

Instituto Politécnico de Setúbal
Escola Superior de Tecnologia do Barreiro

Hybrid origin of the Pliocene ancestor of wild goats

Afonso Vaz (202100995)

João Almeida (202100068)

João Venâncio (202100954)

Tiago Barão (202000215)

Trabalho apresentado no âmbito da unidade curricular de Análise de
Sequência Biológicas,
2º ano da Licenciatura em Bioinformática
Docente: Francisco Pina

Barreiro
Maio de 2023

Índice

Índice de Tabelas	2
Índice de Figuras.....	2
1. Introdução	3
2. Materiais e Métodos utilizados	5
3. Resultados	7
3.1 Análise das Árvores filogenéticas (mitocondriais e nucleares)	7
3.2 Posições discordantes para Capra entre as árvores mitocondriais e nucleares.....	16
3.3 Paralogia, seleção incompleta de linhagens ou hibridação interespecífica hibridação interespecífica?	16
4. Discussão	18
4.1 Introgessão antiga do mtDNA no antepassado comum dos cabras selvagens	18
4.2 Fluxo de genes com enviesamento sexual de Hemitragus para Capra	18
4.3 Seleção positiva para a introgessão do mtDNA	19
4.4 Comparação da nossa árvore com a árvore do paper	20
5. Referências	21

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Origem das sequências.....	6
---------------------------------------	---

Índice de Figuras

Figura 1 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene mitocondrial 12S.....	8
Figura 2- Figura 2 – Árvore Filogenética a partir da análise do gene mitocondrial CO2.	9
Figura 3 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene mitocondrial Cyb.	10
Figura 4 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene mitocondrial, ND1.	11
Figura 5- Árvore Filogenética a partir da análise do gene nuclear, kCas.	12
Figura 6 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene nuclear, PRKCI.	13
Figura 7 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene nuclear, SPTBN1.	14
Figura 8 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene nuclear, TG.....	15

1. Introdução

O estudo das sequências genéticas dos organismos tem sido uma área de investigação fundamental para compreender a evolução e a diversidade das espécies. Em particular, a análise de sequências de nucleótidos tem sido fundamental para descobrir as relações evolutivas entre diferentes populações e espécies. Neste artigo, centrar-nos-emos no estudo "Hybrid origin of the Pliocene ancestor of wild goats" e nas implicações que tem para a compreensão da evolução das cabras selvagens modernas.

Em 2019, a revista científica Science Advances publicou um estudo intitulado "Hybrid origin of the Pliocene ancestor of wild goats" que revelou uma descoberta surpreendente sobre as origens das cabras selvagens modernas.

Para resolver o problema da ancestralidade das cabras selvagens, os investigadores utilizaram técnicas avançadas de sequenciação genética para analisar 8 marcadores moleculares, incluindo quatro genes mitocondriais, sendo esses (*12S*, *CO2*, *Cyb*, *ND1*), e quatro segmentos de genes nucleares (*kCas*, *PRKCI*, *SPTBN1*, *TG*), e utilizaram os resultados para reconstruir as suas relações filogenéticas, chegando à finalidade que, ao contrário do que se pensava anteriormente, as cabras selvagens atuais não descendem de uma única espécie ancestral. Na realidade, as cabras selvagens atuais resultam de uma hibridização interespecífica entre duas espécies antigas e extintas de cabras selvagens, a *Ammotragus* (aoudad) e a espécie *Arabitragus* (Arabian tahr), distribuídas nas montanhas de África do Norte e da Arábia, respetivamente. Essas duas espécies divergiram e misturaram-se para formar o ancestral das cabras selvagens modernas, que viveu durante a época Plioceno, entre 2,1 a 6,6 milhões de anos atrás. Essa descoberta tem implicações importantes para a compreensão da evolução das cabras selvagens, pois sugere que o hibridismo pode ter desempenhado um papel importante na diversificação e adaptação das espécies em estudo. Além disso, a identificação das espécies ancestrais das cabras selvagens modernas pode ajudar na sua preservação, uma vez que a compreensão da ancestralidade pode orientar decisões sobre a gestão de populações e a conservação de espécies ameaçadas.

Nos materiais e métodos do artigo original, fizeram um estudo com a amostra taxonómica que inclui 18 espécies caprinas, com pelo menos um membro de cada um dos 13 géneros.

Os quatro segmentos de genes nucleares estão localizados em diferentes cromossomas humanos: 4 para *Cas*, 3 para *PRKCI*, 2 para *SPTBN1* e 8 para *TG*. De

acordo com os dados apresentados, pelo menos três dos quatro segmentos de genes nucleares utilizados neste estudo são marcadores filogenéticos não ligados. Todas as amostras de DNA foram extraídas como indicado em estudos anteriores, com o uso de PCR. Para isto foi usado um sequenciador CEQ2000 Beckman (v4.3.9), onde a saída resultante foi editada utilizando o Sequencher 4.5

Na árvore filogenética, os alinhamentos de DNA foram realizados com o Sequence Alignment Editor Version 2.0 alpha 11. Análises filogenéticas foram realizadas nos conjuntos de dados mitocondriais e nucleares, e em cada um dos oito marcadores separadamente, onde usaram o Método da Máxima Parcimônia (MP) que foram conduzidas no PAUP 3.1.1 (SwoVord, 1993) e métodos Bayesianos que foram realizadas usando o MrBayes 3.1 aplicando o modelo de evolução de sequência selecionado pelo MrModeltest 2.2. Os modelos são GTR+I+ para *12S* e *Cyb*, GTR+I para *Cas*, HKY+I+ para *CO2* e *ND1*, HKY+ para *PRKCI*, K80+ para *SPTBN1* e *TG* e GTR+I+. A robustez dos nós foram estimadas, primeiro, pelas probabilidades posteriores bayesianas (PP), e segundo, pelas percentagens de bootstrap bayesianas (BPB). Para a análise de bootstrap bayesiano, 100 pseudorréplicas da matriz foram criadas usando SEQBOOT 3.5c, e os valores foram obtidos construindo o consenso das 100 árvores bayesianas com CONSENSE 3.5c. Usaram também a datação molecular, onde os tempos de divergência foram calculados usando o método de relógio molecular bayesiano relaxado implementado no Multidivtime.

Neste trabalho, o nosso objetivo é analisar as sequências nucleotídicas das cabras selvagens modernas e compará-las com as sequências das suas espécies ancestrais. De seguida, iremos então proceder à análise da árvore filogenética do artigo original e comparar com os resultados obtidos nos nossos estudos, com a finalidade de compreender profundamente as relações evolutivas entre as espécies sujeitas e o papel que a hibridação pode ter desempenhado na sua evolução. Em última análise, esperamos que o nosso trabalho contribua para uma maior compreensão da evolução e diversidade das cabras selvagens e ajude na sua conservação e gestão.

Assim, o estudo "Hybrid origin of the Pliocene ancestor of wild goats" fornece informações valiosas sobre a evolução das cabras selvagens e destaca a importância da análise genética avançada na compreensão da diversidade biológica e na preservação das espécies.

2. Materiais e Métodos utilizados

No âmbito deste trabalho, foram utilizados vários materiais auxiliares, de modo a chegarmos ao objetivo deste estudo, sendo esse obter a árvore filogenética das diferentes espécies estudadas no artigo original, com a finalidade de comparar essa com a árvore filogenética do artigo.

Primeiro, para a obtenção das sequências a serem estudadas, foi utilizado um código de python obtido anteriormente pela realização do Homework. Já com as sequências obtidas, podemos passar para o próximo passo, que seria reproduzir (ou melhorar) as análises efetuadas no artigo original.

