que la interacción entre los productos codificados por ambos genomas requiere de la selección de variantes mitocondriales que permitan el mantenimiento de esta interacción y su correcto funcionamiento (Hill *et al.*, 2018). Debido a las condiciones únicas en las que viven los distintos organismos las presiones selectivas son específicas para cada taxon, promoviendo la fijación de los sitios que otorguen una ventaja adaptativa a lo largo del tiempo.

Originalmente, debido a la importancia de las funciones de los genes mitocondriales que son básicas para la célula, se consideraba que era muy poco probable que estuvieran sujetos a selección positiva. El conocimiento del contexto ecológico brindó un aporte importante para mejorar el entendimiento

de las bases del proceso adaptativo en la mitocondria. Un ejemplo es el caso de los organismos poiquilotermos, en los que las adaptaciones en las proteínas mitocondriales que permitan una mayor estabilidad en ambientes con nuevas temperaturas tienen mayor probabilidad de ser seleccionadas (Ballard y Whitlock, 2004). En un escenario ambiental, en el que la cantidad de oxígeno es variable, las adaptaciones para la producción de energía en estas condiciones serán más ventajosas (Ballard y Whitlock, 2004; Scott *et al.*, 2011).

La creciente evidencia ha permitido entender de mejor manera cómo los procesos selectivos afectan al genoma mitocondrial. El papel de la selección purificadora resulta más lógico, al remover la aparición de mutaciones deletéreas dentro de las poblaciones. La hipótesis de selección purificadora actuando en el ADNmt se apoya al analizar la alta conservación a nivel de secuencia entre variedad de especies, a nivel de vertebrados e invertebrados (James *et al.*, 2016).

El papel de la selección positiva ha sido estudiado desde un enfoque fisiológico y molecular, pero su aceptación en el genoma mitocondrial se ha dado de manera más lenta. Una vez fundamentadas las bases fisiológicas de la adaptación se ha ido considerando que las adaptaciones en el ADNmt son un fenómeno común. Con el desarrollo de modelos y simulaciones sobre los conceptos de la teoría neutral, se ha vuelto evidente que la evolución del ADNmt se aleja de estas predicciones, explicándose solamente bajo un marco de selección natural.

Bazin *et al.* (2006) utilizaron los genomas mitocondriales de 80 especies de animales vertebrados e invertebrados. La hipótesis era que la diversidad contenida en el ADNmt debería reflejar el tamaño efectivo poblacional, fundamentado en la teoría de genética de poblaciones de que para un locus neutral se espera que la cantidad de polimorfismos sea proporcional al tamaño efectivo poblacional. Observaron que la diversidad entre invertebrados no era significativamente diferente de la diversidad de vertebrados, contradiciendo la

teoría de genética de poblaciones pues los grupos de animales invertebrados tienen un mayor tamaño efectivo poblacional que los animales vertebrados. Mamíferos y aves resultan ser tan polimórficos como insectos y moluscos. Esta primera evidencia reflejaría que la evolución del genoma mitocondrial no ocurría de manera neutral, no explicaba por lo que la diversidad en el genoma nuclear no se veía afectada de igual manera.

Mediante una prueba de McDonald-Kreitman, la cual compara la razón entre polimorfismos no-sinónimos y sinónimos a nivel poblacional, con la razón de las sustituciones no-sinónimas entre las sinónimas a nivel de divergencia, conocido como Índice de Neutralidad (NI, por sus siglas en inglés). EL NI permite la detección de la reducción de la diversidad en loci ligados a sitios con señales de selección. En el caso de selección purificadora, la diversidad es reducida por un efecto llamado *hitchhiking*, y en el caso de selección positiva, el efecto es llamado *genetic draft*. La diferencia entre ambas radica en la presencia de mutaciones ligeramente deletéreas en el segundo caso, al existir una mutación ventajosa, ésta acarrea consigo las mutaciones ligadas a dicho locus a pesar de ser ligeramente deletéreas.

El  $NI \approx 1$  cuando la evolución es neutral,  $NI > 1$  bajo selección negativa o purificadora, y  $NI < 1$  en caso de evolución adaptativa. Bazin *et al.* encontraron que, en los grupos vertebrados, el NI era ligeramente menor a uno en el ADNmt indicando que hay señales de selección positiva. En cambio, en el ADNmt de los grupos invertebrados eran significativamente menores a uno lo cual apoya que las sustituciones que ocurren dentro de estos organismos dan lugar a cambios adaptativos. Este trabajo ha sido de los primeros en exponer que el ADNmt está sometido a frecuentes cambios adaptativos, para dejar de considerarlo como un marcador neutral (Bazin *et al.*, 2006).

En las últimas décadas, han surgido trabajos en los que se reportan sitios mitocondriales con señales de selección positiva. Tal es el caso del cisne *Anser indicus*, el cual tiene una mutación en el sitio 116, cambiando el aminoácido triptófano en arginina, en el gen mitocondrial COX3. Esta mutación

le permite volar sobre las montañas Himalayas, reduciendo la distancia en su ruta migratoria, pues permite que la función no se vea comprometida en este ambiente de bajos niveles de oxígeno (Scott *et al.*, 2011). Estas señales de selección positiva han sido detectadas también en la especie de ave, *Eopsaltria australis*, la cual tiene relaciones filogenéticas discordantes con otras especies del mismo género al hacer uso de los marcadores nucleares y mitocondriales. Un total de 127 sustituciones de aminoácidos fueron detectadas entre los linajes de *E. australis* y las demás especies del género. De estas sustituciones, los que mostraron mayor señal de selección son cinco sitios pertenecientes a los genes mitocondriales: NADH-4, NADH-4L y Citocromo B (Morales *et al.*, 2015).

Finalmente, fueron detectadas señales de convergencia adaptativa en el orden de reptiles *Squamata*, en los cuales las filogenias realizadas con 13 genes pertenecientes al genoma mitocondrial presentan discordancias con las estimadas a partir de dos genes del genoma nuclear. El grupo de camaleones, iguanas, y lagartos agámidos forman un clado, conocido como Iguania, en las filogenias nucleares, mientras que la información mitocondrial apoya la agrupación de una relación hermana entre los lagartos agámidos y las serpientes. Al evaluar los sitios que apoyan las dos topologías, se detectaron que son pocos sitios en el ADNmt los que apoyan fuertemente la topología que ellos llaman discordante de la relación agámidos-serpientes. Al comparar los cambios ocurridos en un sitio específico entre las especies discordantes se detectó que muchos de estos eran convergentes, lo cual lleva a sugerir que el grupo de serpientes tuvo una serie de sustituciones que resultaron en la selección de aminoácidos convergentes en el ADNmt que los agrupa junto a los lagartos agámidos. Este escenario se sustenta en estudios previos de múltiples cambios de origen adaptativo en las proteínas mitocondriales del grupo de las serpientes. Desde un enfoque ecológico se ha discutido que esto se debe a la variación en sus procesos adaptativos metabólicos que resultan más eficientes (Castoe *et al.*, 2009). Han sido reportados múltiples ejemplos sobre sitios de selección en las distintas unidades proteicas que componen el

genoma mitocondrial, las cuales poseen un valor adaptativo en distintas condiciones (Pavlova *et al.*, 2017; Ngatia *et al.*, 2019).

Aunque no se minimiza la participación de la selección purificadora como parte de la historia dentro del genoma mitocondrial, la acumulación de evidencias que resaltan la presencia de señales de selección positiva que dan lugar a productos genéticos asociados a adaptaciones térmicas, de tamaño, longevidad y comportamiento, no puede ser ignorada como una fuerza evolutiva de gran importancia en este genoma. Al seleccionar un locus que resulte en una ventaja adaptativa, por la biología de la molécula mitocondrial, el arrastre de los loci ligados a estos sitios, en este caso toda la molécula, da como resultado la selección de múltiples sitios, aunque estos presenten mutaciones ligeramente deletéreas.

### **3.5 Discordancias filogenéticas en el filo *Nematoda*.**

El clado de nemátodos es un filo de organismos diversos ecológicamente. Se cree que este grupo de animales invertebrados se originó durante la radiación del periodo Cámbrico, lo que ha sido debatido por la falta de evidencia fósil, ya que las características de este grupo impiden su preservación. Su tamaño varía entre los 0.2 mm y los 6 metros, la mayoría de ellos no presentan coloraciones, sino que poseen cutícula transparente permitiendo observar su anatomía. Pueden ser encontrados en múltiples hábitats, formando una gran variedad de interacciones con diversos grupos de animales y plantas. Es reconocido como un grupo exitoso al contener gran cantidad de especies que se encuentran virtualmente en gran abundancia en múltiples ambientes y condiciones. Esto último lo ha vuelto un grupo de interés dentro de la comunidad científica.

La biodiversidad dentro del grupo está representada por especies de vida-libre y estilo de vida de parasitismo. Los nemátodos con estilo de vida parasitarios han resultado de mayor interés para la investigación científica,



esto es debido a su importancia en los distintos ambientes ecológicos, existiendo nemátodos parásitos con capacidad de infección en los distintos grupos de organismos, como plantas y animales (Viney, 2018). La aparición del estilo de vida parasitario a lo largo del clado de los nemátodos ha sido de interés para los estudios filogenéticos, pues de acuerdo con análisis dentro del grupo, el estilo de vida parasitario ha evolucionado 18 veces de manera independiente (Viney, 2018).

Algunos de estos nemátodos parasitarios afectan de manera negativa las actividades humanas, impactando en la producción agrícola, y la salud de animales de compañía y de importancia alimenticia, así como la causa de múltiples infecciones que se desarrollan en enfermedades en el humano (Park *et al.*, 2011). El estar adaptados a distintas condiciones y las múltiples interacciones con diversos organismos ha llamado la atención dentro de la comunidad científica, pues la disponibilidad de energía en distintas condiciones, caracteres de historias de vida e interacciones bióticas debe de verse reflejada en señales moleculares de selección en sus genomas mitocondriales y nucleares.

Esto ha llevado a preguntas sobre los factores genómicos que han facilitado la emergencia de los distintos estilos de vida dentro del grupo. Resulta entonces importante el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre nemátodos para el estudio de la evolución de los distintos estilos de vida. El uso de información molecular ha permitido un mayor entendimiento de las relaciones evolutivas entre las especies de nemátodos, las cuales eran resueltas anteriormente con caracteres morfológicos (Park *et al.*, 2011). De igual manera, el uso de múltiples marcadores moleculares para la resolución dentro del grupo presentó señales de discordancia entre las filogenias morfológicas, nucleares y mitocondriales. Uno de los primeros estudios filogenéticos basados en información molecular, haciendo uso del gen que codifica para la subunidad pequeña ribosomal de 53 taxones de nemátodos, permitió la distinción de cinco clados principales dentro del grupo (Blaxter *et*

*al.*, 1998). El fenómeno de discordancia filogenética se encuentra presente entre los cinco clados reportados en estudios recientes (Park *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016). Park *et al.*, (2011), analizaron las relaciones filogenéticas de un grupo de 36 nematodos utilizando los genomas mitocondriales. En este trabajo, se reportan múltiples inconsistencias entre la posición filogenética de varias especies de nematodos al compararse con la filogenia conocida inferida a partir de la subunidad ribosomal pequeña reportada por Blaxter *et al.* (1998). En este estudio las relaciones filogenéticas entre el nematodo *S. carpocapsae* y las especies del género *Strongyloides* no se recuperan en las filogenias mitocondriales.

Estas discordancias han sido reportadas como causadas por el uso de distintos marcadores moleculares, la presencia de homoplasias en el genoma mitocondrial y la poca información empleada para la inferencia filogenética; la mayoría de estas han sido realizadas con pocos genes nucleares (Zou *et al.*, 2017). Las razones biológicas de las discordancias en las filogenias de nemátodos han sido vagamente estudiadas.

#### **4. Hipótesis**

La causa de la discordancia filogenética se debe a la influencia de la selección positiva en el genoma mitocondrial.

#### **5. Objetivo general**

Determinar la razón por la que se observan diferencias entre filogenias de nemátodos al ser reconstruidas con el ADN mitocondrial o con el ADN nuclear.

##### **5.1 Objetivos particulares**

- Establecer casos de discordancia entre filogenias nuclear y mitocondrial en nemátodos.
- Determinar el papel del sorteo incompleto de linajes en las discordancias.
- Determinar el papel de la introgresión en las discordancias.
- Determinar el papel de la evolución adaptativa en las discordancias.

## 6. Metodología

### 6.1 Obtención de datos

Se usaron un total de 22 especies de nemátodos pertenecientes a los clados III, IV y V, de acuerdo a la filogenia reconstruida con la subunidad pequeña ribosomal (Blaxter *et al.*, 1998). La selección de especies fue de acuerdo con la disponibilidad de secuencias de ambos genomas, mitocondrial y nuclear, al igual que una búsqueda en la literatura en las que se reportaran casos de discordancia filogenética entre las dos topologías. Se usaron las secuencias codificantes del ADNmt y del ADNnu, y sus correspondientes traducciones conceptuales en secuencias de aminoácidos. Las secuencias de genomas nucleares y su anotación fueron obtenidas del sitio WormBase ParaSite database (<https://parasite.wormbase.org/>), y las secuencias mitocondriales del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las especies seleccionadas pertenecientes al **clado III** fueron: *Anisakis simplex*, *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis*, *Enterobius vermicularis*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus* y *Toxocara canis*. Las especies del **clado IV**: *Bursaphelencus xylophilus*, *Meloidogyne hapla*, *Panagrellus redivivus*, *Parastrongyloides trichosuri*, *Rhabditophanes sp. KR3021*, *Steinernema carpocapsae* y *Strongyloides ratti*. Del **clado V** se seleccionaron: *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Strongylus vulgaris* y *Pristionchus pacificus*.

