



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA DE LA
FAMILIA BOVIDAE UTILIZANDO
HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS**

**PHILOGENETIC RECONSTRUCTION OF THE
FAMILY BOVIDAE USING BIOINFORMATIC
TOOLS**

Autor: Victoria Viñuela García

Tutor: Luis E. Sáenz de Miera y Carnicer

GRADO EN BIOLOGÍA

Julio, 2023

Índice

1. Introducción	1
2. Materiales y métodos	3
2.1 Taxones utilizados y obtención de secuencias	3
2.2 Alineamiento de secuencias	3
2.3 Construcción de los árboles filogenéticos	4
2.4 Comprobación de reloj molecular	5
3. Resultados	6
3.1 Árboles filogenéticos de <i>COXI</i> y <i>CytB</i>	6
3.2 Resultados de los test de reloj molecular	9
3.3 Árboles con tiempos de divergencia	10
4. Discusión	21
4.1 Comparación de los árboles filogenéticos con otras investigaciones	21
4.2 Reloj molecular	23
4.3 <i>Barcodes</i>	24
5. Conclusiones	25
Referencias	26
Anexos	28

Resumen

La familia Bovidae es uno de los grupos taxonómicos de mamíferos más diversos. Las relaciones evolutivas dentro de esta familia, sobre todo a nivel de tribu, siguen sin estar claras debido a las discrepancias entre los estudios morfológicos y moleculares y a las relaciones no resueltas entre las especies actuales. En este trabajo se realizan filogenias a partir de dos genes mitocondriales, *COXI* y *CytB*, y se comparan con las de otros autores para evaluar las similitudes y las diferencias que existen entre ellas y ver si existen variaciones en la historia evolutiva de las especies que las componen. La comparación con estudios anteriores permite comprender la fiabilidad de estos genes para establecer relaciones filogenéticas dentro de la familia Bovidae. Además, se evalúa la hipótesis del reloj molecular y se estiman los tiempos de divergencia entre especies. Este estudio pone de relieve la importancia de elegir marcadores moleculares apropiados para el análisis filogenético y aporta datos sobre las relaciones evolutivas entre especies de bóvidos.

Palabras clave: Bovidae, *COXI*, *CytB*, evolución, filogenia, reloj molecular.

Abstract

The family Bovidae is one of the most diverse taxonomic groups of mammals. Evolutionary relationships within this family, especially at the tribal level, remain unclear due to discrepancies between morphological and molecular studies and unresolved relationships between extant species. In this work, phylogenies are made from two mitochondrial genes, *COXI* and *CytB*, and compared with those of other authors to assess the similarities and differences between them and to see if there are variations in the evolutionary history of the species that compose them. Comparison with previous studies provides insight into the reliability of these genes for establishing phylogenetic relationships within the family Bovidae. In addition, the molecular clock hypothesis is evaluated and divergence times between species are estimated. This study highlights the importance of choosing appropriate molecular markers for phylogenetic analysis and provides insights into evolutionary relationships between bovine species.

Key words: Bovidae, *COXI*, *CytB*, evolution, molecular clock, phylogeny.

1. Introducción

La familia Bovidae (Mammalia, Artiodactyla) es un grupo taxonómico formado por más de 140 especies pertenecientes a 49 géneros distintos (Akinyemi *et al.*, 2022), la gran mayoría de África (Allard *et al.*, 1992; Hassanin y Douzery, 1999) y Eurasia (Hassanin y Douzery, 1999). Los bóvidos son uno de los grupos más diversos de mamíferos que existen actualmente, dividiéndose en nueve subfamilias (Figura 1) según la clasificación del NCBI: Aepycerotinae, Alcelaphinae, Antilopinae, Bovinae, Caprinae, Cephalopinae, Hippotraginae, Peleinae y Reduncinae. Las relaciones evolutivas entre los distintos subgrupos que lo componen siguen sin estar muy claras, especialmente entre tribus (Allard *et al.*, 1992; Hassanin y Douzery, 1999; Bärmann *et al.*, 2013). Esto es debido a que los resultados de estudios realizados a nivel morfológico no siempre coinciden con los estudios a nivel molecular (Allard *et al.*, 1992) y a que tampoco están resueltas las relaciones entre algunas de las especies actuales (Bärmann *et al.*, 2013). La falta de resolución entre las relaciones evolutivas de los bóvidos podría explicarse en parte por la rápida diversificación que sufrió este grupo durante el Mioceno (Hassanin y Douzery, 1999).