Foram analisados oito marcadores moleculares, incluindo quatro genes mitocondriais - 12S rRNA (958nt em *Ovis aries*), subunidade II do citocromo oxidase (CO2, 582nt), citocromo b (*Cyb*, 1140nt), e a subunidade I da NADH desidrogenase (*ND1*, 1008nt) - e quatro segmentos de genes nucleares - exão 4 da -caseína (*Cas*, 406nt em *O. aries*), intrão 1 do gene da proteína quinase C iota gene (*PRKCI*, 513 nt em *O. aries*), o intrão 1 do gene-spectrina não eritrocítica 1 (*SPTBN1*, 576 nt em *O. aries*), e regiões do intrão e do exão do gene da tiroglobulina (*TG*, 814 nt em *O. aries*). Os marcadores nucleares *kCas* e *PRKCI* foram escolhidos porque a maioria das sequências já estavam disponíveis nas bases de dados de nucleótidos (Tabela 1). Os outros dois marcadores nucleares, ou seja, *SPTBN1* e *TG*, foram escolhidos porque as sequências produzidas por Matthee et al. (2001) para *Capra hircus*, *Ovibos moschatus* e *O. aries*, revelaram indels (inserções e deleções) potencialmente interessantes.

Tabela 1 – Origem das sequências

Table 1
Origin of the sequences

Species	Collection reference	12S	CO2	Cyb	ND1	κ Cas	SPTBN1	PRKCI	TG
<i>Muntiacus reevesi</i>		NC_004069 ¹	NC_004069 ¹	NC_004069 ¹	NC_004069 ¹	U37509 ¹²	AF165678 ¹¹	AF165677 ¹¹	AF165682 ¹¹
<i>Bos indicus</i>		NC_005971 ²	NC_005971 ²	NC_005971 ²	NC_005971 ²	AY367769 ¹³	AF165718 ¹¹	AF165717 ¹¹	AF165722 ¹¹
<i>Aepyceros melampus</i>	PhC 20, SSM, MNHN	M86496 ⁹	AY689194 ³	AF036289 ⁵	DQ236320*	AY121998 ¹⁴	AF165782 ¹¹	AF165781 ¹¹	AF165786 ¹¹
<i>Damaliscus pygargus</i>	DDV1, F. Claro, Vincennes Zoo, MNHN	M86499 ⁹	AY689195 ³	AF036287 ⁵	DQ236321*	AY122002 ¹⁴	DQ236280*	AY846794 ⁴	AF165778 ¹¹
<i>Hippotragus niger</i>	HNVI, F. Claro, Vincennes Zoo, MNHN	AY670653 ⁷	AY846771 ⁴	AF036285 ⁵	DQ236322*	AY122001 ¹⁴	DQ236281*	AY846795 ⁴	AF165746 ¹¹
<i>Ammotragus lervia</i>	ZA 0034, Vincennes Zoo, MNHN	AY670654 ⁷	AY846772 ⁴	AF034731 ⁶	DQ236323*	AY670670 ⁷	DQ236282*	AY846803 ⁴	DQ236302*
<i>Buborcas taxicolor</i>	CG 1902-409, MNHN	AY670655 ⁷	AY846773 ⁴	AY669320 ⁷	DQ236324*	AY670671 ⁷	DQ236283*	AY846811 ⁴	DQ236303*
<i>Capra falconeri</i>	Cyto 01-214, MNHN	AY670656 ⁷	AY846774 ⁴	AF034736 ⁶	DQ236325*	AY670672 ⁷	DQ236284*	AY846797 ⁴	DQ236304*
<i>Capra ibex</i>	Cyto 02-037, MNHN	AY846815 ⁴	AY846775 ⁴	AF034735 ⁶	DQ236326*	AF525023 ¹⁵	DQ236285*	AY846798 ⁴	DQ236305*
<i>Capra nubiana</i>	J.L. Berthier, Ménagerie, MNHN	AY670657 ⁷	AY846776 ⁴	AF034740 ⁶	DQ236327*	AY670673 ⁷	DQ236286*	AY846799 ⁴	DQ236306*
<i>Capra sibirica</i>	J.L. Berthier, Ménagerie, MNHN	AY670658 ⁷	AY846777 ⁴	AF034734 ⁶	DQ236328*	AY670674 ⁷	DQ236287*	AY846800 ⁴	DQ236307*
<i>Hemitragus jemlahicus</i>	J.L. Berthier, Ménagerie, MNHN	AY670659 ⁷	AY846780 ⁴	AF034733 ⁶	DQ236329*	AY670675 ⁷	DQ236288*	AY846801 ⁴	DQ236308*
<i>Arabitragus jayakari</i>	J.M. Mwanzia, HH Sheikh Zayed – Private Department - UAE	AY846816 ⁴	AY846779 ⁴	AY846791 ⁴	DQ236330*	DQ236300*	DQ236289*	AY846804 ⁴	DQ236309*
<i>Nilgiritragus hylocrius</i>	CG 1935-402, MNHN	AY846817 ⁴	AY846778 ⁴	AY846792 ⁴	DQ236331*	DQ236301*	DQ236290*	AY846808 ⁴	DQ236310*
<i>Naemorhedus sumatraensis</i>	CG 1993-4240, MNHN	AY670660 ⁷	AY846781 ⁴	AY669321 ⁷	DQ236332* ^o	AY670676 ⁷	DQ236291*	AY846812 ⁴	DQ236311*
<i>Oreamnos americanus</i>	Cyto 02-547, MNHN	AY670661 ⁷	AY846782 ⁴	AF190632 ⁸	DQ236333*	AY670677 ⁷	DQ236292*	AY846814 ⁴	DQ236312*
<i>Ovibos moschatus</i>	M98105, P.S. Barboza - Alaska	AY670662 ⁷	AY846783 ⁴	AY669322 ⁷	DQ236334*	AY670678 ⁷	DQ236293*	AY846813 ⁴	DQ236313*
<i>Ovis aries</i>	JCT1, J.C. Thibault – Corsica, France	AY670663 ⁷	AY846785 ⁴	AF034730 ⁶	DQ236335*	AY670679 ⁷	DQ236294*	AY846806 ⁴	DQ236314*
<i>Ovis dalli</i>	CG 1938-124, MNHN	AY670664 ⁷	AY846786 ⁴	AF034728 ⁶	DQ236336*	AY670680 ⁷	DQ236295*	AY846807 ⁴	DQ236315*
<i>Pantholops hodgsonii</i>	CG 1993-4237, MNHN	AF400659 ¹⁰	AY846787 ⁴	AF034724 ⁶	DQ236340*	AY670681 ⁷	DQ236299*	AY846796 ⁴	DQ236319*
<i>Pseudois nayaur</i>	M9407, JL Berthier, Ménagerie, MNHN	AY670665 ⁷	AY846788 ⁴	AF034732 ⁶	DQ236337*	AY670682 ⁷	DQ236296*	AY846802 ⁴	DQ236316*
<i>Rupicapra pyrenaica</i>	ONF, B. Guiffond, Pyrénées, France	AY846818 ⁴	AY846789 ⁴	AF034726 ⁶	DQ236338*	DQ236341*	DQ236297*	AY846810 ⁴	DQ236318*
<i>Rupicapra rupicapra</i>	Cyto 01-175, MNHN	AY670666 ⁷	AY846790 ⁴	AF034725 ⁶	DQ236339*	D32182 ¹⁶	DQ236298*	AY846809 ⁴	DQ236317*

*Present study; ¹Zhang et al. Unpublished; ²Miretti et al. Unpublished; ³Hassanin and Ropiquet (2004); ⁴Ropiquet and Hassanin (2005b); ⁵Hassanin and Douzery (1999a); ⁶Hassanin et al. (1998a); ⁷Ropiquet and Hassanin (2005a); ⁸Hassanin and Douzery (2000); ⁹Allard et al. (1992); ¹⁰Kuznetsova and Kholodova (2002); ¹¹Matthee et al. (2001); ¹²Cronin et al. (1996); ¹³Aravindakshan and James Unpublished; ¹⁴Hassanin and Douzery (2003); ¹⁵Jann et al. (2004); ¹⁶Chikuni et al. (1995); ^o*Naemorhedus crispus* Cyto 01-154.