### 6.2 Inferencia de genes ortólogos y alineamiento.

Usando las secuencias codificantes del genoma nuclear de las 20 especies de nemátodos, fueron inferidos grupos de genes ortólogos usando el programa Orthofinder 2.0 (Emms y Kelly, 2015). Este software usa metodologías típicas conocidas en la inferencia de ortólogos, como es la determinación por mejor hit-bidireccional (MHB) entre grupos de genes. Esto es, cuando genes específicos de dos especies alcanzan el máximo nivel de

similitud, el mejor “hit”, de entre los demás genes en búsquedas recíprocas, de la especie “A” a la especie “B” y viceversa (bidireccionales). Además, este software hace la inferencia de genes ortólogos mediante la reconstrucción de árboles de genes para determinar su historia evolutiva y asignarlos a sus respectivos “ortogrupos” (grupos de genes ortólogos de distintas especies) Por último, ofrece una ventaja técnica, el tiempo de procesamiento es corto. Para el caso de los genes mitocondriales, se utilizaron 11 de los 12 genes codificantes como ortólogos, esto debido a su alta conservación. Los nemátodos *Panagrellus redivivus* y *Toxocara canis* carecen del gen para la subunidad ATPasa-6 en su genoma mitocondrial, por lo que solo se utilizaron los genes de las subunidades NADH-I, NADH-II, NADH-III, NADH-IV, NADH-IVL, NADH-V, NADH-VI, citocromo-B, citocromo oxidasa I, citocromo oxidasa II y citocromo oxidada III.

Una vez que se determinaron los genes de copia única entre las 20 especies de nemátodos, se buscaron las secuencias de nucleótidos correspondientes a los genes obtenidos para realizar el alineamiento múltiple. Las secuencias fueron alineadas posteriormente usando la configuración predeterminada de MAFFT 7.45 (Katoh *et al.*, 2002). El alineamiento de las secuencias de nucleótidos se hizo con base en el alineamiento de sus correspondientes secuencias de amino ácidos usando el software RevTrans (Wernersson y Pedersen, 2003), para obtener un alineamiento de nucleótidos por codones. De esta manera se tendrían cuatro alineamientos para la reconstrucción de filogenias, dos nucleares y dos mitocondriales, y en cada caso una de nucleótidos y otra de aminoácidos.

### **6.3 Construcción de filogenias nuclear y mitocondrial**

Para la reconstrucción filogenética se estimó el mejor modelo evolutivo para las secuencias alineadas de cada gen, nuclear y mitocondrial, mediante

el software ProtTest (Abascal *et al.*, 2005). Los alineamientos de los genes individuales fueron concatenados para cada genoma. La inferencia filogenética se realizó usando los cuatro concatenados: aminoácidos y nucleótidos de datos nucleares y mitocondriales, mediante el software MrBayes 3.2.7 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) usando cuatro cadenas MCMC a lo largo de 10 millones de generaciones y muestreando cada 1000 generaciones. Cada gen fue tratado como particiones separadas no ligadas para ambos grupos de datos. Este procedimiento fue similar para nucleótidos y aminoácidos. Los valores de probabilidad posterior Bayesiana fueron determinados una vez que se descartó un cuarto de los árboles como burn-in.

### **6.3.1 Estimación del árbol de especies**

Para la estimación del árbol de especies se utilizaron los mismos alineamientos que para la inferencia filogenética con MrBayes, secuencias mitocondriales y nucleares concatenadas y tratadas de manera independiente. Se usó el programa de coalescencia multiespecie \*BEAST2 (Bouckaert *et al.*, 2013) para las secuencias provenientes del genoma nuclear. Para las secuencias mitocondriales se utilizó BEAST tratando los genes como un solo locus. Corriendo durante 10 mil millones de generaciones de MCMC para ambos juegos de datos, y muestreando cada 5000 generaciones. El resultado obtenido fue procesado con TreeAnnotator, con un burn-in de 25% de árboles, estableciendo un límite de probabilidad posterior de 0.8.

### **6.4 Determinación de especies discordantes**

Una vez obtenidas las filogenias de los distintos métodos de estimación filogenética, se utilizó la paquetería de R: ape 5.3 ("<http://ape-package.ird.fr/>"), el cual contiene la función *all.equal.phylo*, para comparar la presencia global de las relaciones entre dos filogenias. Se compararon las secuencias de aminoácidos mitocondriales contra aminoácidos nucleares, y nucleótidos

mitocondriales contra nucleótidos nucleares, obtenidos de las estimaciones realizadas con MrBayes y BEAST, según el caso.

### 6.5 Pruebas de introgresión y sorteo incompleto con ABBA-BABA

Una vez establecidas las relaciones discordantes entre las topologías nucleares y mitocondriales, se utilizaron las secuencias nucleotídicas de los genes nucleares usados en la estimación filogenética. Para la identificación de señales moleculares que presentan los distintos sitios, se utilizó el estadístico-D, conocido también como ABBA-BABA, mediante la paquetería de R: “evobir” (<http://www.uta.edu/karyodb/evobiR/>). Este estadístico evalúa los distintos patrones que exhiben los alelos al divergir las especies. Dadas tres poblaciones (P1, P2, P3) y un grupo externo (O) con la relación filogenética (((P1, P2) P3) O), los patrones normales de divergencia entre cuatro especies están limitados a: BAAA, BBAA, BBBA y ABAA, donde A, representa el alelo ancestral y B el alelo derivado. Los patrones anormales ABBA o BABA, representan un alelo compartido entre P2 y P3 en el primero y P1 y P3 en el último patrón. El exceso de uno de estos sitios sobre el otro es un indicativo de introgresión de los alelos entre las poblaciones. Es decir, si existen significativamente más ABBA que BABA, se postula introgresión entre P2 y P3, en tanto que, si es al inverso, se postula introgresión entre P1 y P3. Esto se evalúa con la fórmula del estadístico-D:

$$D(P_1, P_2, P_3, O) = \frac{\sum C_{ABBA}(i) - C_{BABA}(i)}{\sum C_{ABBA}(i) + C_{BABA}(i)}$$

Si la proporción de ambos patrones se mantiene sin diferencia significativa es indicativo de sorteo incompleto de linajes. Su uso está restringido a cuatro especies, una de las cuales es un outgroup del que se obtiene el alelo ancestral. Para este análisis se utilizaron las especies que mostraban relaciones discordantes entre filogenias nuclear y mitocondrial. Se

consideró una especie outgroup diferente para cada análisis dependiendo de las especies discordantes.

## 6.6 Señales de selección mitocondrial

Los alineamientos por codones de las secuencias nucleotídicas, que se hicieron preservando el alineamiento de aminoácidos, fueron analizados para la búsqueda de señales de selección en sitios de aminoácidos. Esto se hizo para las secuencias provenientes de ambos genomas, mitocondrial y nuclear.

Los programas usados fueron MEME de HYPHY (Pond *et al.*, 2005) y PAML (Yang, 2007). Ambos se basan en la estimación del cociente entre sitios no-sinónimos por sitio no-sinónimo (dN), y sustitución sinónima por sitio sinónimo (dS), que se denomina omega ( $\omega = dN/dS$ ). El valor de  $\omega$  indica el modo de selección, sitios que evolucionan neutralmente presentan un valor  $\omega = 1$ , selección negativa  $\omega < 1$  y selección positiva  $\omega > 1$ . Los genes altamente conservados presentan firmas de selección purificadora que pueden ocultar la señal de pocos sitios que presentan selección positiva en el gen. Para el caso de PAML, se utilizó la comparación entre modelos evaluados por una comparación por un *Likelihood-ratio test* (LRT), después de compararse un modelo con valores de omega fijados a 1, contra un modelo que permite que el radio omega ( $\omega$ ) sea variable entre los sitios de las secuencias de genes codificantes. En estos modelos se comparan los modelos M1 y M2a, en el primero se fija el valor de omega igual a 1, lo cual supone la hipótesis de neutralidad, y esos son comparados para evaluar si el modelo M2a resulta significativo a las señales de selección positiva, y los modelos M7 vs M8. Si el LRT indica que los modelos por selección positiva son preferidos, un método de Bayes Empirical Bayes es usado para calcular la probabilidad posterior de que ese sitio pertenezca a una clase con  $\omega > 1$ .

Para la evaluación de sitios positivos con HYPHY, se utilizó la función MEME, la cual permite la variación de  $\omega$  entre los sitios de aminoácidos, y a



su vez entre las ramas de la filogenia, un modelo de ramas y sitios. Para aumentar la cantidad de sitios útiles en la construcción filogenética exclusiva de sitios positivos, fueron considerados los sitios que presentan un valor de  $p < 0.20$  para el caso de HyPhy, mientras que para PAML se consideraron los sitios que presentaban valores de  $\omega$  mayores a 1.

### **6.7 Construcción de filogenias con firmas de selección**

Al obtener los sitios que presentan señales de selección positiva, estos fueron removidos del alineamiento de aminoácidos original para ser concatenados en un nuevo alineamiento compuesto únicamente de sitios con señal de selección positiva. Para la estimación filogenética, se utilizaron los modelos de evolución de aminoácidos de la filogenia principal, esto se realizó para la información mitocondrial. La corrida filogenética fue realizada con MrBayes y BEAST, para tener resultados comparables entre las filogenias obtenidas de los genomas completos contra las de sitios neutrales y positivos. Las comparaciones entre filogenias se realizaron nuevamente con la paquetería APE, con la función *all.equal.phylo*.

### **6.8 Prueba McDonald-Kreitman para señal de selección positiva en genoma mitocondrial.**

La prueba McDonald-Kreitman ha permitido evaluar la presencia de señales de selección en las secuencias génicas, indicando la fuerza evolutiva que predomina en los genes de interés. Para esto, se requieren datos de polimorfismos a nivel de poblaciones de la especie de interés, y datos de divergencia en secuencia con una especie hermana conocida. Esta prueba ha sido empleada en estudios de selección mitocondrial previos (Bazin et al., 2006).

Se utilizaron las secuencias mitocondriales de 6 individuos pertenecientes a la especie *Steinernema carpocapsae* de distintas poblaciones, para la obtención de información de polimorfismos poblacionales.

Comparándose contra las secuencias mitocondriales de las dos especies con las que *S. carpocapsae* formaba relaciones hermanas en ambas filogenias, *Strongyloides ratti* (filogenia nuclear) y *Anisakis simplex* (filogenia mitocondrial), para obtener los datos de divergencia. Esto se hizo para cada gen codificante en la mitocondria.

Una vez obtenidos los resultados de comparaciones de polimorfismos y divergencia de aminoácidos, para cada gen mitocondrial se calculó con la siguiente formula el índice de neutralidad (NI):

$$NI = \frac{\frac{Kn}{Ks}}{\frac{Dn}{Ds}}$$

Si  $NI > 1$  indica que el principal tipo de selección actuando es la selección purificadora,  $NI = 1$  indica evolución neutral y  $NI < 1$  selección positiva. En este último caso un exceso de polimorfismos poblacionales a nivel de la divergencia es explicado por la hipótesis de acarreo genético (*genetic draft*, en inglés) o por barridos selectivos (*selective sweeps*, en inglés). Mutaciones ligeramente deletéreas que, por el hecho de estar ligadas a sitios seleccionados, son acarreadas y seleccionadas junto los sitios adaptativos.

## 7. Resultados

### 7.1 Búsqueda de ortólogos

La inferencia de ortogrupos fue hecha con genomas completos y anotados disponibles en las bases de datos. Se determinaron los genes ortólogos por medio de Orthofinder v2.0 usando el procedimiento de todos contra todos (*All-against-all*), lo que dio como resultado 19,972 grupos de ortólogos, u ortogrupos, de los cuales 10 son genes de copia única entre los 22 nemátodos utilizados en este análisis. La existencia de pocos genes de copia única concuerda con lo reportado sobre los múltiples eventos de perdida y

duplicación genética dentro del filo de nemátodos (Sommer y Streit, 2011; Baskaran y Rödelsperger, 2015).

## **7.2 Filogenias nucleares y mitocondriales.**

Las relaciones filogenéticas estimadas entre los clados III, IV y V fueron representadas con el uso de genes nucleares y mitocondriales, usando métodos Bayesianos para la construcción de los árboles. Las discordancias existentes entre el conjunto de datos nucleares y mitocondriales se encuentran representadas de igual manera en las filogenias estimadas con la información de nucleótidos y aminoácidos. Para la comparación de las discordancias entre los sitios positivos y las filogenias generales nuclear y mitocondrial, se optó por representar las filogenias estimadas con la información correspondiente a los aminoácidos.

El grupo de datos concatenados nucleares consta de 8,128 caracteres, mientras que los datos mitocondriales corresponden a 3,413 caracteres, de secuencias de aminoácidos.

Las abreviaturas con las que se representan los nombres para cada especie son las siguientes:

- *Anisakis simplex* (Asi)
- *Brugia malayi* (Bma)
- *Bursaphelencus xylophilus* (Bxy)
- *Caenorhabditis briggsae* (Cbr)
- *Caenorhabditis elegans* (Cel)
- *Dirofilaria immitis* (Dim)
- *Enterobius vermicularis* (Eve)
- *Heterorhabditis bacteriophora* (Hba)
- *Loa loa* (Llo)
- *Meloidogyne hapla* (Mha)
- *Onchocerca volvulus* (Ovo)

- *Panagrellus redivivus* (*Pre*)
- *Parastrongyloides trichosuri* (*Ptr*)
- *Pristionchus pacificus* (*Ppa*)
- *Rhabditophanes* sp. KR3021 (*Rkr*)
- *Steinernema carpocapsae* (*Sca*)
- *Strongyloides ratti* (*Sra*)
- *Strongylus vulgaris* (*Svu*)
- *Toxocara canis* (*Tca*)