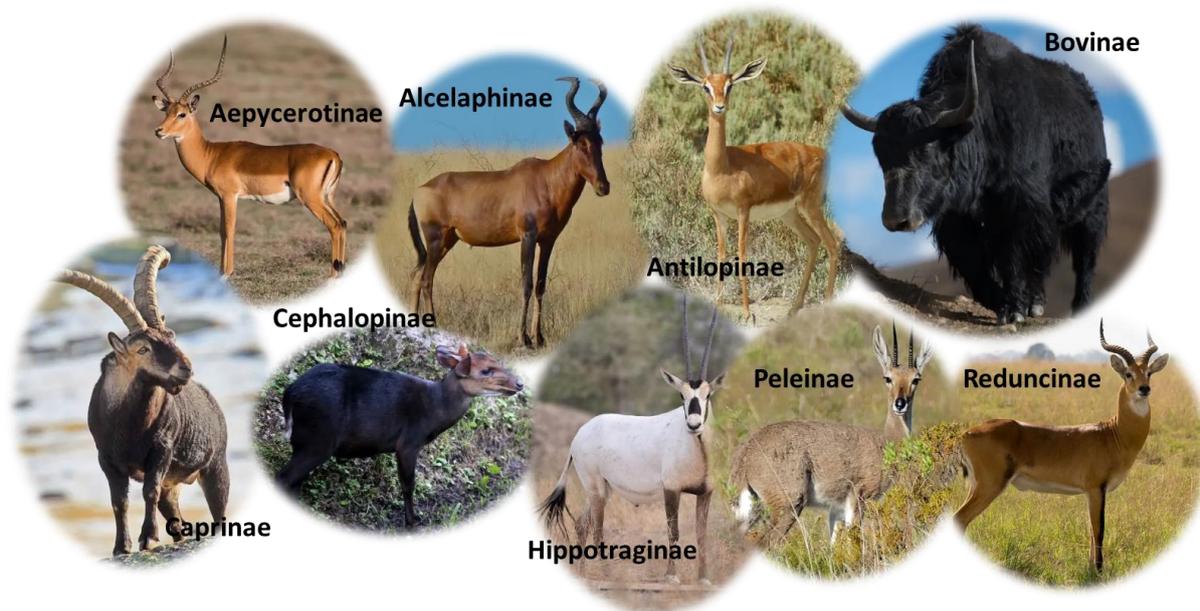


Figura 1. Fotografías de representantes de las nueve subfamilias de Bovidae. Montaje propio a partir de fotografías de <https://animalia.bio/es>.

Generalmente los estudios moleculares son más fiables a la hora de hacer filogenias (Oyston *et al.*, 2022). Los genes codificantes para Citocromo B (*CytB*) y Citocromo oxidasa 1 (*COXI* o *COI*) son genes mitocondriales que se han utilizado ampliamente para la identificación y taxonomía de prácticamente todos los grupos de animales por varias razones. Al ser genes mitocondriales, tienen una herencia principalmente matrilineal en la mayoría de especies, por

lo que permite el estudio de patrones de diversificación. Además, son secuencias con una tasa de sustitución elevada que recogen las diferencias evolutivas entre especies, lo que facilita la resolución de relaciones filogenéticas. Sin embargo, aun teniendo una tasa alta de sustitución, poseen zonas altamente conservadas en la mayoría de especies, por lo que los *primers* se pueden utilizar en gran cantidad de organismos. Dado que se han utilizado ampliamente, existen muchos datos disponibles en bases de datos que han servido como recurso para la realización de este trabajo. En ocasiones estos genes se utilizan como “*barcodes*”, utilizando una secuencia mínima para identificar especies. La base de datos BOLD (*Barcode of Life Data System V4*, Hebert y Ratnasingham, 2007) contiene once millones y medio de ejemplares identificados con secuencias del *COI* que a veces son únicamente de 500 pb. La clasificación de individuos e incluso la filogenia de los mismos se ha realizado en numerosas ocasiones con este tipo de *barcodes* (por ejemplo, en bóvidos, Cai *et al.*, 2011).

Un árbol filogenético es una hipótesis sobre la historia evolutiva de varios genes, taxones o especies; una visión más o menos probable de la realidad que permite identificar organismos por su posición evolutiva. Se construye a partir de las similitudes y diferencias que existan entre ellos. A su vez, los árboles filogenéticos están estrechamente relacionados con la teoría de reloj molecular, ya que esta hipótesis se utiliza para asignar un marco temporal a la longitud de las ramas del árbol.

La hipótesis de reloj molecular sugiere que las sustituciones de aminoácidos en una proteína o de nucleótidos en un gen ocurren entre residuos equivalentes funcionalmente, por lo que los cambios en estas sustituciones a lo largo de las distintas ramas evolutivas estarían determinados por la tasa de mutación y el tiempo transcurrido (Ayala, 1999). Esas diferencias pueden utilizarse para estimar la relación entre especies y el tiempo transcurrido desde su ancestro común, teniendo en cuenta que cada gen o proteína tiene distintas tasas de mutación y funciona como un reloj independiente que mide eventos evolutivos (Ayala, 1999).

Objetivo:

Sabiendo que tanto las secuencias del gen *COXI* como las del *CytB* son utilizadas frecuentemente para la construcción de árboles filogenéticos de mamíferos, este trabajo pretende comparar los resultados obtenidos al realizar la filogenia de bóvidos con cada citocromo, determinando si existen diferencias entre ellos y con los resultados obtenidos en otros trabajos. Esta comparación debería mostrar qué gen es más fiable para establecer las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de bóvidos.

2. Materiales y métodos

2.1 Taxones utilizados y obtención de secuencias

El análisis filogenético de los bóvidos (familia Bovidae, orden Artiodactyla) se realizó con las secuencias de nucleótidos de genes *CytB* y *COXI*. En este caso se obtuvieron las secuencias mitocondriales completas y de ahí se extrajeron ambos genes para asegurar que procedían del mismo individuo.

Las secuencias mitocondriales completas se obtuvieron de la base de datos de secuencias de nucleótidos (GenBank) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information, Sayers et al., 2022*). Se realizó una búsqueda del nombre de cada especie junto al término “mitochondrion” en la propia base de datos.

Para la realización de los árboles se utilizaron en total 104 especies (Anexo 1) de la familia Bovidae, incluyendo especies silvestres y domésticas, además de una especie utilizada como *outgroup* en los árboles filogenéticos, la jirafa (*Giraffa camelopardalis*), también perteneciente al orden Artiodactyla pero a la familia Giraffidae. Las 104 especies de bóvidos pertenecen a nueve subfamilias diferentes y constituyen un número representativo de taxones dentro de la familia Bovidae. Cuando fue posible, se procuró escoger las mismas secuencias que fueron utilizadas por Hassanin *et al.*, (2012).

Las secuencias de los genes analizados se extrajeron directamente de la mitocondria en el NCBI cuando estaban bien anotadas. En caso contrario se hizo una búsqueda con la herramienta *blastn* del NCBI (Altschul *et al.*, 1990) para conocer su posición y extraerla manualmente.