Para a realização desta árdua tarefa, houve vários softwares a serem utilizados, sendo esses:

O alinhamento de sequências de DNA de diferentes espécies de cabras selvagens foi realizado com o software MAFFT (v7.490), de modo a conseguirmos comparar as diferenças/semelhanças nestas sequências de nucleótidos entre elas.

A identificação/comparação dos diferentes modelos de evolução foi realizada com o auxílio do MODELTEST-NG (v0.1.7), selecionando o modelo que melhor se adeque para as sequências de nucleótidos usadas na análise filogenética, com base em estatísticas como o critério AIC.

O estudo da inferência filogenética baseada num *maximum likelihood* para construir a árvore filogenética a partir do alinhamento das sequências e do modelo de evolução selecionado foi realizado com o software RAxML-NG (v1.1).

De seguida, procedeu-se para a visualização do alinhamento das sequências, com a finalidade de identificar regiões que são altamente semelhantes entre diferentes espécies ou indivíduos (conservadas) e regiões que são divergentes ou variáveis (não conservadas). Este passo foi completado a partir da utilização do software AliView (v1.28).

A construção da árvore filogenética a partir do alinhamento das sequências e do modelo de evolução selecionado foi efetuado com o auxílio do MrBayes (v3.2.7a).

Por fim, o software Toytree (v2.0.1) possibilita-nos a visualização e análise de árvores filogenéticas, permitindo identificar diferenças e semelhanças entre as diferentes espécies de cabras selvagens, oferecendo uma variedade de recursos para a visualização interativa de árvores, incluindo a manipulação de nós, ramos e etiquetas, além de ferramentas para colorir, rotular e exportar árvores.

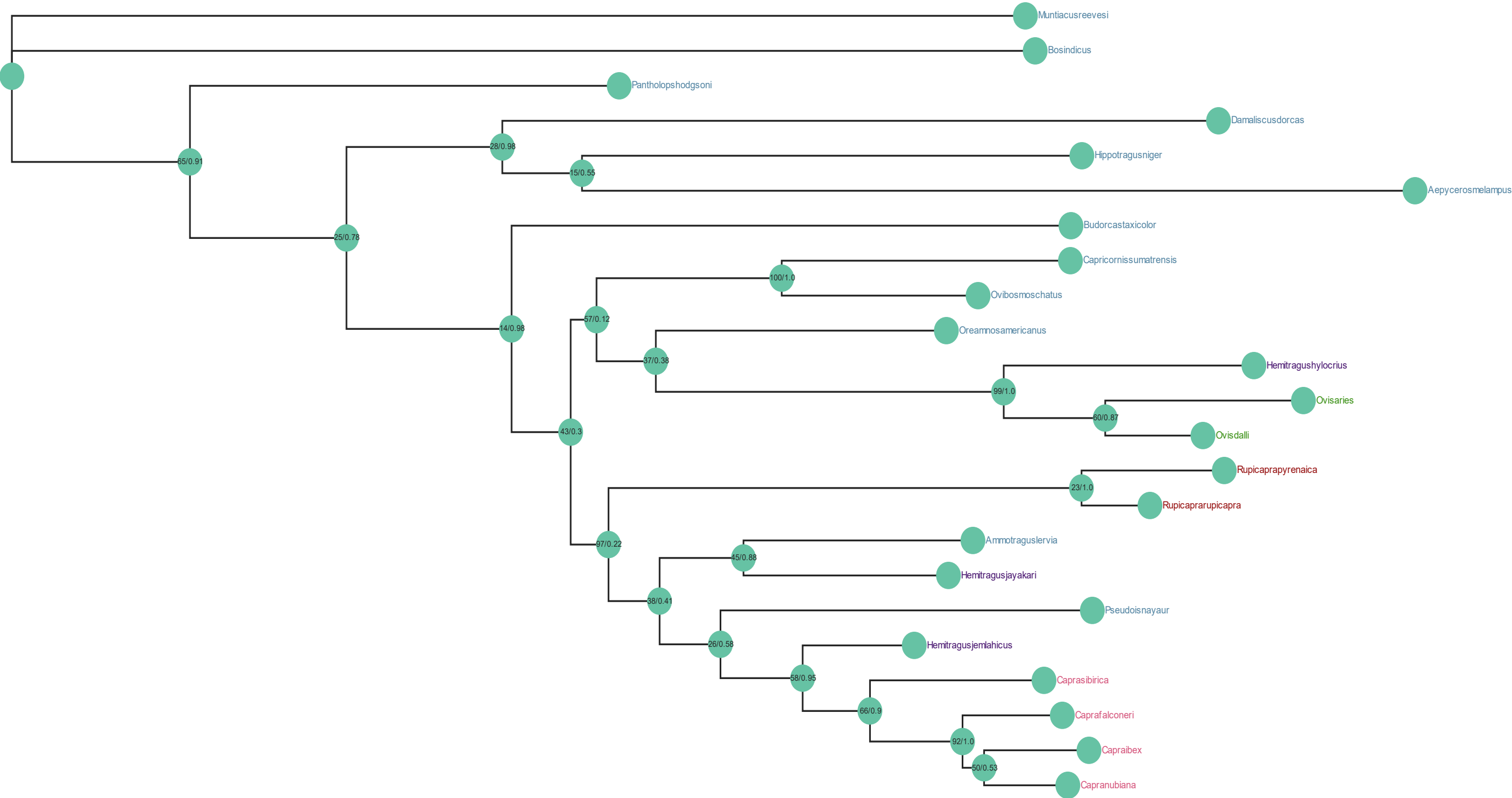
Esses métodos foram selecionados para o estudo "Hybrid origin of the Pliocene ancestor of wild goats" por serem considerados os mais adequados para a análise dos dados disponíveis. A utilização desses métodos permite uma análise mais precisa e confiável da filogenia das cabras selvagens e pode ser benéfico para o nosso trabalho, uma vez que nos permitirá comparar os resultados do estudo com os nossos próprios dados e identificar possíveis diferenças e semelhanças nas árvores filogenéticas geradas pelos diferentes métodos utilizados.