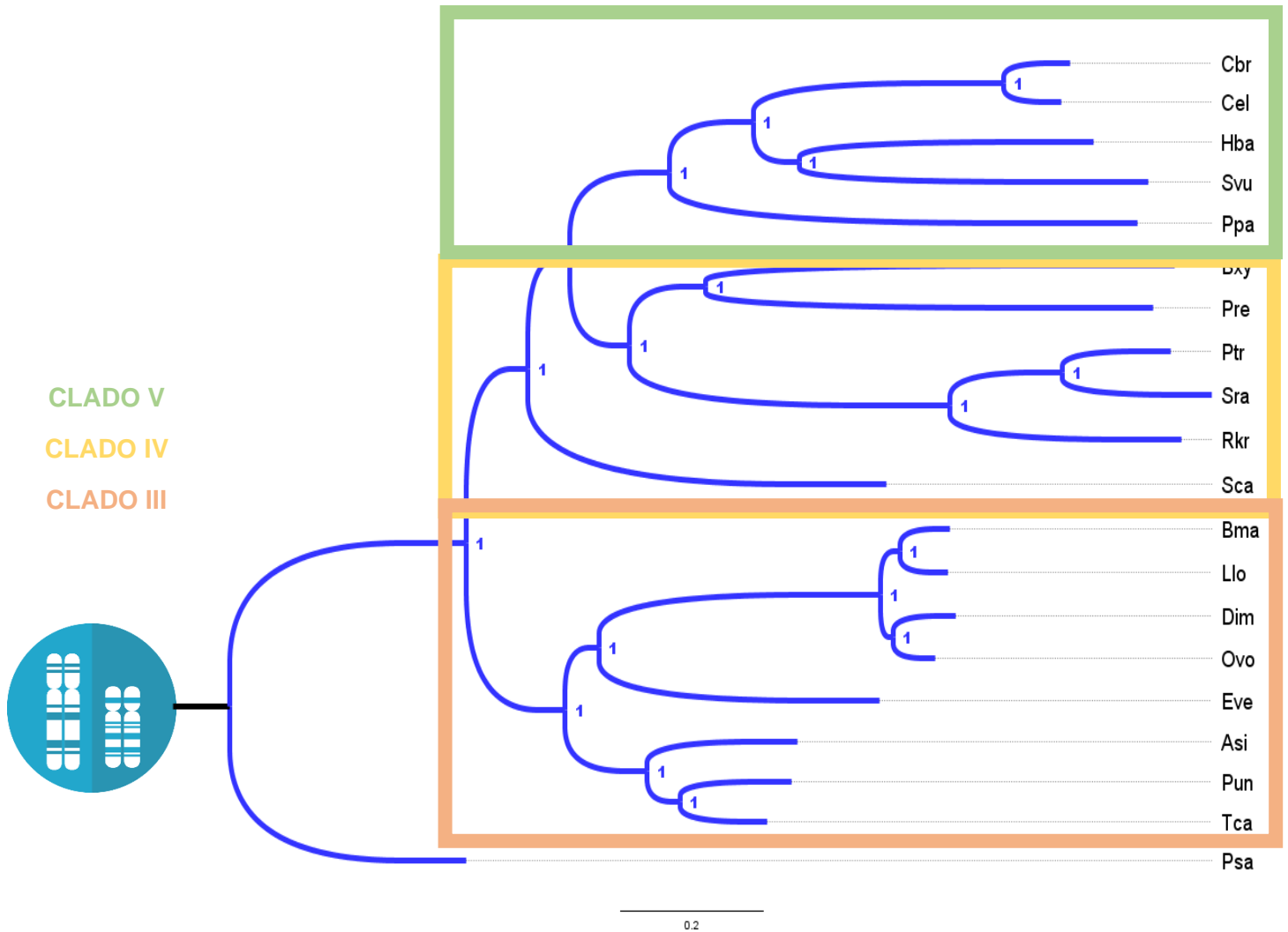
Para ambas filogenias se utilizaron nemátodos pertenecientes al clado C, del género *Plectus* spp. como outgroup.

- *Plectus acumitatus* (*Pac*) (Fil. Nuclear).
- *Plectus sambesii* (*Psa*) (Fil. Mitocondrial).

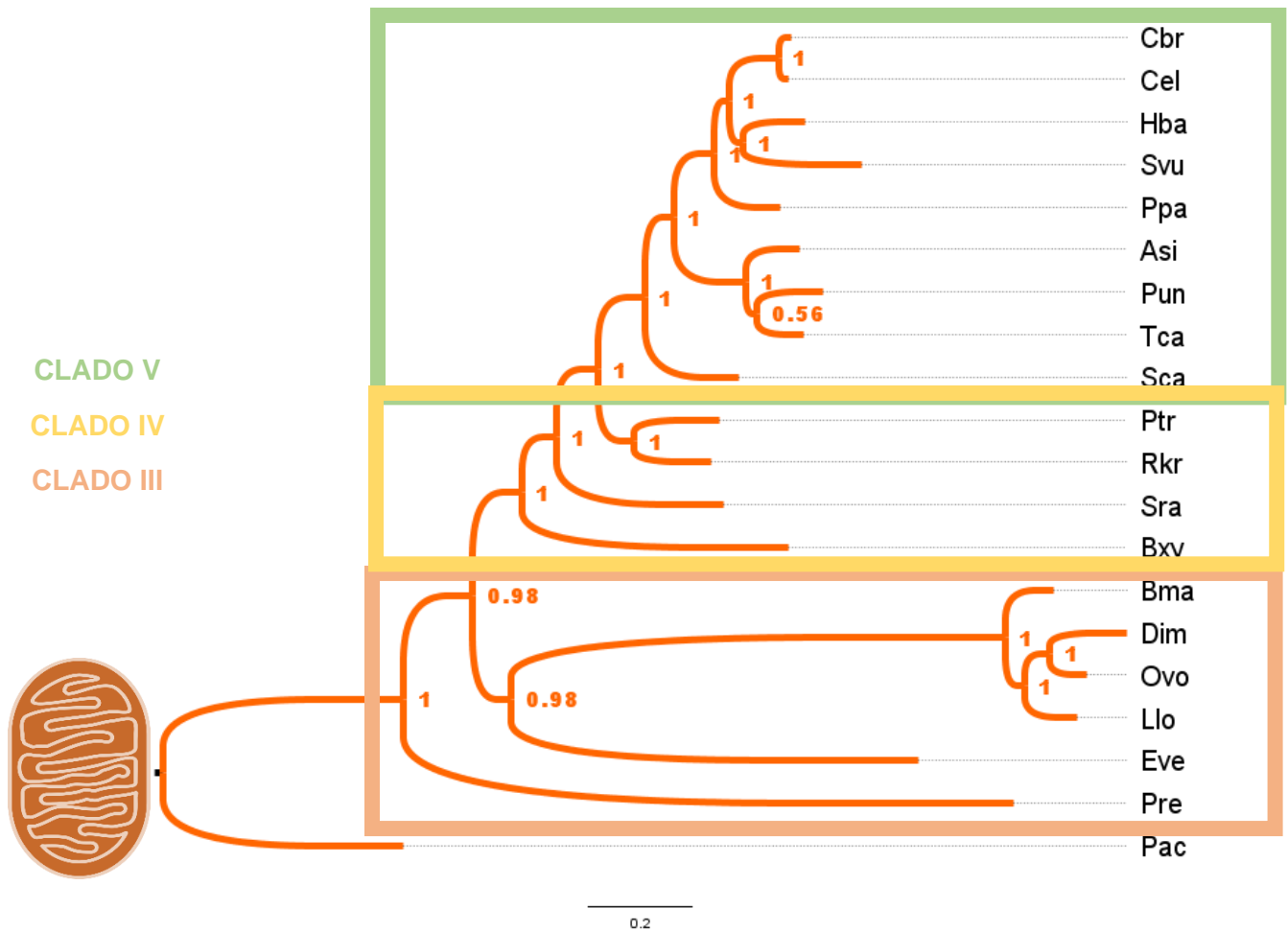
Las topologías de las filogenias obtenidas parecen no ser concordantes entre los dos marcadores. Las especies de nemátodos *Asi*, *Pun* y *Tca*, las cuales forman un clado, y *Sca* presentan posiciones con gran diferencia entre ambas filogenias. En el caso del grupo compuesto por *Asi*, *Pun* y *Tca* (**APT**), las relaciones filogenéticas de este grupo en los marcadores nucleares se representan formando parte del clado III, contrario a su posición en un clado IV-V en las filogenias mitocondriales. Su posición fuera del clado III, la topología mitocondrial, ha sido ya reportada en trabajos previos, lo cual corresponde con lo observado en este trabajo (Park et al., 2011). La topología nuclear (Fig. 1) se representa de la manera: ((*Enterobius vermicularis*, ((*Brugia malayi*, *Loa loa*), (*Dirofilaria immitis*, *Onchocerca volvulus*))), (***Anisakis simplex***, (***Toxocara canis***, ***Parascaris univalens***)). Mientras que la topología mitocondrial (Fig. 2) se encuentra representada por las relaciones: (*Steinernema carpocapsae*, ((***Anisakis simplex***, (***Toxocara canis***, ***Parascaris univalens***))), (*Pristionchus pacificus*, ((*Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*), (*Heterorhabditis bacteriophora*, *Strongylus vulgaris*))). En ambas filogenias, los soportes de probabilidad bayesiana para cada nodo fueron altos en todos los análisis.

El segundo caso de discordancia corresponde a la posición del nemátodo *Steinernema carpocapsae*. Este nemátodo perteneciente al orden Rhabditida presenta discrepancias entre ambas filogenias. Su posicionamiento con respecto a los clados de los nemátodos, al igual que el caso del grupo **APT**, se ve discordante al estar representado en clados distintos en cada filogenia. En la filogenia nuclear forma una relación hermana con el grupo de nemátodos del clado IV integrado por *Strongyloides ratti*, *Parastrongyloides trichosuri* y *Rhabditophanes sp KR3021*. Esta relación filogenética se ha reportado con anterioridad, de igual manera bajo el uso de información proveniente del genoma nuclear (Rougon-Cardoso et al., 2016). Las relaciones filogenéticas de este nemátodo con los demás nemátodos del clado IV corresponde a la siguiente topología: (***Steinernema carpocapsae***, ((*Rhabditophanes sp KR3021*, (*Strongyloides ratti*, *Parastrongyloides trichosuri*)), (*Panagrellus redivivus*, (*Meloidogyne hapla*, *Bursaphelenchus xylophylus*))) (Figura 1).

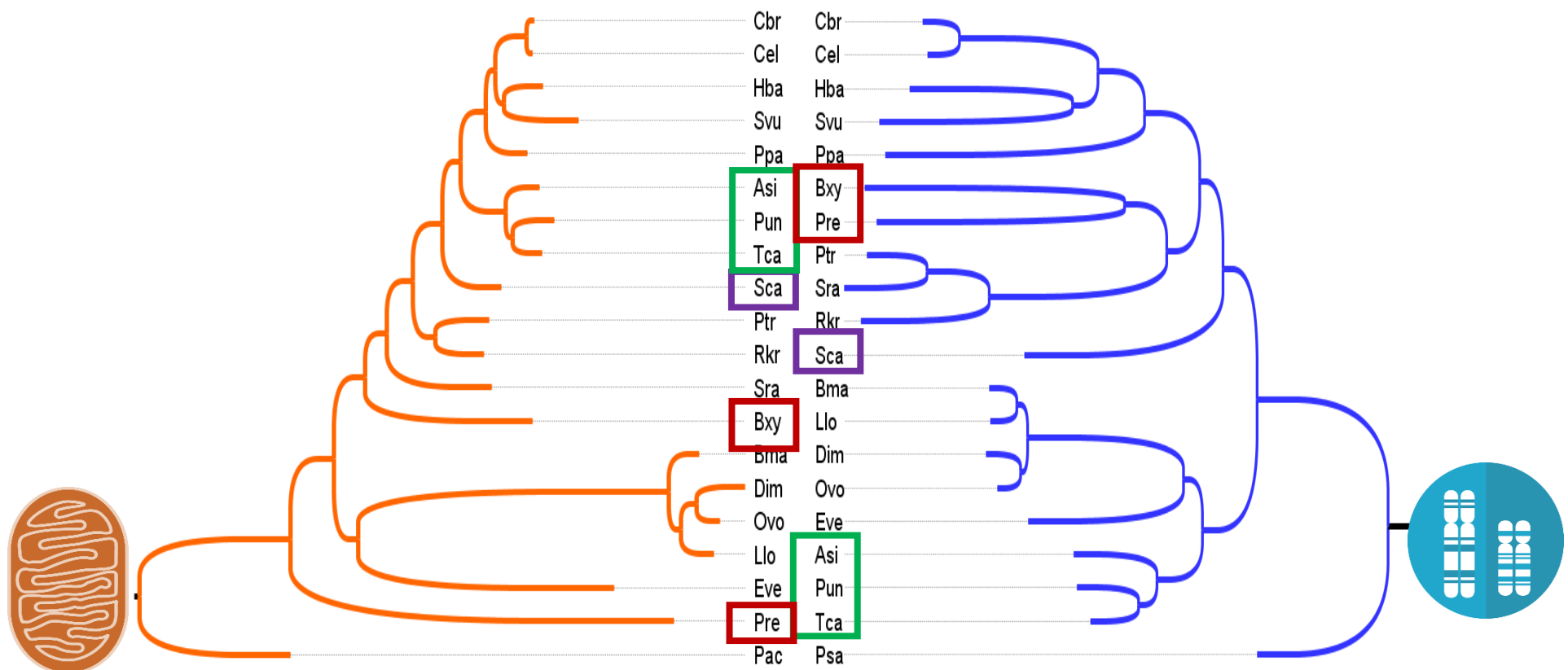
En contraste, en la filogenia mitocondrial, este nemátodo forma una relación hermana con los nemátodos del clado V, (***Steinernema carpocapsae***, ((*Anisakis simplex*, (*Toxocara canis*, *Parascaris univalens*)), (*Pristionchus pacificus*, ((*Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*), (*Heterorhabditis bacteriophora*, *Strongylus vulgaris*))) (Figura 2). Las discordancias aquí descritas se encuentran representadas en la comparación entre la filogenia mitocondrial y nuclear que puede observarse en la figura 3.



**Figura 1. Filogenia nuclear de nemátodos.** Relaciones filogenéticas entre los nemátodos pertenecientes a los clados III, IV y V, representados por los colores naranja, amarillo y verde, respectivamente. Arbol bayesiano obtenido con  $1 \times 10^{12}$  generaciones. Los números en las ramas representan probabilidad posterior.



**Figura 2. Filogenia mitocondrial de nemátodos.** Relaciones filogenéticas entre los nemátodos pertenecientes a los clados III, IV y V, representados por los colores naranja, amarillo y verde, respectivamente. Arbol bayesiano obtenido con  $1 \times 10^{12}$  generaciones. Los números en las ramas representan probabilidad posterior.