2.2 Alineamiento de secuencias

Para el alineamiento de secuencias se utilizó el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el programa MEGA7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Kumar et al., 2016*). Se introdujeron las secuencias de nucleótidos de las 104 especies de estudio y la del *outgroup* codificantes para ambos citocromos por separado y se realizó en ambos casos un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) de aminoácidos. Para ello se traducen las secuencias con el código genético mitocondrial de vertebrados. A partir del alineamiento proteico se infirió el de nucleótidos directamente en el MEGA7. El MSA presupone que hay un ancestro común a todos los organismos y detecta homologías posicionales entre estas para poder obtener las relaciones evolutivas (Warnow, 2021). Este método resulta un paso fundamental para cualquier análisis filogenético, ya que un alineamiento incorrecto podría alterar los resultados que se obtengan posteriormente (Warnow, 2021).

2.3 Construcción de los árboles filogenéticos

Posteriormente, con los alineamientos múltiples obtenidos, se construyeron dos árboles filogenéticos, uno por cada citocromo. La reconstrucción filogenética se realizó con el método estadístico de máxima verosimilitud (Yang y De Angelis, 2013). Este es un método de optimización, donde partiendo de un modelo de evolución y una topología determinada se calcula la probabilidad de obtener el alineamiento múltiple y luego se escoge el árbol con mayor probabilidad. En los métodos de optimización se evalúan todas las topologías posibles (o aquellas determinadas por un algoritmo) para cada carácter (posición del MSA). En el método de máxima verosimilitud, la mejor hipótesis (árbol con topología y modelo evolutivo) es aquella que tiene mayor verosimilitud, definiendo verosimilitud como la probabilidad con la que los datos (secuencias) se ajustan a una topología y un modelo de evolución dados. Este método presupone que la probabilidad de un cambio es independiente de otros cambios, que las probabilidades de sustitución no cambian con el tiempo, y que la probabilidad de una sustitución y su reversión es la misma.

El modelo evolutivo escogido fue el GTR+G+I (*General Time Reversible model Gamma distributed with Invariant sites*, (Nei y Kumar, 2000) después de pedirle al MEGA7 que analizara todos los modelos posibles y escogiera el que mejor se ajustaba a los alineamientos utilizados (Tabla 1). Este modelo asume que hay diferentes tasas de sustitución para cada par de nucleótidos además de haber distintas frecuencias de cada uno de los cuatro nucleótidos, siendo las frecuencias de los nucleótidos estimadas por las frecuencias observadas en el alineamiento (Choudhuri, 2014). El modelo sigue una distribución gamma (la probabilidad de cambio no es la misma en todas las posiciones) y con sitios invariantes (nucleótidos que no cambian nunca en una posición del alineamiento y, por lo tanto, no se han fijado mutaciones en esas posiciones a lo largo de la historia evolutiva de los genes estudiados).

Tabla 1. Test de MEGA7 para encontrar el mejor modelo evolutivo. Se muestran a continuación los cinco mejores modelos para cada alineamiento junto con su BIC (Bayesian Information Criterion; el menor valor indica el mejor modelo) y la verosimilitud (lnL).

<i>COXI</i>			<i>CytB</i>		
Modelo	BIC	lnL	Modelo	BIC	lnL
GTR+G+I	58378,285	-27889,624	GTR+G+I	49335,809	-23401,550
TN93+G+I	58429,667	-27933,281	HKY+G+I	49426,888	-23470,433
HKY+G+I	58478,535	-27963,703	TN93+G+I	49432,067	-23467,187
T92+G+I	58795,183	-28134,004	GTR+G	49654,602	-23566,783
GTR+G	59048,153	-28230,546	TN93+G	49753,847	-23633,913

La fiabilidad de los nodos de la filogenia se estimó utilizando el método Bootstrap con 100 repeticiones en cada análisis (Efron, 1982). El Bootstrapping remuestra caracteres aleatoriamente (posiciones del alineamiento) con reemplazamiento de los datos originales, generando así muchos alineamientos, 100 en este caso, del mismo tamaño que el original. Posteriormente, analiza cada réplica MSA con el mismo método que el MSA original. Este algoritmo tiene como finalidad determinar la fiabilidad de cada nodo del árbol en función de en cuántas de esas réplicas aparece. Al lado de cada nodo se muestra un número, el valor de Bootstrap, que va de 0 a 100. Los nodos representan a los ancestros más recientes de las ramas que unen, siendo más fiable cuanto mayor es el valor de Bootstrap.

2.4 Comprobación de reloj molecular

Tras la obtención de los árboles filogenéticos se comprobó si cumplían la hipótesis de reloj molecular por el método propuesto por Tajima (1993). Dado que no todas las especies incluidas en los dos árboles han evolucionado al mismo ritmo y, por lo tanto, no cumplen esta hipótesis en conjunto, los árboles se dividieron en otros más pequeños (subárboles) que incluían especies próximas y utilizaban la misma especie *outgroup* que en los árboles completos. Para aquellos subárboles que sí cumplían la hipótesis de reloj molecular se buscó el tiempo de divergencia entre dos de las especies que componían cada grupo en la página de *Timetree* (Kumar *et al.*, 2022), seleccionando las de los artículos más recientes, y se incluyeron en el programa MEGA7 como punto de calibración para datar el resto de nodos (puntos de divergencia entre los distintos taxones). El criterio utilizado para establecer las especies que componen cada subárbol para los que se hicieron los test de reloj molecular fue el de su clasificación en subfamilias, en base a la clasificación del NCBI de Bovidae y a los resultados obtenidos en las filogenias globales de ambos citocromos, seleccionando grupos por proximidad.

3. Resultados

Los primeros resultados obtenidos son los propios árboles filogenéticos a los que se les aplicaron los test de reloj molecular. En función de los resultados de los test se construyeron diferentes subárboles. Para aquellos que se comportaron como reloj molecular, se construyeron filogramas métricos en los que se representa la escala de tiempo.