3. Resultados

3.1 Análise das Árvores filogenéticas (mitocondriais e nucleares)

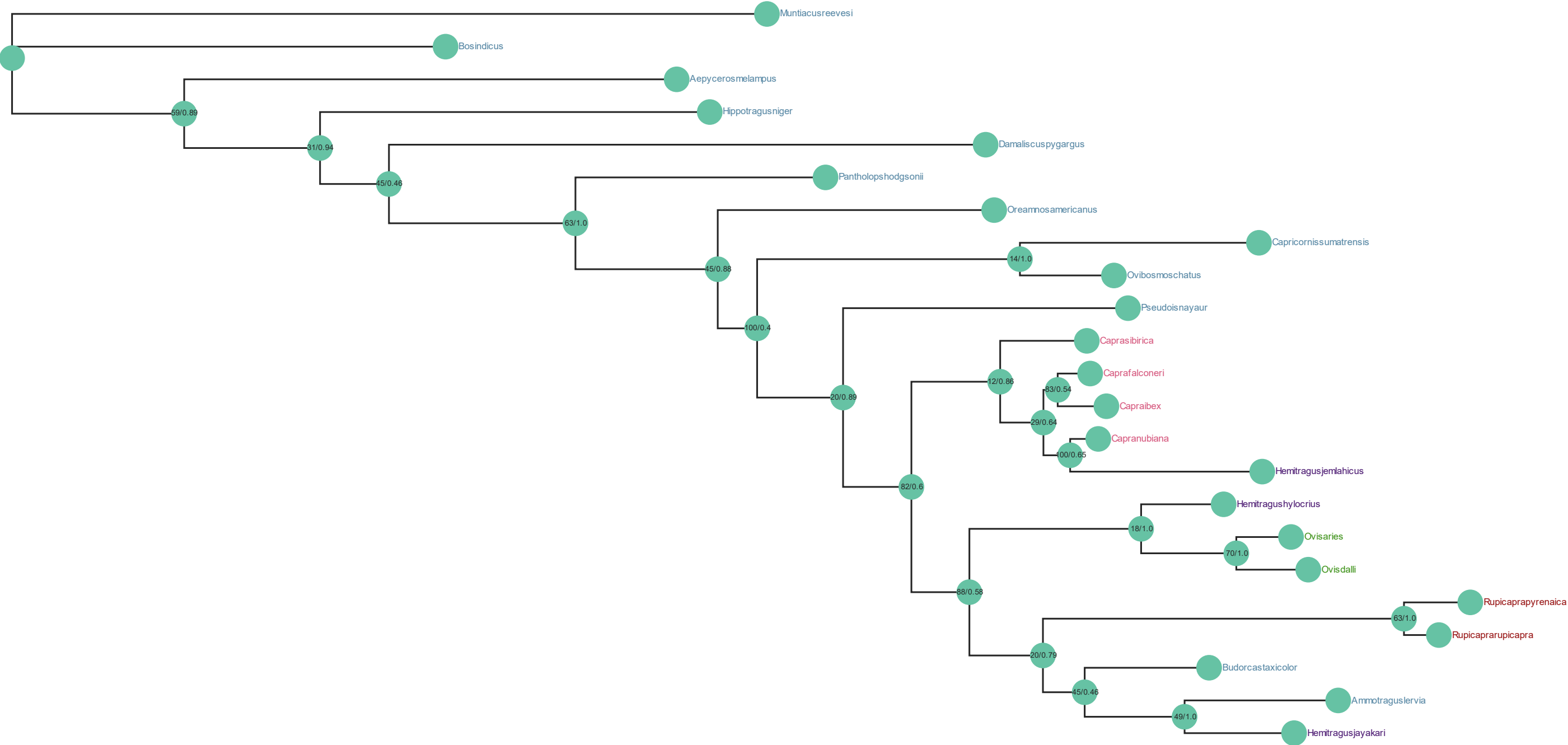
Nesta secção, apresentamos os resultados obtidos a partir da análise de sequências de oito genes (*12S*, *CO2*, *Cyb*, *NDI*, *kCas*, *PKRCI* e *SPTBN1*, *TG*) de diferentes espécies de cabras, de modo a comparar as árvores filogenéticas geradas a partir dessas sequências com as árvores representadas no artigo original “Hybrid origin of the Pliocene ancestor of wild goats”

Figura 1 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene mitocondrial 12S.



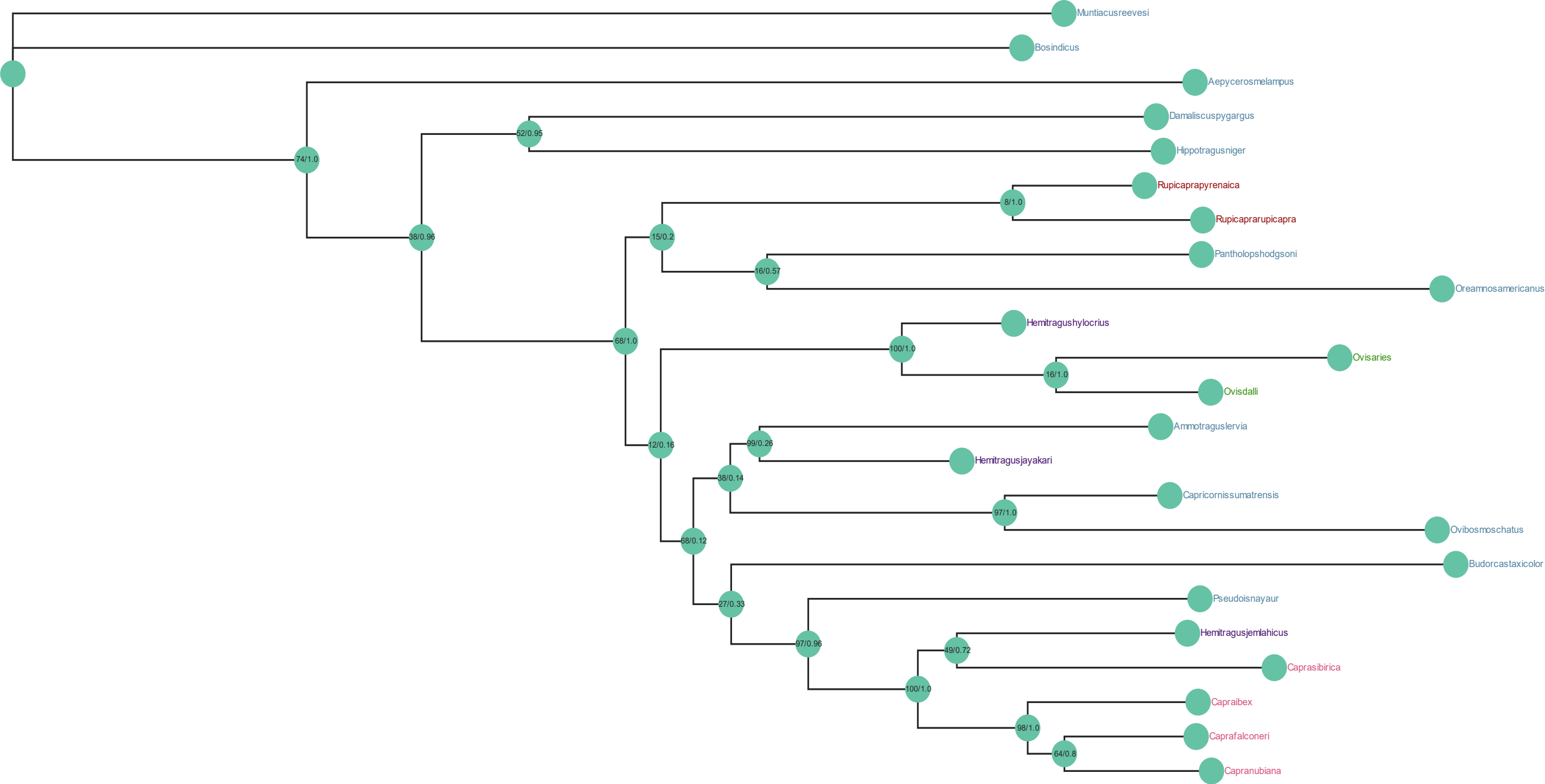
Na Figura 1 pode-se observar que um clade importante nesta árvore é o que contém os gêneros *Capri* (cabras) e *Ovis*, que inclui as espécies *Capricornissumatrensis* e a *Oribosmoschatus* apresentam um Bootstrap proportion (BP) e um Posterior Probability (PP) de 100/1.0, ou seja, este clade é suportado por valores elevados, indicando evidência absoluta de um ancestral comum entre estas 2 espécies.

Figura 2- Figura 2 – Árvore Filogenética a partir da análise do gene mitocondrial CO2.



Na figura 2, os gêneros *Ammotragus* e *Hemitragus* das espécies *Ammotragus lervia*, *Hemitragus jayakari* possui no nó da árvore filogenética um Bootstrap proportion (BP) e um Posterior Probability (PP) de 49/1.0. Isso significa que, de todas as árvores geradas pelo bootstrap, a relação filogenética que inclui esse nó apareceu em 49% das árvores. O valor do PP indica a confiança do suporte filogenético a partir da análise bayesiana, com um valor máximo de 1,0 indicando alta confiança. Portanto, o valor de 1,0 do PP indica que a relação filogenética estimada nesse nó é altamente suportada pelos dados observados.