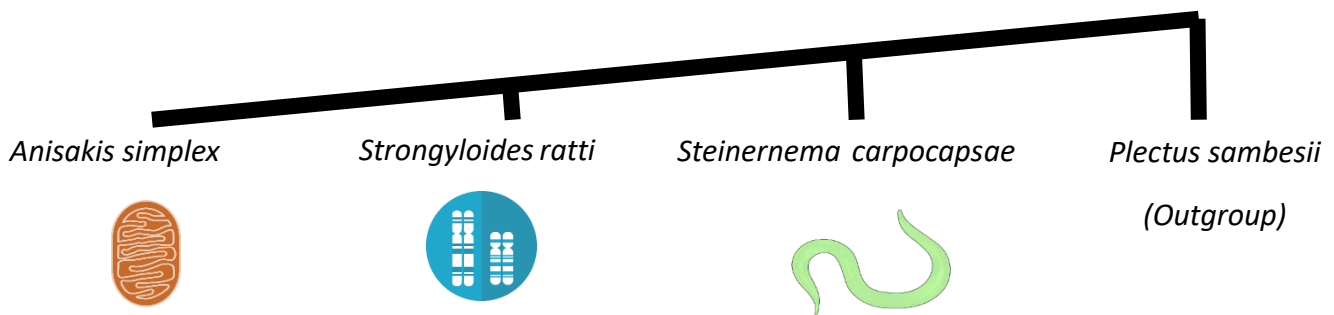
**Figura 3. Discordancias entre marcadores genómicos mitocondrial y nuclear.** Existen discordancias al comparar las filogenias realizadas con distintos marcadores genómicos. Las discordancias aquí reportadas están representadas por los colores, verde, es la del clado compuesto *Anisakis simplex* (*Asi*), *Toxocara canis* (*Tca*) y *Parascaris univalens* (*Pun*); de morado, *Steinernema carpocapsae* (*Sca*), y rojo, *Bursaphelencus xylophyllus* (*Bxy*) y *Panagrellus redivivus* (*Pre*).



#### 7.4 Prueba del estadístico-D en el genoma nuclear.

Para analizar la discordancia establecida entre el nemátodo *S. carpocapsae* y sus especies hermanas, *A. simplex*; en la filogenia mitocondrial, y *S. ratti*, en la filogenia nuclear, y usando como fuente del alelo ancestral al nemátodo *P. acumitatus* (Fig4.), se encontraron 1231 genes ortólogos nucleares de copia única entre estas cuatro especies.

Al realizar un concatenado de estos genes se contó con un total de 1,071,518 caracteres alineados de secuencia de nucleótidos. Este alineamiento fue puesto a prueba con la función CalcD, de la paquetería evobiR, que estima los sitios que corresponden a los patrones normales de divergencia e identifica aquellos sitios que son discordantes con los patrones de divergencia atípicos, los sitios ABBA y BABA. De estos sitios fueron encontrados 38,646 y 34,185, respectivamente. La probabilidad obtenida para que el valor de D sea significativamente diferente de 0, lo que indicaría sorteo incompleto de linajes, es de prácticamente 0. Por lo que puede descartarse que la discordancia pudiera ser causada por dicho fenómeno. Los sitios ABBA que se encuentran en mayor proporción respaldan la filogenia nuclear, los nemátodos *S. carpocapsae* y *S. ratti* comparten más sitios.



**Figura 4. Estadístico-D para el nemátodo *S. carpocapsae*.** Esquema de la prueba ABBA-BABA. Se indicó con una miniatura de una mitocondria y de cromosomas de color azul para indicar las relaciones hermanas con las que forma el nemátodo *S. carpocapsae* en sus respectivas filogenias. Este esquema indica la divergencia de los sitios con los patrones que resultan discordantes.

## 7.5 Sitios de selección y neutrales en el genoma y mitocondrial.

El tipo de selección en los genes codificantes de proteínas es inferido por la fórmula de omega ( $\omega$ ), ratio de sustituciones no-sinónimas por sitio no-sinónimos (**dN**), respecto del número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (**dS**). Usando los programas HyPhy (Pond *et al.*, 2005) y PAML (Yang, 2007) se determinaron los valores de omega para detectar aquellos sitios de manera independiente que presentan selección positiva ( $\omega > 1$ ) o negativa ( $\omega < 1$ ) en las secuencias concatenadas de genes codificantes mitocondriales. Este concatenado comprende 3,403 codones, correspondientes a igual número de sitios de aminoácidos.

Los sitios que presentan selección purificadora utilizando HyPhy corresponden a 2,225. Un exceso de sitios con selección purificadora corresponde a la hipótesis de alta conservación en los genes mitocondriales debido a la importancia de sus funciones en la vitalidad del organismo.

Usando el software HyPhy se detectaron 76 sitios con señales de selección positiva, de los cuales 32 presentan valores significativos de selección positiva, mientras que con PAML, usando los modelos M2 y M8 de CODEML, se detectaron 113 sitios con señales de selección positiva a lo largo de estos genes mitocondriales. Para la determinación de estos sitios se consideró aquellos con un omega mayor a 1. Los sitios de aminoácidos candidatos con señales de selección positiva identificados por HyPhy están en la Tabla 1 y los de PAML en la Tabla 2.

**Tabla 1. Sitios de selección positiva en el genoma mitocondrial determinados por MEME en HyPhy.** Se muestran en rojo los sitios que presentan un valor de  $p$  significativo para los sitios bajo selección positiva.

<i>Posición aminoácido</i>	LRT	<i>p-value</i>	Ramas bajo selección	Tamaño total de rama
4	3.52	0.08	0	4.59

10	3.87	0.07	1	15.47
70	2.4	0.15	1	36.67
104	2.97	0.11	2	7.64
182	4.62	0.05	2	4.88
244	2.76	0.12	1	37.93
311	3.28	0.09	1	14.43
323	5	0.04	0	190.83
352	2.44	0.14	0	25.65
356	2.88	0.11	0	1582.44
360	2.35	0.15	0	58.36
365	4.22	0.06	1	11.52
370	2.82	0.12	1	42.8
393	10.59	0	0	345.3
396	4.64	0.05	2	27.14
796	4	0.06	1	56.27
886	10.36	0	1	191.22
933	2.32	0.15	1	21.12
948	4.83	0.04	0	23.56
962	3.11	0.1	0	12.1
966	3.24	0.09	0	21.14
977	8.27	0.01	2	2.26
981	4.05	0.06	1	3.43
1151	2.57	0.13	2	13.64
1422	7.2	0.01	0	589.77
1469	2.96	0.11	0	13.99
1470	6.52	0.02	4	15.43
1483	5.15	0.03	2	3.5
1505	24.3	0	1	404.04
1534	7.05	0.01	3	65.34
1563	5.22	0.03	3	3.1
1628	7.76	0.01	2	2.85
1629	6.93	0.01	4	17.86
1651	4.69	0.04	1	11.18
1655	4.3	0.05	1	1.17
1689	5.69	0.03	3	3.44
1714	3.69	0.07	1	11.6
1745	3.34	0.09	0	8.83
1748	11.43	0	2	5.74
1777	3.85	0.07	2	13.67
1779	3.96	0.06	1	20.31
1782	2.98	0.11	0	105.11

1817	2.35	0.15	0	282.38
1853	8.29	0.01	0	659.17
1949	2.36	0.15	3	14.7
1960	3.38	0.09	3	4.39
1970	9.83	0	1	66.63
1978	2.42	0.15	1	40.92
1980	5.03	0.04	3	10.95
2049	8.95	0.01	0	139.9
2052	4.9	0.04	0	17.32
2067	4.2	0.06	3	23.42
2162	3.6	0.08	2	2.04
2217	2.73	0.12	2	9.98
2251	2.32	0.15	0	34.72
2257	4.54	0.05	0	43.09
2310	3.22	0.1	1	20.72
2339	2.72	0.12	1	21.94
2457	4.86	0.04	1	31.45
2566	4.23	0.06	1	9.83
2662	4.49	0.05	1	1.12
2696	3.42	0.09	3	4.71
2846	5.21	0.03	2	17.02
2852	2.34	0.15	1	11.31
2863	2.55	0.14	2	22.44
2881	2.86	0.11	1	9.58
3017	5.22	0.03	0	25.15
3087	2.79	0.12	0	56.25
3116	3.48	0.08	2	3.3
3119	7.33	0.01	0	414.01
3158	2.72	0.12	0	1619.08
3191	4.56	0.05	0	17.96
3205	11.6	0	5	5.38
3332	5.07	0.04	1	46.76
3358	4.65	0.05	0	49.87
3377	2.63	0.13	0	15.1

**Tabla 2. Sitios de selección positiva en el genoma mitocondrial determinados por CODEML en PAML.** Los valores presentados en esta tabla con color rojo corresponden a los sitios que fueron considerados con señales de selección positiva pero cuyos valores de omega se encuentran por debajo de 1.

Sitio	$\omega$	Sitio	$\omega$	Sitio	$\omega$
7	1.039 +- 0.364	1817	0.673 +- 0.424	2859	1.121 +- 0.356
59	1.211 +- 0.353	1820	1.471 +- 0.132	2863	1.043 +- 0.356
63	1.114 +- 0.359	1821	1.416 +- 0.218	2915	0.953 +- 0.321
105	0.947 +- 0.324	1822	1.342 +- 0.285	2924	1.315 +- 0.301
111	0.970 +- 0.337	1825	1.282 +- 0.322	3017	0.964 +- 0.333
114	1.191 +- 0.350	1850	1.282 +- 0.314	3085	1.197 +- 0.389
310	1.333 +- 0.292	1853	0.959 +- 0.324	3087	0.968 +- 0.432
338	0.907 +- 0.337	1878	1.321 +- 0.300	3096	1.107 +- 0.355
348	0.973 +- 0.355	1883	1.023 +- 0.353	3130	1.275 +- 0.322
374	1.110 +- 0.359	1924	1.111 +- 0.354	3133	1.068 +- 0.362
375	1.075 +- 0.352	1927	0.934 +- 0.334	3154	0.997 +- 0.339
377	1.133 +- 0.356	1947	1.208 +- 0.346	3156	0.684 +- 0.411
810	0.897 +- 0.329	1954	0.937 +- 0.332	3167	1.254 +- 0.329
921	0.826 +- 0.360	1974	0.968 +- 0.327	3184	1.070 +- 0.357
922	0.981 +- 0.361	1975	1.256 +- 0.331	3199	0.936 +- 0.331
923	1.178 +- 0.367	1976	1.130 +- 0.356	3213	1.013 +- 0.345
928	0.718 +- 0.406	1977	1.353 +- 0.276	3215	1.390 +- 0.247
929	0.681 +- 0.389	2010	1.030 +- 0.346	3219	1.066 +- 0.358
933	0.729 +- 0.409	2041	1.116 +- 0.352	3221	1.063 +- 0.358
935	0.730 +- 0.410	2043	1.056 +- 0.348	3252	1.017 +- 0.354
948	0.879 +- 0.348	2044	1.462 +- 0.150	3283	0.915 +- 0.388
961	0.711 +- 0.375	2045	1.410 +- 0.224	3293	1.271 +- 0.323
1017	0.836 +- 0.378	2046	1.305 +- 0.313	3331	0.982 +- 0.435
1057	0.737 +- 0.415	2047	0.984 +- 0.332	3338	1.420 +- 0.214
1061	0.632 +- 0.394	2051	1.204 +- 0.342	3342	1.207 +- 0.343
1093	1.130 +- 0.366	2092	0.993 +- 0.336	3347	1.270 +- 0.322
1097	1.135 +- 0.352	2105	1.128 +- 0.347	3349	0.941 +- 0.340
1198	0.683 +- 0.407	2106	1.377 +- 0.256	3357	1.454 +- 0.165
1201	0.691 +- 0.408	2216	1.078 +- 0.358	3359	0.980 +- 0.330
1202	0.721 +- 0.419	2224	1.422 +- 0.211	3360	1.206 +- 0.344
1244	1.086 +- 0.364	2226	1.335 +- 0.292	3363	0.953 +- 0.336
1245	1.139 +- 0.361	2257	1.292 +- 0.314		
1317	1.152 +- 0.351	2338	0.979 +- 0.333		
1359	1.114 +- 0.410	2536	1.222 +- 0.338		

<b>1373</b>	1.162 +- 0.354	<b>2539</b>	1.180 +- 0.348		
<b>1384</b>	1.024 +- 0.350	<b>2571</b>	1.368 +- 0.267		
<b>1566</b>	1.024 +- 0.341	<b>2649</b>	0.980 +- 0.328		
<b>1636</b>	1.133 +- 0.354	<b>2653</b>	0.949 +- 0.329		
<b>1726</b>	1.076 +- 0.349	<b>2710</b>	1.128 +- 0.355		
<b>1744</b>	0.914 +- 0.327	<b>2712</b>	0.997 +- 0.329		
<b>1816</b>	1.100 +- 0.417	<b>2723</b>	1.192 +- 0.352		

Los sitios de aminoácidos detectados con señales de selección positiva que concuerdan entre ambos programas se ven reducidos a 6: **933, 948, 1853, 2863, 3017 y 3087**. Sin embargo, existen sitios que presentan señales de selección positiva solo con uno de los dos métodos, pero que presentan señal en sitios adyacentes con el otro método.

GEN CODIFICANTES MITOCONDRIALES	SITIOS CON SELECCIÓN POSITIVA	SITIOS CON SELECCIÓN POSITIVA CON VALOR DE P<0.05
CITOCROMO B	<b>13</b>	<b>2</b>
CITOCROMO C OXIDASA SUBUNIDAD I	<b>5</b>	<b>4</b>
CITOCROMO C OXIDASA SUBUNIDAD II	<b>6</b>	<b>1</b>
CITOCROMO C OXIDASA SUBUNIDAD III	<b>1</b>	<b>1</b>
NADH SUBUNIDAD I	<b>14</b>	<b>11</b>
NADH SUBUNIDAD II	<b>12</b>	<b>5</b>
NADH SUBUNIDAD III	<b>2</b>	<b>0</b>
NADH SUBUNIDAD IV	<b>7</b>	<b>2</b>
NADH SUBUNIDAD IV-L	<b>1</b>	<b>1</b>
NADH SUBUNIDAD V	<b>12</b>	<b>5</b>
NADH SUBUNIDAD VI	<b>3</b>	<b>2</b>

**Tabla 3. Sitios positivos determinados por MEME pertenecientes a cada uno de los genes mitocondriales.**

La mayor cantidad de sustituciones con firmas de selección positiva se encuentran en los genes mitocondriales NADH subunidad-I y el citocromo-B, según la estimación utilizando MEME, fueron 14 y 13 sitios, respectivamente. Los sitios de selección positiva por gen mitocondrial están indicados en la Tabla 3. Solo el gen NADH-subunidad 3 no presenta sitios con valores significativos de selección positiva.