3.1 Árboles filogenéticos de *COXI* y *CytB*

Los árboles filogenéticos inferidos a partir de las secuencias del *CytB* y el *COXI* de las 104 especies de bóvidos se muestran en las Figuras 2 y 3, respectivamente. En ambas figuras aparecen en distintos colores las subfamilias de Bovidae a las que pertenecen las especies incluidas, según la clasificación del NCBI.

Ambos árboles están dispuestos de manera circular para que se puedan ver mejor, ya que ordenados linealmente eran demasiado grandes y dificultaba su interpretación. Cada una de las subfamilias está representada en un color diferente. Los nodos que separan a las subfamilias y a algunas tribus tienen valores muy bajos, por lo que no se puede afirmar con seguridad que ese sea el ancestro común a las especies que surgen de él. Por ejemplo, el nodo que une a Cephalophinae, Antilopinae y Bovinae en la Figura 2 tiene un valor de Bootstrap de 12. Sí se puede observar, en cambio, que los valores de Bootstrap en los nodos que unen a las especies de los mismos géneros son bastante sólidos, ya que son valores muy altos en la mayoría de casos. No hay un valor concreto de Bootstrap para el que el resultado no sea fiable, pero cuanto mayor sea, mayor es la fiabilidad.

En el árbol construido a partir de *COXI*, Bovinae forma un grupo monofilético, mientras que en el árbol de *CytB* forma un grupo parafilético. Antilopinae forma un grupo polifilético en ambos árboles. Reduncinae forma un grupo parafilético con ambos genes, ya que incluye a *Pelea capreolus*, único miembro de la subfamilia Peleinae. Caprinae forma un grupo monofilético con el gen *COXI*, pero la subfamilia es parafilética según el gen *CytB* por la incorporación de la especie *Pantholops hodgsonii*. El resto de subfamilias forman grupos monofiléticos en ambos árboles. Si se comparan los dos árboles, se puede observar que algunas especies no forman los mismos grupos en ambos casos. Por ejemplo, *Aepyceros melampus* pertenece a la subfamilia Aepycerotinae según la clasificación del NCBI y en el árbol de *COXI* aparece como taxón hermano de Bovinae y las dos especies del género *Neotragus* (Antilopinae), mientras que en el árbol de *CytB* se localiza junto a Alcelaphinae. Aunque en ambos casos, el nodo que los une tiene un valor de Bootstrap muy bajo (12 y 29, respectivamente).