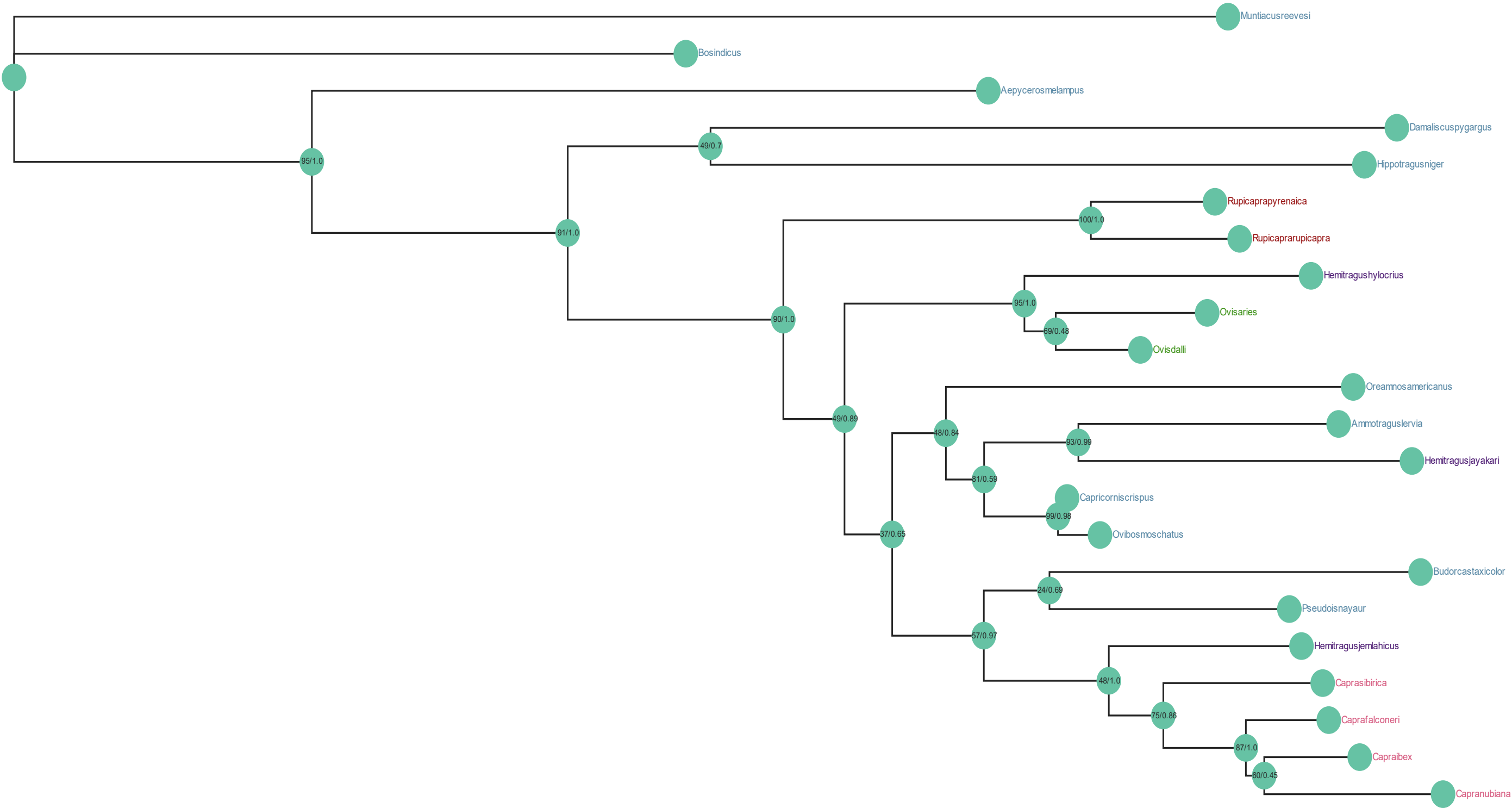
Figura 3 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene mitocondrial Cyb.



Na Figura 3 chegamos à conclusão que existe um clade importante nesta árvore é o que contém as espécies *Capri* (cabras) e *Ovis*, que inclui a *Capricornissumatrensis* e a *Ovibosmoschatus*. Com o raxml/mrbayes apresentou 97/1.0 de nível de confiança de que existe um ancestral comum às respectivas associações de cada espécie.

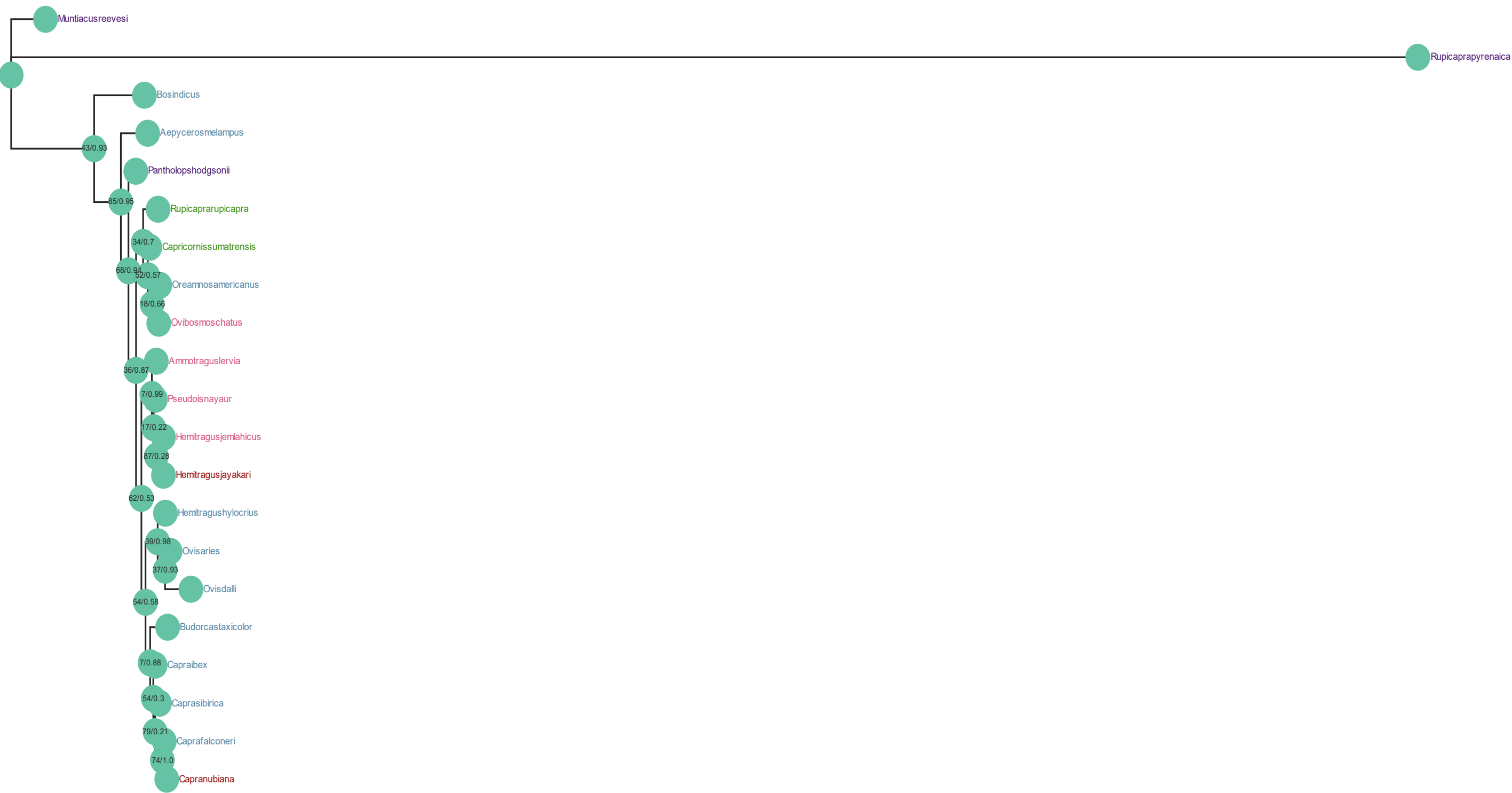
Conseguimos também identificar que existe um outgroup na parte superior da árvore, o *Muntiacusreevesi* que representa uma identidade mais afastada evolutivamente em relação às outras espécies.