### **7.6 Filogenia mitocondrial de sitios positivos.**

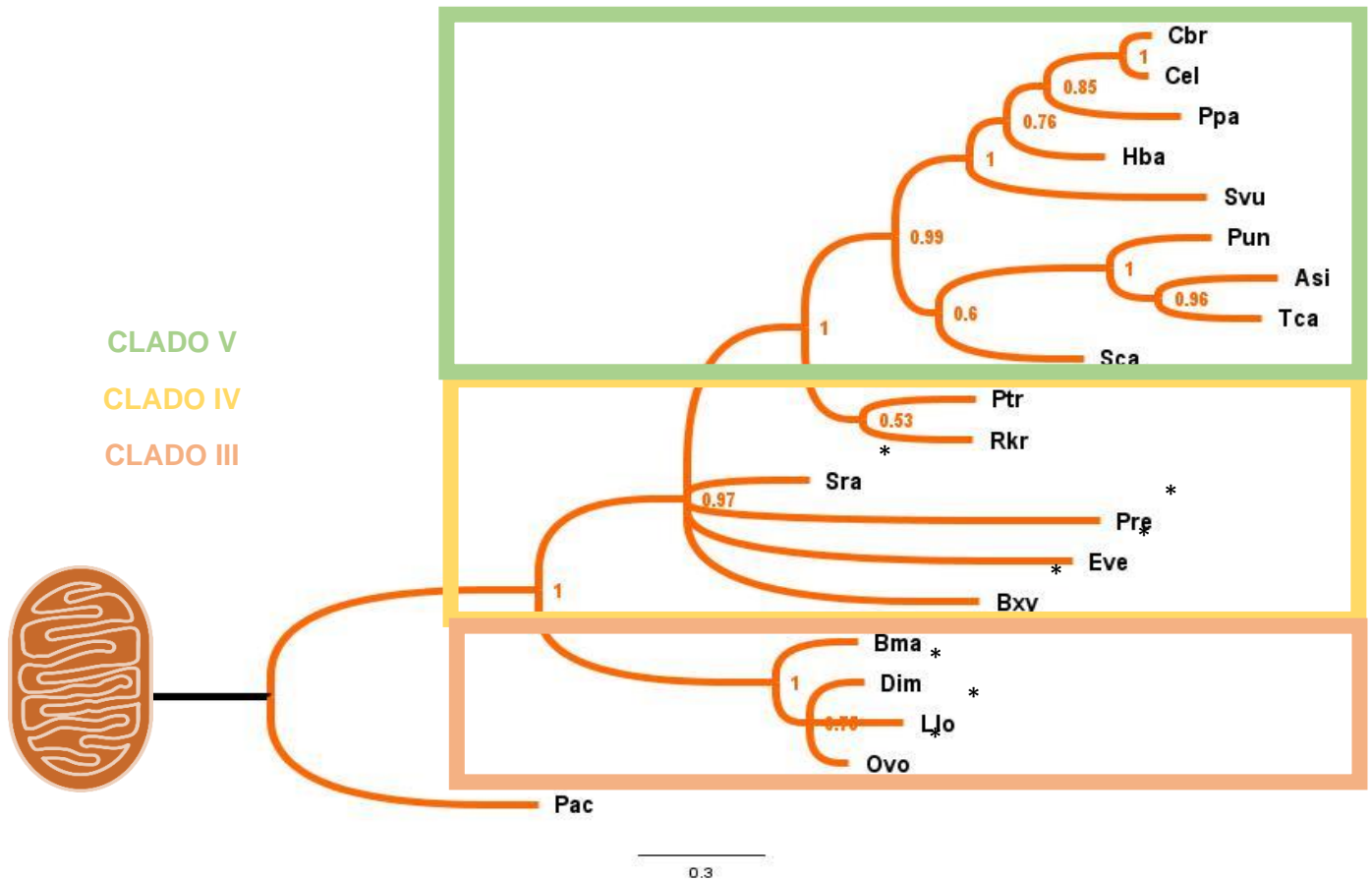
Para determinar el papel de la selección positiva como causa de la discordancia se reconstruyó una filogenia mitocondrial utilizando únicamente los sitios con un valor de  $\omega$  mayor a 1. Se utilizaron los 113 sitios determinados por el programa CODEML.

La filogenia resultante presentó dos politomías en las relaciones establecidas. La primera corresponde al clado conformado por *Dirofilaria immitis*, *Loa loa* y *Onchocerca volvulus*. Sin embargo, este clado, junto su especie hermana *Brugia malayi*, mantienen su posición en el clado III con fuerte soporte de probabilidad posterior. La segunda politomia se presenta en el clado IV compuesta de las especies *Strongyloides ratti*, *Panagrellus redivivus*, *Bursaphelencus xylophylus*, y *Enterobius vermicularis* (Fig. 5). Al compararse con la filogenia general mitocondrial estas dos presentan discordancias entre estas especies.

Las especies restantes pertenecientes al clado IV, *Parastrongyloides trichosuri* y *Rhabditophanes spKR302*, mantienen su posiciones y relaciones filogenéticas concordantes con la filogenia general mitocondrial. De igual manera, las especies del clado V son concordantes con la filogenia general. Las discordancias del clado de *Anisakis simplex*, *Toxocara canis* y *Parascaris univales*, y de *Steinernema carpocapsae*, que se reportaron previamente al comparar la filogenia general mitocondrial contra la filogenia nuclear, se

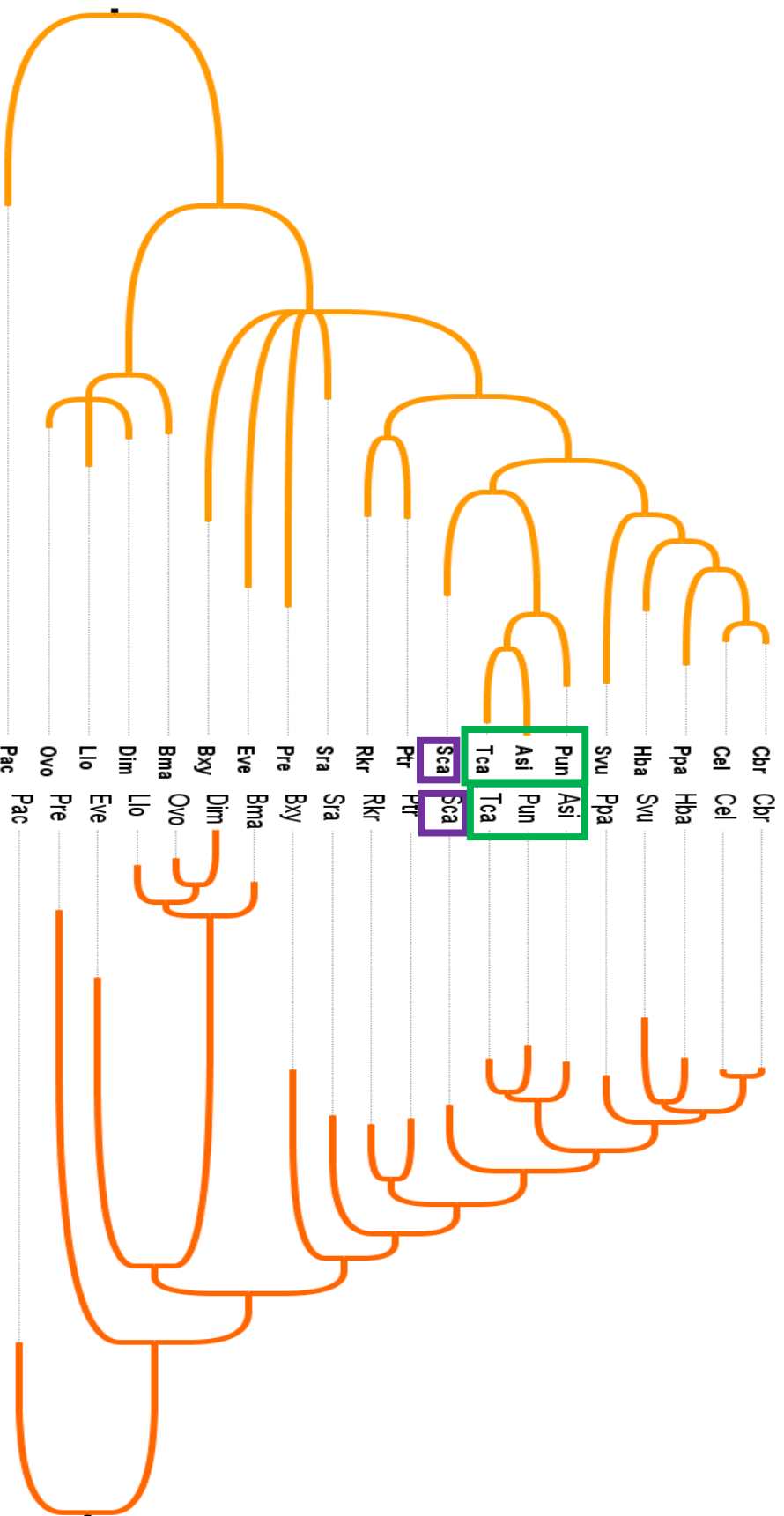
observan de igual manera al compararse con la filogenia de sitios positivos mitocondriales (Fig. 5).

La filogenia construida exclusivamente con los sitios con señales de selección positiva recapitula las relaciones evolutivas discordantes entre las filogenias nucleares y mitocondriales. Se recalca la importancia de la información filogenética que presentan los 113 sitios positivos en la reconstrucción de las relaciones filogenéticas y la historia evolutiva que se representa con el marcador mitocondrial (Fig. 6), y estas a su vez, presentan las mismas discordancias con la filogenia nuclear (Fig. 7).

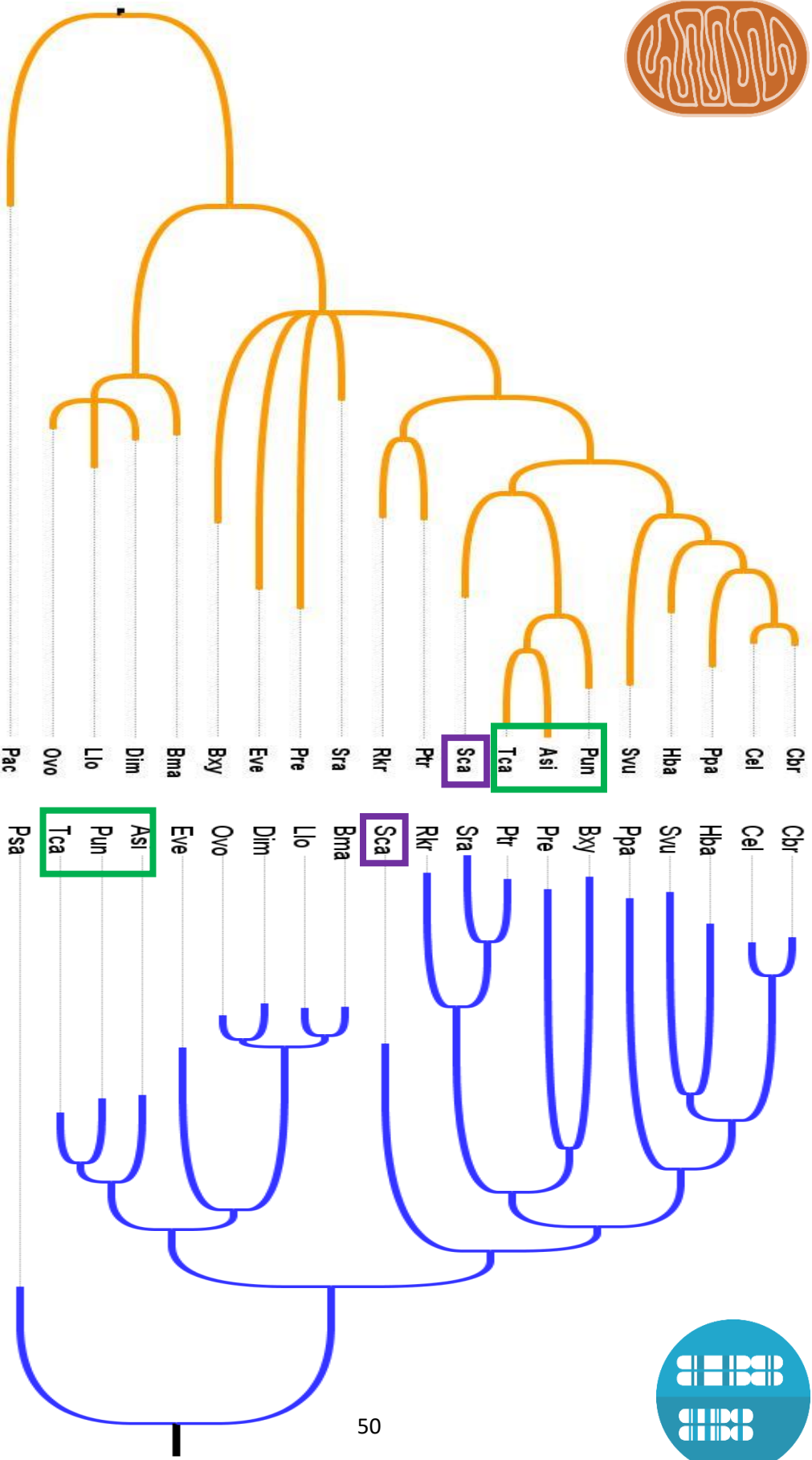
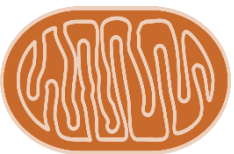


**Figura 5. Filogenia mitocondrial de sitios positivos.** Una vez detectados los sitios con señales de selección positiva en los genes mitocondriales, se reconstruyó la filogenia compuesta de un concatenado de los sitios mitocondriales. Esta filogenia refleja la historia filogenética del marcador mitocondrial, con la excepción de las politomias marcadas con el símbolo (\*). Arbol bayesiano obtenido con  $1 \times 10^{12}$  generaciones. Los números en las ramas representan probabilidad posterior.