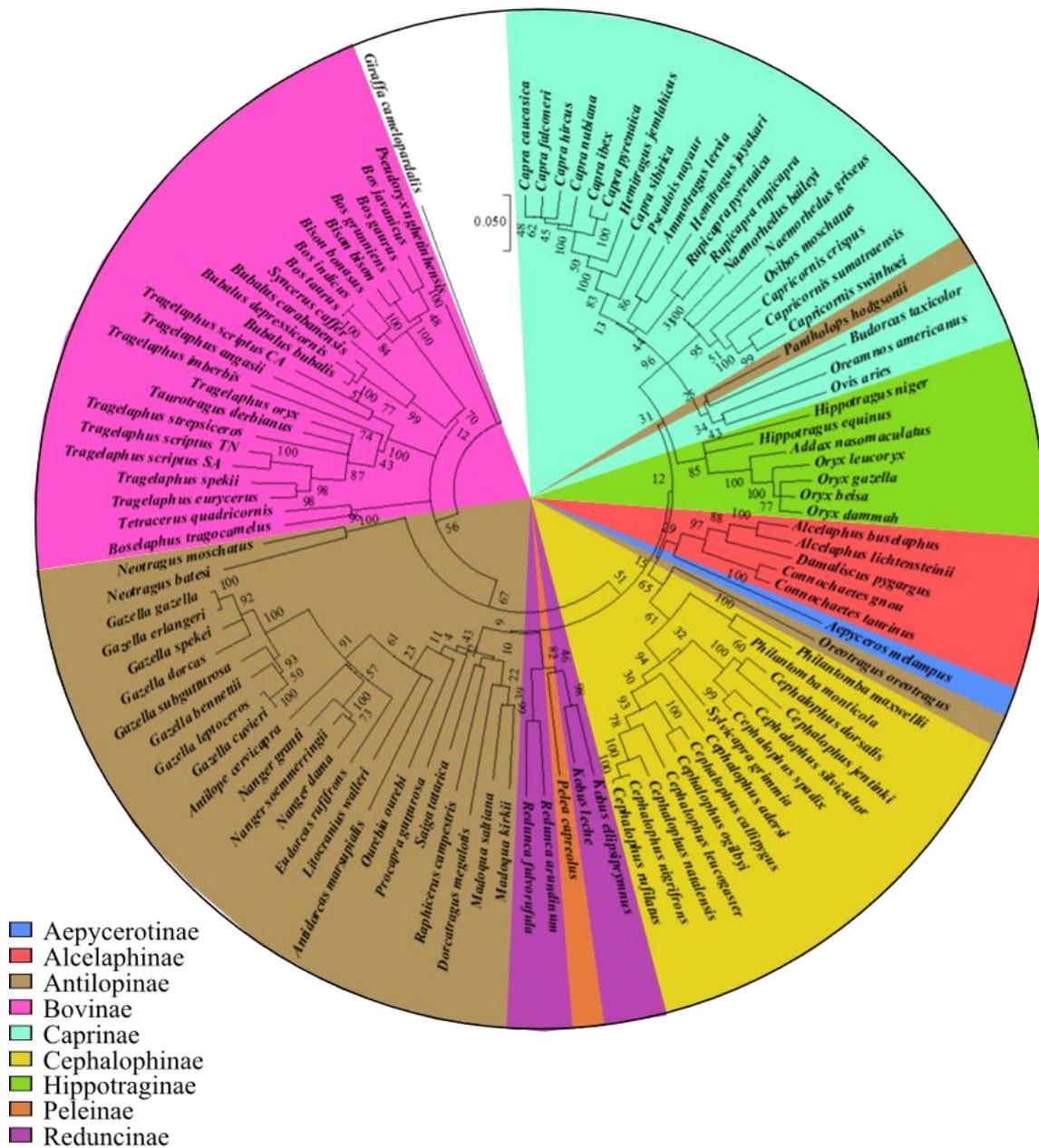


Figura 3. Árbol filogenético de la familia Bovidae a partir de secuencias de *CytB*. El filograma se ha obtenido por máxima verosimilitud utilizando el modelo GTR+G+I. Se ha utilizado *Giraffa camelopardalis* (Giraffidae) como *outgroup*. Los números de los nodos indican su fiabilidad estimada por Bootstrap. Los colores indican las subfamilias en las que se incluye cada especie.

3.2 Resultados de los test de reloj molecular

Tras la construcción y el análisis de los árboles filogenéticos, se realizaron test de reloj molecular entre los distintos grupos explicados en el apartado 2.4 de materiales y métodos. Dos de las subfamilias de la clasificación del NCBI solo tenían un representante entre las especies del estudio, por lo que a estas no se les pudo realizar el test. La Tabla 2 muestra un resumen de los resultados de los test.

Tabla 2. Valores obtenidos en los test de reloj molecular. Se incluyen los resultados tanto de las secuencias del *CytB* como de *COXI* utilizando el modelo GTR+G+I. No se pudo realizar el test en las subfamilias Aepycerotinae y Peleinae por estar representadas solamente por una especie de cada una. Los grupos realizados a partir de las Figuras 2 y 3 no coinciden para ambos citocromos en todos los casos. Están destacados en verde los resultados que muestran reloj molecular en ambos citocromos.

* El grupo Antilopinae reducido tiene 22 especies con *CytB* y 21 con *COXI*.

Grupo	Nº especies	COXI		CytB	
		p value	Reloj molecular	p value	Reloj molecular
Aepycerotinae	-	-	-	-	-
Aepycerotinae + Alcelaphinae	6	-	-	0,33	Sí
Alcelaphinae	5	4,48*10 ⁻⁴	No	0,09	Sí
Antilopinae	26	6,64*10 ⁻⁴	No	7,59*10 ⁻⁴	No
Antilopinae reducido	22*	0,15	Sí	0,01	No
Bovinae	24	0,42	Sí	3,61*10 ⁻³	No
Bovinae + Aepycerotinae + <i>Neotragus</i> sp.	27	0,07	Sí	-	-
Caprinae	22	3,19*10 ⁻³	No	0,98	Sí
Caprinae + <i>Pantholops hodgsonii</i>	23	1,18*10 ⁻⁴	No	0,87	Sí
Cephalophinae	14	0,03	No	8,57*10 ⁻⁷	No
Cephalophinae + <i>Oreotragus oreotragus</i>	15	2,87*10 ⁻³	No	3,30*10 ⁻⁴	No
Hippotraginae	7	0,95	Sí	0,01	No
Peleinae	-	-	-	-	-
Peleinae + Reduncinae	5	-	-	0,65	Sí
Reduncinae	4	0,96	Sí	0,76	Sí
Reduncinae + Peleinae + <i>Ourebia ourebi</i>	6	0,90	Sí	-	-

Las tabla compara el valor de la topología con y sin reloj molecular bajo las restricciones del modelo GTR+G+I, obteniendo un valor de probabilidad (p value) en una prueba chi cuadrado en la que el número de grados de libertad es el número de especies menos uno. La hipótesis nula que se propone en el test es que ambos modelos son iguales. Si $p < 0,05$, el valor es significativo, los modelos con y sin reloj molecular no son equivalentes y debe utilizarse aquel

más complejo, es decir, el que no supone reloj. Si no hay reloj molecular en un grupo se entiende que las secuencias que lo forman han evolucionado a diferente ritmo. Esta variación en el ritmo de evolución debe atribuirse a distinta presión de selección natural. Cuando se acepta la hipótesis, los dos modelos son equivalentes y se opta por el más sencillo, con reloj molecular. Se acepta que las secuencias evolucionan al mismo ritmo, y el número de mutaciones fijadas en cada secuencia depende solo del tiempo y no de la selección, por lo que se pueden transformar las distancias del árbol filogenético en tiempos si se dispone de un punto de calibración. Solo se hicieron árboles con datos de tiempo de divergencia con aquellos grupos en los que sí hay reloj molecular. El mismo grupo puede dar que hay reloj molecular o no, dependiendo del citocromo utilizado.

3.3 Árboles con tiempos de divergencia

Una vez obtenidos los puntos de divergencia entre las distintas especies de estudio, lo siguiente que podríamos plantearnos es cuánto hace que se separaron las especies actuales de sus respectivos ancestros comunes. Para ello, es necesario que cumplan la hipótesis de reloj molecular. No todas las especies del árbol evolucionan al mismo ritmo y por lo tanto el árbol conjunto no se ajusta a reloj molecular, por lo que se hicieron agrupaciones más pequeñas, como se muestra en el apartado 2.4 de materiales y métodos, y se comprobó en ellas si se cumplía dicha hipótesis. Posteriormente, se construyeron árboles con tiempos de divergencia con aquellos que sí la cumplían. Las Figuras 4-9 muestran los árboles con tiempos de divergencia formados a partir de las secuencias del *CytB*. Las Figuras 10-15 muestran los árboles con tiempos de divergencia formados a partir de las secuencias de *COXI*.