Figura 4 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene mitocondrial, ND1.



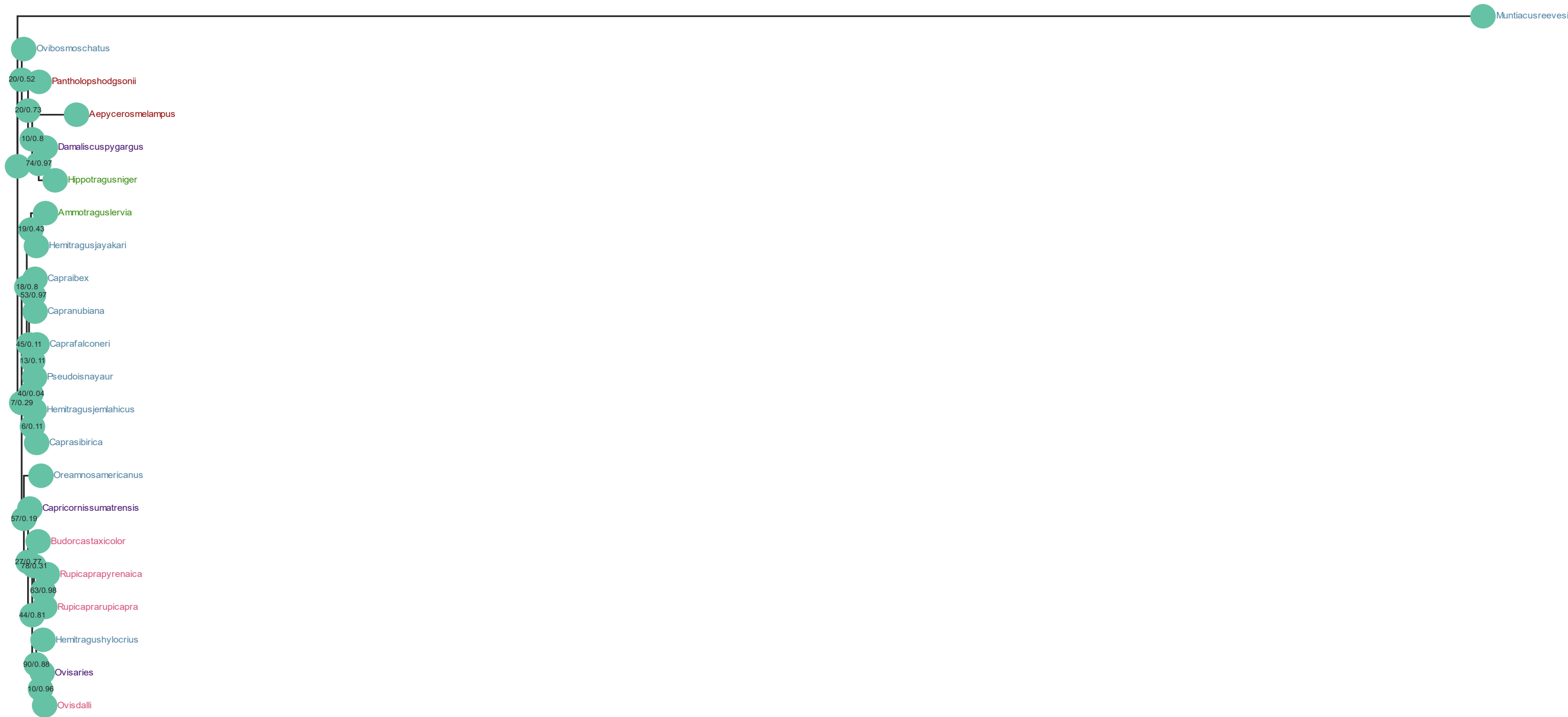
Na Figura 4, pode-se observar que a característica mais interessante desta árvore é um clade que contém os gêneros *Hemitragus* e *Ovis*, que inclui as espécies *Hemitragushylocrius*, *Ovisaries* e *Ovisdalli*. Este clade é suportado por valores de bootstrap elevados, pois têm um Bootstrap proportion (BP) e um Posterior Probability (PP) de 95/1.0, indicando evidência forte de um ancestral comum entre estas 2 espécies.

Figura 5- Árvore Filogenética a partir da análise do gene nuclear, *kCas*.



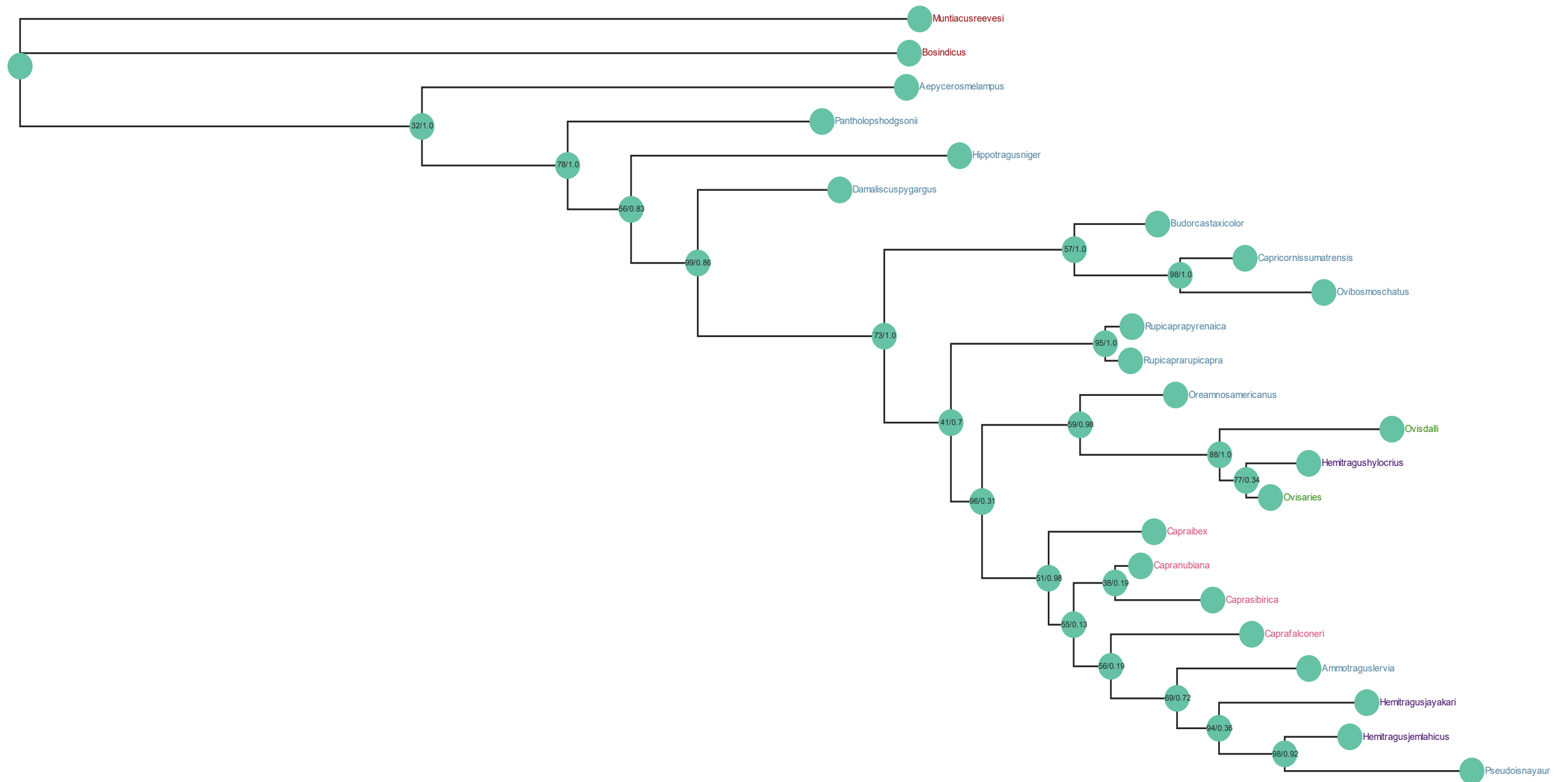
Na Figura 5, pode-se ver que, ao contrário da Figura 4, o mesmo clade que contém os gêneros *Hemitragus* e *Ovis*, que inclui a *Hemitragushylocrius*, a *Ovisaries* e a *Ovisdalli*., apresenta um valor de bootsrap baixo, indicando pouca evidência consoante um ancestral comum entre estes dois gêneros apresentados.