**Figura 6. Concordancia entre la filogenia mitocondrial general y filogenia mitocondrial de sitios positivos.** Al comparar las topologías entre la filogenia mitocondrial general y la filogenia de sitios positivos pueden observarse las discordancias reportadas con la filogenia general mitocondrial. Se reflejan las discordancias del clado compuesto por *Anisakis simplex* (*Asi*), *Toxocara canis* (*Tca*) y *Parascaris univalens* (*Pun*); y de morado, *Steinerinema carpocapsae* (*Sca*). Con la diferencia de la presencia de politomias entre algunas especies pertenecientes a los clado III y IV



**Figura 7. Discordancias entre la filogenia nuclear y filogenia mitocondrial de sitios positivos.** Al comparar las topologías entre la filogenia nuclear y la filogenia de sitios positivos pueden observarse las discordancias reportadas con la filogenia general mitocondrial. Se reflejan las discordancias del clado compuesto por *Anisakis simplex* (*Asi*), *Toxocara canis* (*Tca*) y *Parascaris univalens* (*Pun*); y de morado, *Steinemema carpocapsae* (*Sca*).

### **7.7 Prueba de McDonald-Kreitman de los genes mitocondriales de *Steinernema carpocapsae*.**

La prueba de McDonald-Kreitman (M-K) fue aplicada en los alineamientos individuales de los genes mitocondriales. Esta prueba requiere de la comparación entre individuos de la especie de interés, contra una especie filogenéticamente cercana. Por ello se realizó únicamente para la evaluación de selección o neutralidad en la especie *Steinernema carpocapsae*, ya que para ella se contaba con información genómica mitocondrial de distintos individuos. Como especie cercana se utilizó *Strongyloides ratti*, especie hermana de la filogenia nuclear. Se utilizaron los 12 genes mitocondriales.

De acuerdo con los valores obtenidos del índice de neutralidad para cada gen, 11 de los 12 genes mitocondriales muestran evidencias de selección positiva en su secuencia. Los valores del índice de neutralidad para cada uno de estos genes son menores a 1. La única excepción fue el citocromo b que exhibe señales de selección purificadora, con un valor de 7.6, sin embargo, este gen mostró la mayor cantidad de sitios que presentaban valores de omega mayores a uno, infiriendo selección positiva. Los valores del índice de neutralidad que corresponden a la prueba entre *S. carpocapsae* y *S. ratti* están representados en la Tabla 4.

Para observar si esto cambia con respecto de la especie que se compara, se utilizó a *Anisakis simplex* como especie con relación filogenética cercana, usando como criterio su cercanía como especies hermanas en la filogenia mitocondrial. De igual manera, se obtuvo evidencia de selección positiva al hacer la prueba. Los genes NADH-subunidad 2 y NADH-subunidad 5 muestran valores que respaldan hipótesis de neutralidad (1.20) y selección negativa (2.28), respectivamente. Los valores del índice de neutralidad que corresponden a la prueba entre *S. carpocapsae* y *A., simplex* están representados en la Tabla 5

La mayoría de las sustituciones al hacer ambas comparaciones, entre *S. ratti* y *S. carpocapsae* y *A. simplex* y *S. carpocapsae*, parecen ser principalmente no-sinónimas, las cuales se espera que estas fueran removidas por la selección purificadora. Dentro de los genes mitocondriales del nematodo *S. carpocapsae*, las sustituciones no-sinónimas se encuentran en exceso en comparación con las sustituciones sinónimas, lo que sugiere que la principal fuerza evolutiva que parece estar presente en ambas pruebas ( $\omega$  y NI) es la selección positiva.

**Tabla 4. Prueba de McDonald-Kreitman entre individuos de *Steinernema carpocapsae* y *Strongyloides ratti*.** Para cada gen codificante en el genoma mitocondrial se indican los valores de polimorfismos a nivel poblacional y sustituciones a nivel de divergencia, con el nemátodo *Strongyloides ratti*, así como su valor de NI. Los valores presentados en color rojo son aquellos que apoyan selección positiva.

SCA/SRA	PS	PN	DS	DN	NI
ATP	7	0	64	110	0
COI	40	2	189	131	0.0721374
COII	19	5	62	52	0.31376518
COIII	18	3	77	112	0.11458333
CYTB	3	30	108	142	7.6056338
ND1	14	2	101	125	0.11542857
ND2	11	2	51	97	0.09559513
ND3	15	2	30	38	0.10526316
ND4	22	10	94	191	0.223703
ND4L	2	3	9	51	0.26470588
ND5	5	28	47	293	0.89829352
ND6	7	5	41	91	0.32182104

**Tabla 5. Prueba *McDonald-Kreitman* entre individuos de *Steinernema carpocapsae* y *Anisakis simplex*.** Para cada gen codificante en el genoma mitocondrial se indican los valores de polimorfismos a nivel poblacional y sustituciones a nivel de divergencia, con el nemátodo *Anisakis simplex*, así como su valor de NI. Los valores presentados en color rojo son aquellos que apoyan selección positiva.

<b>SCA/ASI</b>	<b>PS</b>	<b>PN</b>	<b>DS</b>	<b>DN</b>	<b>NI</b>
<b>ATP</b>	8	0	72	53	<b>0</b>
<b>COI</b>	40	2	213	70	<b>0.15214286</b>
<b>COII</b>	20	4	87	48	<b>0.3625</b>
<b>COIII</b>	18	3	92	51	<b>0.30065359</b>
<b>CYTB</b>	30	3	125	142	<b>0.08802817</b>
<b>ND1</b>	14	2	115	88	<b>0.18668831</b>
<b>ND2</b>	3	11	41	125	1.20266667
<b>ND3</b>	15	2	37	44	<b>0.11212121</b>
<b>ND4</b>	22	10	143	120	<b>0.54166667</b>
<b>ND4L</b>	4	1	36	28	<b>0.32142857</b>
<b>ND5</b>	4	32	77	270	2.28148148
<b>ND6</b>	7	4	53	66	<b>0.45887446</b>

## 8. Discusión

### 8.1 Discordancia entre filogenias nuclear y mitocondrial.

Las relaciones filogenéticas entre los clados III, IV y V pertenecientes al filo de los nemátodos fueron representadas con el uso de marcadores moleculares provenientes de los compartimentos nuclear y mitocondrial. La inferencia filogenética de esta información molecular dio como resultado dos filogenias que resultan discordantes al representar las relaciones que forman algunas de las 20 especies de nemátodos utilizadas en este estudio.

Las secuencias alineadas de aminoácidos de genes mitocondriales y nucleares concatenados corresponden a 3403 y 7952 caracteres, respectivamente. Las relaciones inferidas presentan un alto soporte Bayesiano en sus nodos, incluyendo aquellas que presentan discordancia. Las especies discordantes entre ambas filogenias son las del grupo III nuclear conformado por los nemátodos parasitarios *Anisakis simplex*, *Parascaris univalens* y *Toxocara canis*, y las especies de nemátodos pertenecientes al grupo IV nuclear *Bursaphelenchus xylophylus*, *Panagrellus redivivus* y *Steinernema carpocapsae*. La posición filogenética de estas especies en sus respectivos clados en estudios previos que hacen uso de información molecular nuclear no presentan diferencias con los resultados aquí obtenidos en la filogenia Nuclear (Blaxter y Koutsovoulos, 2015). Al comparar con las relaciones representadas por la filogenia mitocondrial, estas especies resultan discordantes. El clado compuesto por *Anisakis simplex*, *Toxocara canis* y *Parascaris univalens* se posicionan como un clado hermano al clado V, formando una relación hermana con el nemátodo de vida libre *Pristionchus pacificus*. De igual manera, los nemátodos parásitos *Bursaphelenchus xylophylus* y *Panagrellus redivivus*, los cuales mantienen una relación filogenética como especies hermanas en la filogenia nuclear, se posicionan formando distintas relaciones filogenéticas con nemátodos del clado III en la filogenia mitocondrial.

Por último, la posición filogenética del nemátodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* el cual ocupa una relación hermana con los nemátodos *Strongyloides ratti*, *Parastrongyloides trichosuri* y *Rhabditophanes spKR3021* formando un grupo monofilético del clado IV en la filogenia nuclear, presenta una posición monofilética con los nemátodos del clado V. En la filogenia mitocondrial, *Steinernema carpocapsae* se agrupa junto al clado V, formando una relación hermana con el clado *Anisakis simplex*, *Toxocara canis*, *Parascaris univalens*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Pristionchus pacificus*, *Strongylus vulgaris* y *Caenorhabditis spp.* Estas relaciones filogenéticas concuerdan con lo visto en estudios previos de nemátodos (Park et al.2011). El posicionamiento de *Steinernema carpocapsae* como parte del clado IV no se recupera en los análisis que hacen uso de la información mitocondrial. Las especies pertenecientes al género *Steinernema spp.* han sido mostradas con posiciones discordantes entre la información nuclear y mitocondrial (Blaxter et al., 1998; Smythe et al., 2006). Se requieren mayores estudios para la determinación en la resolución de la posición de este grupo de nemátodos.

Las relaciones filogenéticas representadas en la filogenia mitocondrial cuentan con un alto soporte Bayesiano, por lo que estas relaciones son realmente discordantes entre los distintos marcadores genómicos.

## **8.2 La discordancia no se explica por sorteo incompleto de linajes o introgresión.**

Una vez que se determinaron las discordancias existentes entre las filogenias mitocondrial y nuclear, se utilizó el estadístico-D para determinar la razón detrás de la discordancia. Este estadístico ha sido utilizado para determinar si la información molecular utilizada en la inferencia filogenética presenta señales moleculares del patrón anormal de segregación de los alelos al divergir las especies. Las

causas más comunes para la discordancia han sido introgresión y el sorteo incompleto de linajes, por lo que esta prueba ha resultado útil y sencilla en su aplicación para determinar si la historia evolutiva de las especies ha sido moldeada por estos fenómenos moleculares.

En el caso de las discordancias aquí observadas, se puso a prueba que el genoma nuclear estuviera sujeto a la presencia de señales moleculares de SIL o introgresión. Esto es porque de acuerdo con la teoría el genoma mitocondrial completaría su proceso de sorteo de linajes antes que el genoma nuclear por lo que en estos clados de nemátodos las señales de SIL en el genoma mitocondrial se habrían perdido mucho antes que en el genoma nuclear debido al extendido tiempo de divergencia entre los clados de nemátodos. Por lo que esta prueba se hizo directamente en los genes nucleares para identificar si la discordancia estaba dada en la información codificada en este genoma. De resultar negativa, se descarta que este fenómeno tuviera influencia en el sistema genético mitocondrial, debido a lo explicado anteriormente.

En el caso del nemátodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* se realizó la prueba utilizando como fuente de los alelos ancestrales al nemátodo *Plectus acumitatus*, y probando si existían señales moleculares de un evento de introgresión o de sorteo incompleto de linajes al comparar los patrones de los sitios ABBA y BABA con los nemátodos *Anisakis simplex*, su especie hermana en el genoma mitocondrial, y *Strongyloides ratti*, su especie hermana en el genoma nuclear.

De un alineamiento de 1,071,518 sitios de nucleótidos correspondiente a 1,231 genes nucleares, no hubo evidencias que los patrones de ABBA o BABA se presentaran significativamente de manera equitativa, por lo que la discordancia no puede ser explicada por sorteo incompleto de linajes. Los sitios ABBA son más comunes en el alineamiento, por lo que *Strongyloides ratti* y *Steinernema*



*carpocapsae* comparten más sitios, que *Anisakis simplex* y *Steinernema carpocapsae*, lo que corresponde a lo inferido en la filogenia nuclear. Estos resultados permiten excluir el sorteo incompleto de linajes como causa de la discordancia.

De igual manera, los sitios con un patrón BABA que apoyan la hipótesis de introgresión entre los nemátodos *Anisakis simplex* y *Steinernema carpocapsae* se encuentran en menor cantidad que los sitios ABBA, los que apoyan la relación hermana entre *Strongyloides ratti* y *Steinernema carpocapsae*. Los eventos de introgresión suelen explicar las relaciones discordantes entre marcadores nucleares y mitocondriales. Debido a que no existen señales moleculares en los genes nucleares que apoyen la hipótesis de introgresión entre *A. simplex* y *S. carpocapsae*, puede inferirse que la agrupación de estas dos especies en la filogenia mitocondrial no es causada por la transferencia del genoma mitocondrial, permitiendo inferir que la introgresión no es causante de la discordancia. Sin embargo, para descartar por completo el supuesto de introgresión, se requieren más evidencias.

### **8.3 La filogenia de sitios positivos reconstruye la historia mitocondrial discordante.**

Se reconstruyó una filogenia con el concatenado de los sitios de aminoácidos que presentaban un valor de  $\omega$  mayor a 1, en todas las especies del análisis. Estos sitios representan el 3.3% de los caracteres utilizados en la reconstrucción filogenética mitocondrial general. Para esta filogenia se propuso un corte menos restrictivo para el valor de la probabilidad de que el sitio tuviera un valor de omega mayor a uno. En trabajos como el realizado por Morales *et al* (2015), se consideraron los sitios con una probabilidad posterior menor a 0.15 como sitios con selección positiva, esto es bajo los criterios de Bayes Empirical Bayes (BEB) (Yang *et al.* 2005). En nuestro trabajo, se consideraron sitios con

una probabilidad posterior de 0.2 para obtener más sitios que presentaran información filogenética. Esto es debido a que en nuestros primeros análisis se determinaron 89 sitios con selección positiva, que presentaban un valor de  $p < 0.05$ , pero que al realizar la reconstrucción filogenética presentaban politomias en los clados III y V, con las discordancias del grupo de *A. simplex* y *S. carpocapsae* aún se encontraban representadas en la filogenia de 89 sitios, por lo que se optó por realizar un corte menos restrictivo.

La filogenia realizada exclusivamente con los sitios positivos recapituló la historia evolutiva mitocondrial, con la excepción de dos politomias, una de estas compuesta por las especies *Bursaphelenchus xylophylus*, *Panagrellus redivivus*, *Strongyloides ratti* y *Enterobius vermicularis* y la segunda por *Onchorcerca volvulus*, *Loa loa* y *Dirofilaria immitis*. Sin embargo, las discordancias filogenéticas de los nemátodos del grupo de *Anisakis simplex*, *Parascaris univalens*, *Toxocara canis* y el entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* continúan presentes en la filogenia y presentan valores altos de soporte Bayesiano, por lo que sigue presentándose la discordancia entre las filogenias nuclear y mitocondrial de sitios positivos.

Pocos sitios mitocondriales con señales de selección positiva reconstruyen las discordancias entre las filogenias nuclear y mitocondrial, por lo que puede inferirse que estos sitios contienen suficiente información filogenética para la reconstrucción de la filogenia general mitocondrial. Esto puede deberse a que los sitios neutrales, y probablemente los casi neutrales, existentes en el genoma mitocondrial se mantienen ligados a sitios con selección positiva, por lo que los primeros se ven afectados por el actuar de la selección positiva al momento de reconstruir la historia evolutiva de las especies cuando se usa la información molecular del ADNmt. El uso del bucle-D y el sitio de control, comúnmente usados en la inferencia filogenética

mitocondrial, están ligados a la influencia de los pocos sitios mitocondriales con selección positiva.