La Figura 4 muestra el árbol con tiempos de divergencia compuesto por especies de las subfamilias Aepycerotinae y Alcelaphinae según la clasificación del NCBI. Todas las especies que componen este grupo proceden de África (Anexo 1). Se puede observar que las especies de los mismos géneros se encuentran agrupadas. *Alcelaphus* se habría diversificado hace más de 4,5 millones de años (MY), mientras que *Connochaetes* lo habría hecho hace poco más de 2 MY. Cuando se elimina del análisis la subfamilia Aepycerotinae (Figura 5), los dos géneros mencionados de la subfamilia Alcelaphinae pasan a formar grupos hermanos y *Damaliscus pygargus* aparece como la primera especie que se diferencia en la subfamilia. Esta posición es diferente a la filogenia general de la Figura 3. En este nuevo árbol los tiempos de divergencia entre especies se reducen notablemente, pero puede ser debido a que la calibración del árbol de

la Figura 4 se realizó con el nodo en que se diferencia la subfamilia Aepycerotinae, cuya posición es incierta, y su datación podría ser incorrecta. Con la calibración de la Figura 5, los géneros *Alcelaphus* y *Connochaetes* habrían divergido hace 2 y 0,6 MY respectivamente.

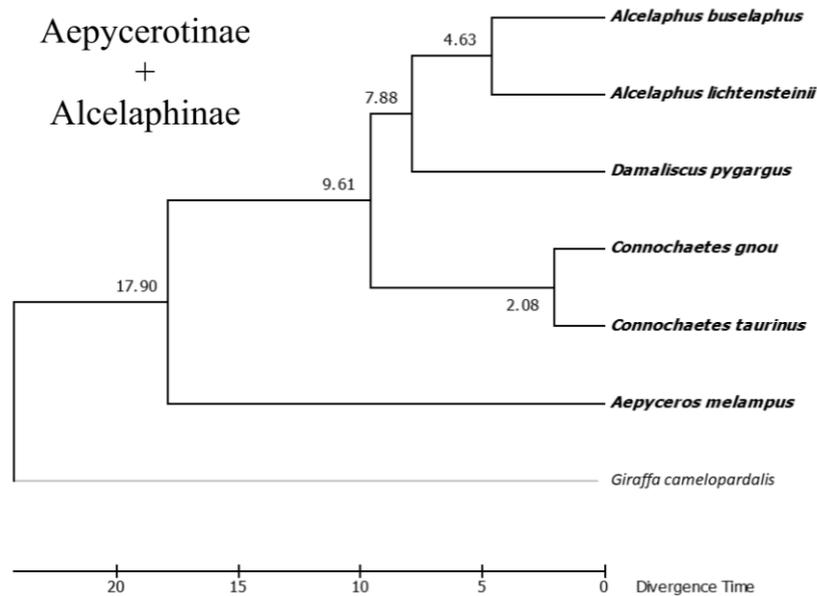


Figura 4. Aepycerotinae y Alcelaphinae, grupo en función del árbol de la Figura 3, a partir de las secuencias de *CytB*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Connochaetes gnou* y *Aepyceros melampus* (17,9 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

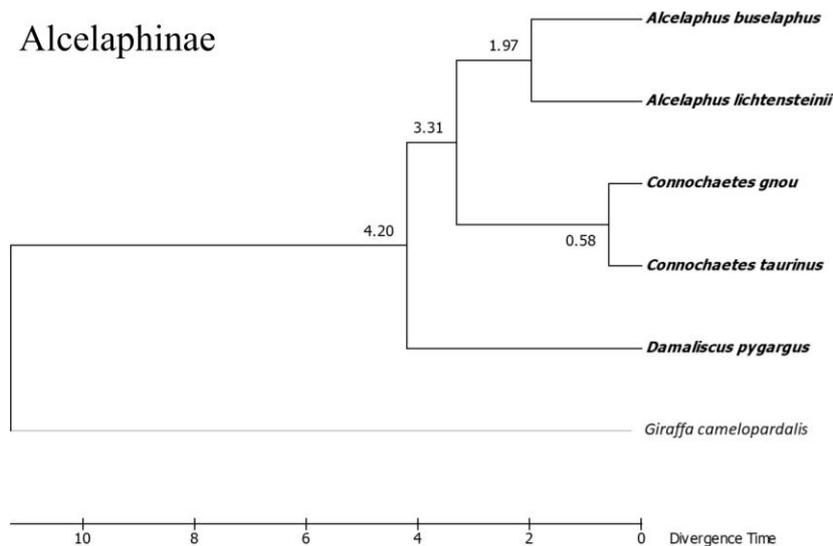


Figura 5. Alcelaphinae, grupo en función de la clasificación del NCBI, a partir de las secuencias de *CytB*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Damaliscus pygargus* y *Alcelaphus buselaphus* (4,2 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

La Figura 6 muestra el árbol con tiempos de divergencia compuesto por especies de la subfamilia Caprinae según la clasificación del NCBI. Las especies que componen este grupo proceden de todo el mundo, aunque principalmente son de Asia y Europa (Anexo 1). Algunas son especies silvestres y otras domésticas, y su diversificación comenzó hace más de 12 MY. El género *Capra* incluye siete especies, pero forma un grupo parafilético por la presencia de *Hemitragus jemlahicus*. *Capra sibirica* se habría separado del resto hace 6,3 MY, pero las otras seis especies se habrían formado por una radiación ocurrida hace entre 3,2 y 1 MY. El género *Hemitragus* está formado por dos especies, pero es claramente polifilético. *Capricornis* es un género monofilético con tres especies. *Naemorhedus* es un género formado por dos especies que en el árbol de la Figura 6 es parafilético. Las dos especies siempre están muy distantes, pero en la Figura 3 sin la restricción del reloj molecular formaban un grupo monofilético. El resto de géneros de la subfamilia son monoespecíficos, pero *Ovis aries*, *Oreamnos americanus* y *Budorcas taxicolor* se habrían separado del resto hace más de 11 MY.