Figura 6 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene nuclear, PRKCI.



Na Figura 6, podemos observar que o clado do gêneros *Hemitragus* e da *Ovis*, que inclui as espécies *Hemitragushylocrius*, a *Ovisaries* e *Ovisdalli* têm um Bootstrap proportion (BP) e um Posterior Probability (PP) de 90/0.88, isto evidencia que existe um ancestral comum às respectivas associações de cada espécie. Esta figura ajuda a destacar que esta clade pode, de facto, ter um ancestral comum, sendo que já é a segunda figura a evidenciar um alto valor de bootstrap para esse clade. Apresenta também um clade com valores de Bootstrap proportion (BP) e um Posterior Probability (PP) muitos baixos 6/0.11 entre os géneros *Hemitragus* e *Capra*, da espécie *Capra sibirica* e da *Hemitragusjemlahicus*, isto pode indicar que a probabilidade de existir um acenstral comum é muito baixo entre estas espécies.

Figura 7 - Árvore Filogenética a partir da análise do gene nuclear, SPTBN1.



Na figura 7, podemos observar que nesta árvore nuclear existe um clade com valores baixos entre os gêneros *Damaliscus* e *Hippotragus* que inclui as espécies *Damaliscus lunatus* e *Hippotragus niger* têm um Bootstrap proportion (BP) e um Posterior Probability (PP) de 5/0.2, isto pode significar que probabilidade de existir um ancestral comum às respectivas associações de cada espécie é baixa. Em comparação ao clade do gênero *Ovis*, com as espécies *Ovis aries* e *Ovis dalli* apresentam 81/1.0, sendo que a chance de apresentar um ancestral comum entre estas espécies é mais alta.

A phylogenetic tree showing the relationships between various subfamilies of Caprinae. The tree is rooted on the left and branches out to the right. Bootstrap values are provided for many of the internal nodes. The taxa are color-coded: red for Bosindicus, Aepycerosmelampus, Damaliscuslunatus, and Aepycerosmelampus; purple for Hippotragusniger, Capricornissumatensis, Hemitragusjayakari, Hemitragusjemlahicus, Pseudoisnayaur, Rupicaprapyrenaica, Rupicaprarupicapra, Hemitragushylocrius, Ovisaries, and Ovisdalli; green for Pantholopshodgsonii, Budorcastaxicolor, Ovibosmoschatus, Ammotraguslervia, and Oreamnosamericanus; and blue for Caprafalconeri, Capraibex, Caprasibirica, Capranubiana, and Ovisaries.

```

graph LR
    Root(( )) --- Node1(( ))
    Node1 --- Bosindicus((Bosindicus))
    Node1 --- Node2(( ))
    Node2 --- Node3((7/0.21))
    Node2 --- Node4((19/1.0))
    Node3 --- Node5((5/0.2))
    Node3 --- Node6(( ))
    Node5 --- Damaliscuslunatus((Damaliscuslunatus))
    Node6 --- Aepycerosmelampus1((Aepycerosmelampus))
    Node6 --- Hippotragusniger((Hippotragusniger))
    Node4 --- Node7((38/0.19))
    Node4 --- Node8((20/0.44))
    Node7 --- Node9((86/0.24))
    Node7 --- Node10((8/0.94))
    Node9 --- Pantholopshodgsonii((Pantholopshodgsonii))
    Node9 --- Node11(( ))
    Node11 --- Budorcastaxicolor((Budorcastaxicolor))
    Node11 --- Node12(( ))
    Node12 --- Capricornissumatensis((Capricornissumatensis))
    Node12 --- Node13(( ))
    Node13 --- Ovibosmoschatus((Ovibosmoschatus))
    Node13 --- Ammotraguslervia((Ammotraguslervia))
    Node8 --- Node14((19/0.9))
    Node8 --- Node15((7/0.35))
    Node14 --- Node16((24/0.87))
    Node14 --- Node17(( ))
    Node16 --- Hemitragusjayakari((Hemitragusjayakari))
    Node16 --- Node18(( ))
    Node18 --- Hemitragusjemlahicus((Hemitragusjemlahicus))
    Node18 --- Pseudoisnayaur((Pseudoisnayaur))
    Node15 --- Node19((63/0.4))
    Node15 --- Node20((73/0.17))
    Node15 --- Node21(( ))
    Node19 --- Node22((46/0.25))
    Node19 --- Node23((4/0.32))
    Node22 --- Caprafalconeri((Caprafalconeri))
    Node22 --- Capraibex((Capraibex))
    Node23 --- Caprasibirica((Caprasibirica))
    Node23 --- Node24((16/0.17))
    Node24 --- Capranubiana((Capranubiana))
    Node21 --- Oreamnosamericanus((Oreamnosamericanus))
    Node20 --- Node25((53/1.0))
    Node20 --- Node26((21/0.39))
    Node25 --- Rupicaprapyrenaica((Rupicaprapyrenaica))
    Node25 --- Rupicaprarupicapra((Rupicaprarupicapra))
    Node26 --- Node27((13/0.71))
    Node26 --- Node28((81/1.0))
    Node27 --- Hemitragushylocrius((Hemitragushylocrius))
    Node27 --- Node29(( ))
    Node29 --- Ovisaries((Ovisaries))
    Node29 --- Ovisdalli((Ovisdalli))
  
```

3.2 Posições discordantes para Capra entre as árvores mitocondriais e nucleares

No artigo original é nos indicado que as inferências filogenéticas apresentam posições contraditórias para a *Capra* entre árvores mitocondriais e árvores nucleares.

Genes mitocondriais indicam que *Capra* e *Hemitragus* são relacionados, enquanto os genes nucleares indicam que *Capra* é um sister-group de um clade, contendo *Ammotragus*, *Arabitragus*, *Hemitragus* e *Pseudois*.

Ao analisarmos todas as árvores mitocondriais apresentadas anteriormente (Figura 1, Figura 2, Figura 3, e Figura 4), podemos ver que, tal como o artigo original, de facto as espécies *Capra* (*Caprasibirica*, *Caprafalconeri*, *Capraibex*, *Capranubiana*) e *Hemitragus* (*Hemitragusjemlahicus*) são relacionadas, sendo importante notar que só a *Hemitragusjemlahicus* é que se relaciona com a *Capra*, sendo que a *Hemitragushylocrius*, não apresenta nenhum relacionamento com as várias espécies *Capra* em todas as figuras de árvores mitocondriais apresentadas acima.