#### **8.4 Selección positiva como la principal fuerza actuando en la historia evolutiva del genoma mitocondrial.**

Se exploraron las firmas de selección positiva en el genoma mitocondrial de los linajes mitocondriales de los clados III, IV y V pertenecientes al filo de nemátodos. En nuestro análisis se detectaron señales de selección purificadora a lo largo del mitogenoma, lo cual va acorde a la hipótesis de la alta conservación de las proteínas de la fosforilación oxidativa (FOSOX) para conservar su funcionalidad. Esto se ve en los 2,225 sitios de aminoácidos que presentan valor de  $\omega$  menor a 1, lo que indica selección purificadora. A su vez, la evidencia de señales de selección positiva en pocos sitios resulta importante.

Múltiples pruebas sugieren que estos resultados no son falsos positivos. La evidencia de selección positiva fue detectada por dos programas, 77 sitios de acuerdo con la estimación con HyPhy y 113 con PAML, lo que indica que la selección positiva ocurre dentro de pocos sitios del mitogenoma. A pesar de que ambos métodos coinciden solamente en 6 sitios, existen sitios con señal significativa de selección positiva. Estas señales de selección positiva ocurren dentro de todos los genes codificados en la mitocondria. Retomando la filogenia de sitios positivos, estos son filogenéticamente informativos para la recapitulación de la historia mitocondrial discordante. Las comparaciones entre el modelo M1 contra el modelo M2 y del M7 contra el M8 indican que la evolución del genoma mitocondrial dentro de este grupo de nematodos se ve afectado por dos fuerzas selectivas. En primer lugar, la selección purificadora que remueve las variantes que alteran la función, la mayoría de los sitios presentaron un valor de  $\omega < 1$ . Finalmente, la selección positiva de aquellos sitios con valor de  $\omega >$

1, que da lugar a la fijación de pocos sitios que otorgan una ventaja en la adecuación del organismo.

La prueba de McDonald-Kreitman, cuantifica los polimorfismos no silenciosos y silenciosos a razón de las sustituciones no silenciosas y silenciosas, y a partir de esta información se calcula el índice de neutralidad. Si la proporción de estos sitios se encuentra equivalente, se considera que la evolución de dicha secuencia es de manera neutral, con un NI aproximado a la unidad, por lo que los valores por debajo o arriba representan una desviación de la neutralidad. Aquellos valores mayores a la unidad son un indicativo de que la secuencia presenta un exceso de polimorfismos de aminoácidos, lo que se espera bajo el supuesto de selección purificadora. En el caso contrario, cuando el valor es menor a la unidad, indica un exceso de sustituciones divergentes no silenciosas, queriendo decir que múltiples mutaciones que tienen como resultado el cambio de aminoácido, son fijadas una vez que las secuencias divergen. Esto quiere decir que las mutaciones que presentan una ventaja adaptativa son fijadas, y que debido a que otros sitios ligados también presentan sustituciones, estos también son fijados, incluyendo aquellos que resultan en cambios deletéreos. Bajo el supuesto de selección purificadora, estos cambios deletéreos serían eliminados, contrario a lo ocurrido en la hipótesis de selección positiva, que conlleva a la fijación de estos cambios deletéreos a nivel de divergencia. Esto concuerda con los resultados aquí obtenidos, con la hipótesis de selección positiva, donde múltiples mutaciones ligeramente deletéreas son fijadas a causa del acarreo genético de sustituciones ligadas a los sitios que otorgan una ventaja adaptativa.

Se analizó la presencia de señales de selección en el nemátodo *Steinernema carpocapsae*, del cual se contaba con información de polimorfismos del genoma mitocondrial, al comparar las sustituciones sinónimas y no-sinónimas de las especies hermanas del nemátodo. Por

el posicionamiento discordante fue necesario realizar una doble prueba comparándolo contra *A. simplex* y contra *S. ratti*.

Los resultados de divergencia en ambas comparaciones exhiben la fijación de múltiples sustituciones sinónimas y no-sinónimas, comparándose con los polimorfismos existentes dentro de la población de *S. carpocapsae*. En ambas comparaciones puede observarse que los genes mitocondriales exhiben un valor de NI < 1, lo cual va acorde a la hipótesis de selección positiva como la principal fuerza evolutiva que actúa sobre la secuencia de las proteínas codificantes del genoma mitocondrial. Aquellas mutaciones que presenten cambios adaptativos corresponderán a los cambios que serán fijados por selección positiva, mientras que las sustituciones ligadas a estos sitios, en el caso del genoma mitocondrial al ser una molécula circular donde todos los sitios se encuentran ligados, serán fijadas por acarreo genético.

## **9. Conclusión**

El uso de la reconstrucción filogenética como herramienta para la determinación de la historia evolutiva de las especies ha tomado gran importancia dentro de múltiples áreas de la biología. El uso de los distintos marcadores moleculares que se emplean en su elaboración continúa siendo debatido tras décadas de reportes de la existencia de discordancia entre las filogenias nucleares y mitocondriales.

La existencia de las discordancias no resulta ajena al filo de los nemátodos. Dentro del grupo se han reportado discordancias en los distintos niveles taxonómicos. En trabajos previos, las razones biológicas detrás de estas discordancias del filo no han sido ampliamente estudiadas. En este trabajo pudimos identificar 4 discordancias entre las filogenias de nemátodos reconstruidas con los marcadores mitocondriales y nucleares. Resulta importante conocer la historia evolutiva de las especies de este grupo, pues presentan significancia desde aspectos de interés económico para el humano, así

como el entendimiento en la evolución de los estilos de vida característicos del clado de los nemátodos.

La suposición de la neutralidad del genoma mitocondrial continúa siendo una razón para su uso en la estimación filogenética. En el caso de los nemátodos, hemos encontrado señales de selección positiva en diversos sitios a lo largo de los genes codificantes del genoma mitocondrial. De acuerdo con las pruebas de identificación de sitios con selección positiva realizadas mediante CODEML y HyPHY, así como la prueba de McDonald-Kreitman, puede notarse que la selección positiva juega un papel importante en la evolución del genoma mitocondrial. Contrario a lo visto en las secuencias de genes nucleares en los que se detectaron pocos sitios de selección positiva entre los genes utilizados en la reconstrucción filogenética.

Al estimar una filogenia con el uso exclusivo de los sitios que presentan estas señales de selección positiva es posible reconstruir la historia evolutiva de las secuencias mitocondriales completas. Esto puede deberse a que estos sitios que son seleccionados por ventajas adaptativas acarrear a los sitios adyacentes, en este caso toda la molécula mitocondrial, por lo que la historia de toda la molécula mitocondrial refleja la historia de los sitios adaptativos.

## **10. Perspectivas**

Para continuar con los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere la búsqueda de genes nucleares cuya función se encuentra ligada a las funciones mitocondriales. La historia evolutiva de estos genes nucleares puede ser similar a la historia mitocondrial. Se ha visto en análisis exploratorios que existen genes nucleares que comparten la topología filogenética mitocondrial.

El clado de los nemátodos es conocido por su amplia distribución y el amplio espectro de historias de vida e interacción que forma de manera global con diversos grupos animales. Por lo que están sujetos

a un diferencial de presiones selectivas, así como de dinámicas poblacionales. Como continuación, se podría recomendar la búsqueda de señales de selección dentro del grupo de nemátodos en aquellos grupos que presentan procesos de divergencia y especiación rápida.

## 11. Referencias bibliográficas

- Abascal, F., Zardoya, R., & Posada, D. (2005). ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, *21*(9), 2104–2105.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti263>
- Ballard, J. W. O., & Kreitman, M. (1995). Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends in Ecology & Evolution*, *10*(12), 485–488.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)89195-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89195-8)
- Ballard, J. W. O., & Pichaud, N. (2014). Mitochondrial DNA: More than an evolutionary bystander. *Functional Ecology*, *28*(1), 218–231.  
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.12177>
- Ballard, J. W. O., & Rand, D. M. (2005). The Population Biology of Mitochondrial DNA and Its Phylogenetic Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *36*(1), 621–642.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.091704.175513>
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, *13*(4), 729–744.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>
- Bangs, M. R., Douglas, M. R., Mussmann, S. M., & Douglas, M. E. (2018). Unraveling historical introgression and resolving phylogenetic discord within *Catostomus* (Osteichthys: Catostomidae). *BMC Evolutionary Biology*, *18*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1197-y>
- Baskaran, P., & Rödelberger, C. (2015). Microevolution of duplications and deletions and their impact on gene expression in the nematode *Pristionchus pacificus*. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–18.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131136>

- Bazin, E., Gle, S., & Galtier, N. (2006). Mitochondrial Genetic Diversity in Animals. *Science*, 312(April), 570–572.  
<https://doi.org/10.1126/science.1122033>
- Blaxter, M., & Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142, S26–S39.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182014000791>
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Llu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorrls, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., & Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392(6671), 71–75.  
<https://doi.org/10.1038/32160>
- Blaxter, M. L., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., & Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. 392(March).
- Breda, C. N. de S., Davanzo, G. G., Basso, P. J., Saraiva Câmara, N. O., & Moraes-Vieira, P. M. M. (2019). Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biology*, 26(June), 101255.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101255>
- Bronstein, O., Kroh, A., & Haring, E. (2018). Mind the gap! the mitochondrial control region and its power as a phylogenetic marker in echinoids. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1198-x>
- Burgarella, C., Barnaud, A., Kane, N. A., Jankowski, F., Scarcelli, N., Billot, C., Vigouroux, Y., & Berthouly-Salazar, C. (2019). Adaptive introgression: An untapped evolutionary mechanism for crop adaptation. *Frontiers in Plant Science*, 10(February), 1–17.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00004>
- Castoe, T. A., de Koning, A. P. J., Kim, H.-M., Gu, W., Noonan, B. P., Naylor,



- G., Jiang, Z. J., Parkinson, C. L., & Pollock, D. D. (2009). Evidence for an ancient adaptive episode of convergent molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), 8986–8991.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0900233106>
- Choleva, L., Musilova, Z., Kohoutova-sediva, A., Paces, J., Rab, P., & Janko, K. (2014). *Distinguishing between Incomplete Lineage Sorting and Genomic Introgressions : Complete Fixation of Allospecific Mitochondrial DNA in a Sexually Reproducing Fish ( Cobitis ; Teleostei ), despite Clonal Reproduction of Hybrids*. 9(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080641>
- Choleva, L., Musilova, Z., Kohoutova-Sediva, A., Paces, J., Rab, P., & Janko, K. (2014). Distinguishing between incomplete lineage sorting and genomic introgressions: Complete fixation of allospecific mitochondrial DNA in a sexually reproducing fish (Cobitis; Teleostei), despite clonal reproduction of hybrids. *PLoS ONE*, 9(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080641>
- Chou, J. Y., & Leu, J. Y. (2015). The Red Queen in mitochondria: Cytonuclear co-evolution, hybrid breakdown and human disease. *Frontiers in Genetics*, 6(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00187>
- Clark, K. A., Howe, D. K., Gafner, K., Kusuma, D., Ping, S., Estes, S., & Denver, D. R. (2012). Selfish little circles: Transmission bias and evolution of large deletion-bearing mitochondrial DNA in caenorhabditis briggsae nematodes. *PLoS ONE*, 7(7), 1–8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041433>
- Consuegra, S., John, E., Verspoor, E., & Leaniz, C. G. De. (2015). Patterns of natural selection acting on the mitochondrial genome of a locally adapted fish species. *Genetics Selection Evolution*, 1–10.  
<https://doi.org/10.1186/s12711-015-0138-0>
- Degnan, J. H., & Rosenberg, N. A. (2009). Gene tree discordance,

phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(6), 332–340.

<https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.01.009>

Durand, E. Y., Patterson, N., Reich, D., & Slatkin, M. (2011). Testing for ancient admixture between closely related populations. *Molecular Biology and Evolution*, 28(8), 2239–2252.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msr048>

Emms, D. M., & Kelly, S. (2015). OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biology*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0721-2>

Fisher-Reid, M. C., & Wiens, J. J. (2011). What are the consequences of combining nuclear and mitochondrial data for phylogenetic analysis? Lessons from *Plethodon* salamanders and 13 other vertebrate clades. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-300>

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299. <https://doi.org/10.1071/ZO9660275>

Franco, F. F., Lavagnini, I. S. C., Sene, F. M., & Manfrin, M. H. (2015). *Mito-nuclear discordance with evidence of shared ancestral polymorphism and selection in cactophilic species of Drosophila*. 197–210.

Funk, D. J., & Omland, K. E. (2003). Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 397–423.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>

Garg, S. G., & Martin, W. F. (2016). Mitochondria, the Cell Cycle, and the

Origin of Sex via a Syncytial Eukaryote Common Ancestor. *Genome Biology and Evolution*, 8(6), 1950–1970.

<https://doi.org/10.1093/gbe/evw136>

Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, M. H. Y., Hansen, N. F., Durand, E. Y., Malaspinas, A. S., Jensen, J. D., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Prüfer, K., Meyer, M., Burbano, H. A., ... Pääbo, S. (2010). A draft sequence of the neandertal genome. *Science*, 328(5979), 710–722. <https://doi.org/10.1126/science.1188021>

Greiner, S., Sobanski, J., & Bock, R. (2015). Why are most organelle genomes transmitted maternally? *BioEssays*, 37(1), 80–94. <https://doi.org/10.1002/bies.201400110>

Havird, J. C., Forsythe, E. S., Williams, A. M., Werren, J. H., Dowling, D. K., & Sloan, D. B. (2019). Selfish Mitonuclear Conflict. *Current Biology*, 29(11), R496–R511. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.020>

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>

Heled, J., Bouckaert, R., Drummond, A. J., & Xie, W. (2013). \* BEAST in BEAST 2 . 0 Estimating Species Trees from Multilocus Data. *PLoS Computational Biology*, 1–18.