Cuando en la Figura 7 se analiza la subfamilia Caprinae con *Pantholops hodgsonii* (Antilopinae, según la clasificación del NCBI) por estar dentro de este grupo según la Figura 3, el antílope tibetano se agrupa nuevamente con los Caprinae, aunque en una posición bastante externa, siendo un grupo hermano a Caprinae cuando se utiliza el gen *COXI* (Figura 2).

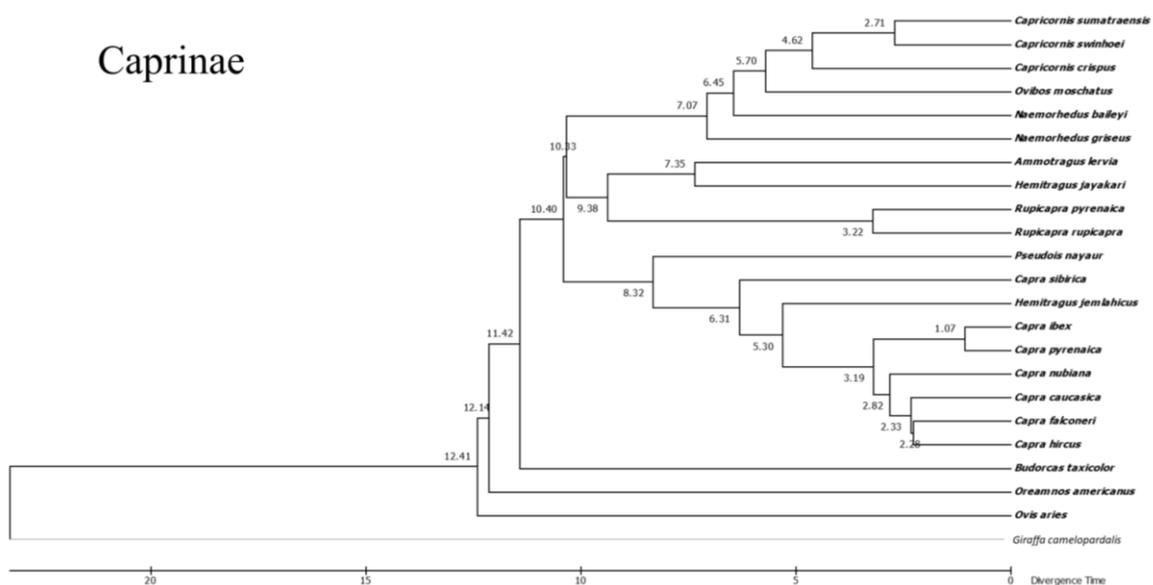


Figura 6. Caprinae, grupo según la clasificación del NCBI, a partir de las secuencias de *CytB*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Capricornis crispus* y *Capra pyrenaica* (10,4 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

Caprinae
+
Pantholops hodgsonii

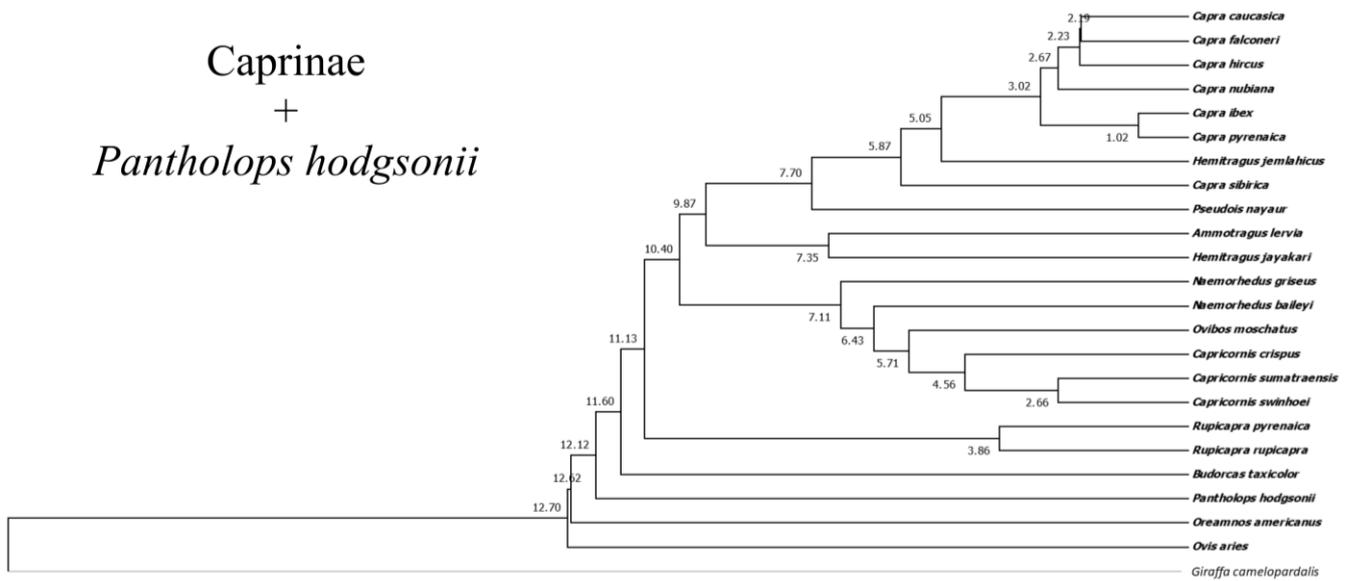


Figura 7. Caprinae y *Pantholops hodgsonii*, grupo en función del árbol de la Figura 3, a partir de las secuencias de *CytB*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Capricornis crispus* y *Capra pyrenaica* (10,4 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