Em relação às árvores nucleares (Figura 5, Figura 6, Figura 7 e Figura 8), pode-se observar que, tal como o artigo original, de facto as espécies *Capra* não apresentam nenhuma relação com a *Hemitragus*. Por exemplo, na Figura 8, observa-se que no clade da espécie *Capra* incluindo *Capranubiana* e *Capasibirica*, apresentando os valores Bootstrap proportion (BP) e um Posterior Probability (PP) de 38/0.19 respectivamente. Visto que esses valores não suficientemente altos para considerar terem alguma relação com a *Hemitragus*, pode-se concluir que os nossos estudos concordam com as observações do artigo original.

3.3 Paralogia, seleção incompleta de linhagens ou hibridação interespecífica hibridação interespecífica?

Na Figura 3.D, do artigo original, pode-se observar que as espécies que contêm o genoma nuclear e mitocondrial são as *Ammotragus*, *Arabitragus*, *Pseudois* e *Hemitragus* e a *Capra*, porém, o genoma mitocondrial da *Capra* deriva do da *Hemitragus*,

Todos apresentam genoma nuclear, pois a linhagem da espécie *Capra* possui uma grande divergência do resto da linhagem das restantes espécies, como podemos ver em todas as nossas árvores filogenéticas nucleares. (*kCas*, *PRKCI*, *SPTBN1*, *TG*)

Para as mitocondriais, podemos observar que o genoma mitocondrial da *Capra* descende do genoma mitocondrial da *Hemitragus*, isto é, as espécies *Hemitragus* e *Capra* possuem uma linhagem de hibridação introgressiva, ou seja, ambas as espécies estão próximas entre si como se pode observar nas árvores filogenéticas mitocondriais (Figura 1, Figura 2, Figura 3, Figura 4).

4. Discussão

O problema principal do paper era mostrar que a hibridação interespecífica é um mecanismo para explicar a radiação adaptativa das espécies. O problema em si foi separado em três tópicos de estudo, no qual fizemos a discussão separadamente para esses três tópicos.

4.1 Introgessão antiga do mtDNA no antepassado comum dos cabras selvagens

Este tópico nos diz respeito a investigação da diversidade genética de espécies de cabras selvagens do gênero *Capra* e de uma espécie relacionada chamada *Hemitragus*. Os resultados indicaram que, em algum momento no passado, houve hibridização entre as duas linhagens, o que resultou em um intercâmbio de material genético mitocondrial (mtDNA) entre elas. Esse evento foi considerado excecional por envolver espécies de gêneros distintos e por ter ocorrido há muito tempo, durante o Plioceno, o que significa que todas as espécies de *Capra* atuais descendem de um ancestral que recebeu o mtDNA da espécie *Hemitragus*.

De acordo com as nossas árvores filogenéticas mitocondriais (12S, CO2, ND1, Cyb) é possível confirmar que houve, no passado, uma hibridização entre as linhagens da *Capra* e do *Hemitragus* da qual resultou uma troca recíproca de genes mitocondriais entre ambas as espécies. Podemos evidenciar isso, por exemplo, na nossa árvore filogenética do 12S, observando que a linhagem do *Hemitragus* e da *Capra* possuem o mesmo node.

4.2 Fluxo de genes com enviesamento sexual de *Hemitragus* para *Capra*

Os resultados do estudo do paper evidenciam a introgessão do mtDNA de *Hemitragus* na população de *Capra*, mas não houve sinais de introgessão nuclear. Dado que as fêmeas de *Hemitragus* acasalaram com machos de *Capra* para criar híbridos de fêmeas férteis e machos estéreis, é provável que a introgessão tenha sido unidirecional e sexualmente assimétrica. A fração de alelos nucleares de *Hemitragus* pode ter sido reduzida para metade em cada retrocruzamento consecutivo de fêmeas híbridas com machos de *Capra*, até que as populações apresentassem principalmente alelos nucleares de *Capra*, mantendo o genoma de mtDNA adquirido da mãe *Hemitragus*.

De acordo com a comparação das nossas árvores filogenéticas mitocondriais e nucleares podemos confirmar os resultados do estudo do paper, ou seja, por exemplo a nossa árvore filogenética mitocondrial, como referenciado anteriormente(12S), é possível visualizar que houve transferência de mtDNA da espécie do *Hemitragus* para a *Capra* uma vez que podemos observar que ambas as espécies possuem as *tip labels* próximas, demonstrando a introgressão. Em relação à árvore filogenética nuclear (*SPTBN1*) podemos também confirmar os resultados da investigação do paper, que nos indica que a *Capra* possui genes nucleares somente da *Capra*, dado que, ao observar a árvore podemos inferir que a espécie da *Capra* é um sister group de uma clade que contém dois grupos biogeográficos (*Hemitragus jemlahicus*, *Pseudois nayaur*, *Hemitragus jayakari*, *Ammotragus lervia*), ou seja, a node que separa a espécie *Capra* dos restantes 2 grupos possui um valor de PP demasiado baixo.

4.3 Seleção positiva para a introgressão do mtDNA

O tahr dos Himalaias e o *ibex* siberiano, duas espécies de animais que coexistem actualmente nas regiões simpátricas dos planaltos dos Himalaias, são o tema da discussão deste tópico. Os progenitores destas duas espécies podem ter-se cruzado num passado distante, dando origem à espécie *Capra*. Os autores colocam a hipótese de a rápida radiação adaptativa da *Capra* ter beneficiado da transferência de mitocôndrias "estrangeiras" perfeitamente adaptadas à atividade física em condições de hipoxia e hipotermia, permitindo a esta nova espécie estabelecer-se nas montanhas. Conforme a nossa árvore filogenética mitocondrial CO2 podemos confirmar os resultados deste tópico, dado que, ao observar a árvore é possível inferir que a *Capra nubiana* e o *Hemitragus jemlahicus* compartilham o mesmo node, para além disso, possui um valor de PP elevado, indicando uma alta chance de terem-se cruzado no passado.

4.4 Comparação da nossa árvore com a árvore do paper

A árvore filogenética A(mitocondrial) da Fig.2 do paper, está maioritariamente idêntica à árvore obtida para o gene mitocondrial 12S, mostrando uma proximidade entre as espécies *Capra falconeri*, nubiana e *ibex* e um ligeiro distanciamento da *Capra sibirica*. Na comparação da árvore filogenética B(nuclear) deparamo-nos com semelhanças parciais em relação à árvore *kCas*, que indica que *Capra* nubiana e *falconeri* são espécies próximas e a *Capra* *ibex* e *sibirica* são outras duas espécies próximas.

5. Referências

amkozlov. (s.d.). *GitHub - amkozlov/raxml-ng: RAxML Next Generation: faster, easier-to-use and more flexible*. Obtido de GitHub: <https://github.com/amkozlov/raxml-ng>

MrBayes. (s.d.). Obtido de MrBayes | index: <https://mrbayes.sourceforge.net/Help/sumt.html>

NBISweden. (s.d.). *GitHub - NBISweden/MrBayes: MrBayes is a program for Bayesian inference and model choice across a wide range of phylogenetic and evolutionary models*. Obtido de GitHub: <https://github.com/NBISweden/MrBayes>

Welcome to Toytree — *toytree documentation*. (s.d.). Obtido de Welcome to Toytree — toytree documentation: <https://toytree.readthedocs.io/en/latest/index.html>

Repositório do GitHub

https://github.com/jonnymoretti/Assignment1_ASB