Hill, G. E. (2015). Mitonuclear ecology. *Molecular Biology and Evolution*, 32(8), 1917–1927. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv104>

Hill, G. E. (2016). Mitonuclear coevolution as the genesis of speciation and

- the mitochondrial DNA barcode gap. *Ecology and Evolution*, 6(16), 5831–5842. <https://doi.org/10.1002/ece3.2338>
- Hill, G. E. (2019). Reconciling the Mitonuclear Compatibility Species Concept with Rampant Mitochondrial Introgression. *Integrative and Comparative Biology*, 59(4), 912–924. <https://doi.org/10.1093/icb/icz019>
- Hill, G. E., Havird, J. C., Sloan, D. B., Burton, R. S., Greening, C., & Dowling, D. K. (2018). Assessing the fitness consequences of mitonuclear interactions in natural populations. *Biological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/brv.12493>
- Hood, W. R., Austad, S. N., Bize, P., Jimenez, A. G., Montooth, K. L., Schulte, P. M., Scott, G. R., Sokolova, I., Treberg, J. R., & Salin, K. (2018). The mitochondrial contribution to animal performance, adaptation, and life-history variation. *Integrative and Comparative Biology*, 58(3), 480–485. <https://doi.org/10.1093/icb/icy089>
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hurst, G. D. D., & Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: The effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525–1534. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3056>
- Ivanov, V., Lee, K. M., & Mutanen, M. (2018). Mitonuclear discordance in wolf spiders: Genomic evidence for species integrity and introgression. *Molecular Ecology*, 27(7), 1681–1695. <https://doi.org/10.1111/mec.14564>
- James, J. E., Piganeau, G., & Eyre-Walker, A. (2016a). The rate of adaptive evolution in animal mitochondria. *Molecular Ecology*, 25(1), 67–78. <https://doi.org/10.1111/mec.13475>

- James, J. E., Piganeau, G., & Eyre-Walker, A. (2016b). The rate of adaptive evolution in animal mitochondria. *Molecular Ecology*, *25*(1), 67–78.  
<https://doi.org/10.1111/mec.13475>
- Jiang, J., Yu, J., Li, J., Li, P., Fan, Z., Niu, L., Deng, J., Yue, B., & Li, J. (2016). Mitochondrial genome and nuclear markers provide new insight into the evolutionary history of macaques. *PLoS ONE*, *11*(5), 1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154665>
- John, U., Lu, Y., Wohlrab, S., Groth, M., Janouškovec, J., Kohli, G. S., Mark, F. C., Bickmeyer, U., Farhat, S., Felder, M., Frickenhaus, S., Guillou, L., Keeling, P. J., Moustafa, A., Porcel, B. M., Valentin, K., & Glöckner, G. (2019). An aerobic eukaryotic parasite with functional mitochondria that likely lacks a mitochondrial genome. *Science Advances*, *5*(4), 1–11.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aav1110>
- Karnkowska, A., Treitli, S. C., Brzoň, O., Novák, L., Vacek, V., Soukal, P., Barlow, L. D., Herman, E. K., Pipaliya, S. V., Pánek, T., Žihala, D., Petrželková, R., Butenko, A., Eme, L., Stairs, C. W., Roger, A. J., Eliáš, M., Dacks, J. B., Hampl, V., & Battistuzzi, F. U. (2019). The Oxymonad Genome Displays Canonical Eukaryotic Complexity in the Absence of a Mitochondrion. *Molecular Biology and Evolution*, *36*(10), 2292–2312.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msz147>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, *30*(14), 3059–3066.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kenyon, L., & Moraes, C. T. (1997). Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomitochondrial cybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(17), 9131–9135.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9131>

- Klucnika, A., & Ma, H. (2019). A battle for transmission: The cooperative and selfish animal mitochondrial genomes. *Open Biology*, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.1098/rsob.180267>
- Koonin, E. V. (2010). The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biology*, 11(5). <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-209>
- Kosakovsky Pond, S. L., Frost, S. D. W., & Muse, S. V. (2005). HyPhy: Hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*, 21(5), 676–679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti079>
- Lane, N., & Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, 467(7318), 929–934. <https://doi.org/10.1038/nature09486>
- Liu, G. H., Nadler, S. A., Liu, S. S., Podolska, M., D’Amelio, S., Shao, R., Gasser, R. B., & Zhu, X. Q. (2016). Mitochondrial phylogenomics yields strongly supported hypotheses for ascaridomorph nematodes. *Scientific Reports*, 6(December), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep39248>
- Liu, L., Yu, L., Kubatko, L., Pearl, D. K., & Edwards, S. V. (2009). Coalescent methods for estimating phylogenetic trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(1), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.05.033>
- Mackiewicz, P., Urantówka, A. D., Krocak, A., & Mackiewicz, D. (2019). Resolving Phylogenetic Relationships within Passeriformes Based on Mitochondrial Genes and Inferring the Evolution of Their Mitogenomes in Terms of Duplications. *Genome Biology and Evolution*, 11(10), 2824–2849. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz209>
- Margulis, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 255–274. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11541390>
- Martin, S. H., Davey, J. W., & Jiggins, C. D. (2014). Evaluating the Use of ABBA – BABA Statistics to Locate Introgressed Loci. 32(1), 244–257. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu269>

- McGuire, J. A., Linkem, C. W., Koo, M. S., Hutchison, D. W., Lappin, A. K., Orange, D. I., Lemos-Espinal, J., Riddle, B. R., & Jaeger, J. R. (2007). Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: Phylogenetics of crotophytid lizards. *Evolution*, *61*(12), 2879–2897. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00239.x>
- Mendes, F. K., Hahn, Y., & Hahn, M. W. (2016). Gene tree discordance can generate patterns of diminishing convergence over time. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(12), 3299–3307. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw197>
- Morales, H. E., Pavlova, A., Joseph, L., & Sunnucks, P. (2015). Positive and purifying selection in mitochondrial genomes of a bird with mitonuclear discordance. *Molecular Ecology*, *24*(11), 2820–2837. <https://doi.org/10.1111/mec.13203>
- Mossman, J. A., Biancani, L. M., Zhu, C. T., & Rand, D. M. (2016). Mitonuclear epistasis for development time and its modification by diet in *Drosophila*. *Genetics*, *203*(1), 463–484. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.187286>
- Mossman, J. A., Tross, J. G., Li, N., Wu, Z., & Rand, D. M. (2016). Mitochondrial-nuclear interactions mediate sex-specific transcriptional profiles in *Drosophila*. *Genetics*, *204*(2), 613–630. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.192328>
- Ngatia, J. N., Lan, T. M., Dinh, T. D., Zhang, L., Ahmed, A. K., & Xu, Y. C. (2019). Signals of positive selection in mitochondrial protein-coding genes of woolly mammoth: Adaptation to extreme environments? *Ecology and Evolution*, *9*(12), 6821–6832. <https://doi.org/10.1002/ece3.5250>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*, *148*(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>

- Pamilo, P., & Nei, M. (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5(5), 568–583.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040517>
- Papakostas, S., Michaloudi, E., Proios, K., Brehm, M., Verhage, L., Rota, J., Peña, C., Stamou, G., Pritchard, V. L., Fontaneto, D., & Declerck, S. A. J. (2016). Integrative taxonomy recognizes evolutionary units despite widespread mitonuclear discordance: Evidence from a rotifer cryptic species complex. *Systematic Biology*, 65(3), 508–524.  
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syw016>
- Park, J. K., Sultana, T., Lee, S. H., Kang, S., Kim, H. K., Min, G. S., Eom, K. S., & Nadler, S. A. (2011). Monophyly of clade III nematodes is not supported by phylogenetic analysis of complete mitochondrial genome sequences. *BMC Genomics*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-392>
- Parker, A., & Kornfield, I. (1997). Evolution of the mitochondrial dna control region in the mbuna (cichlidae) species flock of lake malawi, east africa. *Journal of Molecular Evolution*, 45(1), 70–83.  
<https://doi.org/10.1007/PL00006204>
- Pavlova, A., Gan, H. M., Lee, Y. P., Austin, C. M., Gilligan, D. M., Lintermans, M., & Sunnucks, P. (2017). Purifying selection and genetic drift shaped Pleistocene evolution of the mitochondrial genome in an endangered Australian freshwater fish. *Heredity*, 118(5), 466–476.  
<https://doi.org/10.1038/hdy.2016.120>
- Platt, R. N., Faircloth, B. C., Sullivan, K. A. M., Kieran, T. J., Glenn, T. C., Vandewege, M. W., Lee, T. E., Baker, R. J., Stevens, R. D., & Ray, D. A. (2018). Conflicting Evolutionary Histories of the Mitochondrial and Nuclear Genomes in New World Myotis Bats. *Systematic Biology*, 67(2), 236–249. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syx070>
- Poole, A. M., & Gribaldo, S. (2014). Eukaryotic origins: How and when was



the mitochondrion acquired? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(12), 1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015990>

Radzvilavicius, A. L., & Blackstone, N. W. (2015). Conflict and cooperation in eukaryogenesis: Implications for the timing of endosymbiosis and the evolution of sex. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(111). <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0584>

Rand, D. M., Dorfsman, M., & Kann, L. M. (1994). Neutral and non-neutral evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics*, 138(3), 741–756.

Rand, David M. (2001). The units of selection on mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 414–228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-03354-1.50092-4>

Rand, David M. (2008). Mitigating mutational meltdown in mammalian mitochondria. *PLoS Biology*, 6(2), 0229–0232. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060035>

Rand, David M., & Mossman, J. A. (2020). Mitonuclear conflict and cooperation govern the integration of genotypes, phenotypes and environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 375(1790), 20190188. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0188>

Rougon-Cardoso, A., Flores-Ponce, M., Ramos-Aboites, H. E., Martíñez-Guerrero, C. E., Hao, Y. J., Cunha, L., Rodríguez-Martínez, J. A., Ovando-Vázquez, C., Bermúdez-Barrientos, J. R., Abreu-Goodger, C., Chavarría-Hernández, N., Simões, N., & Montiel, R. (2016). The genome, transcriptome, and proteome of the nematode *Steinernema carpocapsae*: Evolutionary signatures of a pathogenic lifestyle. *Scientific Reports*, 6(October), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep37536>

Rubinoff, D., & Holland, B. S. (2005). Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Systematic Biology*, 54(6), 952–961.

<https://doi.org/10.1080/10635150500234674>

- Scott, G. R., Schulte, P. M., Egginton, S., Scott, A. L. M., Richards, J. G., & Milsom, W. K. (2011). Molecular evolution of cytochrome c oxidase underlies high-altitude adaptation in the bar-headed goose. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(1), 351–363.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msq205>
- Sloan, D. B., Havird, J. C., & Sharbrough, J. (2017). The on-again, off-again relationship between mitochondrial genomes and species boundaries. *Molecular Ecology*, *26*(8), 2212–2236. <https://doi.org/10.1111/mec.13959>
- Smythe, A. B., Sanderson, M. J., & Nadler, S. A. (2006). Nematode small subunit phylogeny correlates with alignment parameters. *Systematic Biology*, *55*(6), 972–992. <https://doi.org/10.1080/10635150601089001>
- Som, A. (2014). Causes, consequences and solutions of phylogenetic incongruence. *Briefings in Bioinformatics*, *16*(3), 536–548.  
<https://doi.org/10.1093/bib/bbu015>
- Sommer, R. J., & Streit, A. (2011). Comparative Genetics and Genomics of Nematodes: Genome Structure, Development, and Lifestyle. *Annual Review of Genetics*, *45*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132417>
- Stojković, B., & Đorđević, M. (2017). Interaction between mitochondrial and nuclear genomes: the role in life-history evolution. *Biologia Serbica*, *39*(1), 32–40. <https://doi.org/10.5281/zenodo.826619>
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2012). Mitochondria and cell signalling. *Journal of Cell Science*, *125*(4), 807–815.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.099234>
- Takahashi, K., Terai, Y., Nishida, M., & Okada, N. (2001). Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of

- retrotransposons. *Molecular Biology and Evolution*, 18(11), 2057–2066.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003747>
- Toews, D. P. L., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, 21(16), 3907–3930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x>
- Vaidya, A. B., & Mather, M. W. (2009). Mitochondrial Evolution and Functions in Malaria Parasites. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 249–267. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073424>
- Viney, M. (2018). The genomic basis of nematode parasitism. *Briefings in Functional Genomics*, 17(1), 8–14. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elx010>
- Wade, M. J., & Drown, D. M. (2016). Nuclear–mitochondrial epistasis: a gene’s eye view of genomic conflict. *Ecology and Evolution*, 6(18), 6460–6472. <https://doi.org/10.1002/ece3.2345>
- Wernersson, R., & Pedersen, A. G. (2003). RevTrans: Multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3537–3539. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg609>
- Wiens, J. J., Kuczynski, C. A., & Stephens, P. R. (2010). *Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles : implications for speciation and conservation*. 445–461.
- Yan, Z., Ye, G., & Werren, J. H. (2019). Evolutionary Rate Correlation between Mitochondrial-Encoded and Mitochondria-Associated Nuclear-Encoded Proteins in Insects. *Molecular Biology and Evolution*, 36(5), 1022–1036. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz036>
- Yang, Z. (2007). PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1586–1591. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm088>
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 303–314.

<https://doi.org/10.1038/nrg3186>

Yang, Z., Wong, W. S. W., & Nielsen, R. (2005). *Bayes Empirical Bayes Inference of Amino Acid Sites Under Positive Selection*. 22(4).

<https://doi.org/10.1093/molbev/msi097>

Zhang, F., & Broughton, R. E. (2013). Mitochondrial-nuclear interactions: Compensatory evolution or variable functional constraint among vertebrate oxidative phosphorylation genes? *Genome Biology and Evolution*, 5(10), 1781–1791. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt129>

Zhang, W., Dasmahapatra, K. K., Mallet, J., Moreira, G. R. P., & Kronforst, M. R. (2016). Genome-wide introgression among distantly related *Heliconius* butterfly species. *Genome Biology*, 17(1).

<https://doi.org/10.1186/s13059-016-0889-0>

Zink, R. M., & Barrowclough, G. F. (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. In *Molecular Ecology* (Vol. 17, Issue 9, pp. 2107–2121). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03737.x>

Zou, H., Jakovlić, I., Chen, R., Zhang, D., Zhang, J., Li, W. X., & Wang, G. T. (2017). The complete mitochondrial genome of parasitic nematode *Camallanus cotti*: Extreme discontinuity in the rate of mitogenomic architecture evolution within the Chromadorea class. *BMC Genomics*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4237-x>