La Figura 8 incluye especies de la subfamilia Reduncinae y el único representante de la subfamilia Peleinae. Todas las especies proceden de África (Anexo 1). Aunque según la clasificación del NCBI *Pelea capreolus* pertenece a la subfamilia Peleinae, en los árboles construidos a partir de ambos citocromos aparece dentro de la subfamilia Reduncinae, como se puede ver también en la Figura 11. Las Figuras 9 y 10 están construidas únicamente a partir de la familia Reduncinae, la primera a partir de *CytB* y la segunda a partir de *COXI*. En las cuatro figuras se puede ver que las cuatro especies que componen la subfamilia Reduncinae se agrupan por parejas en dos géneros monofiléticos. Los dos géneros se separaron hace 7 MY (fecha de calibración) y los géneros se diversificaron entre hace entre 4 y 4,7 MY según el *CytB* (Figura 8). La divergencia en el género *Kobus* es la primera que se produce según este gen, pero según *COXI* sería posterior a la de *Redunca* hace tan solo 2,8 MY (Figura 11).

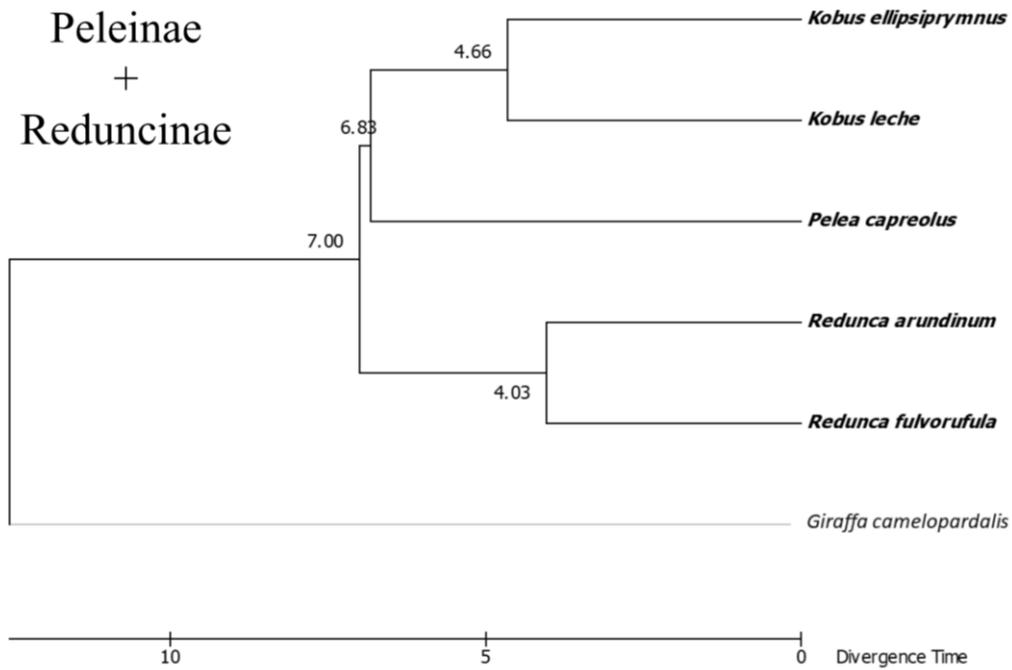


Figura 8. Peleinae y Reduncinae, grupo en función del árbol de la Figura 3, a partir de las secuencias de *CytB*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Kobus leche* y *Redunca arundinum* (7,0 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

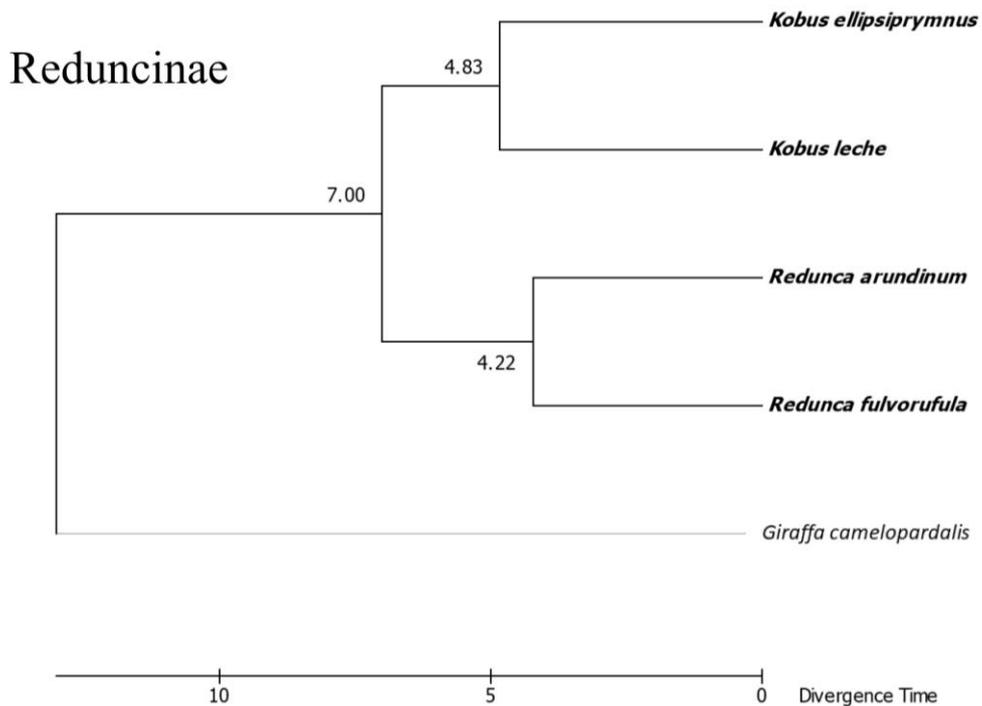


Figura 9. Reduncinae, grupo en función de la clasificación del NCBI, a partir de las secuencias de *CytB*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Kobus leche* y *Redunca arundinum* (7,0 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

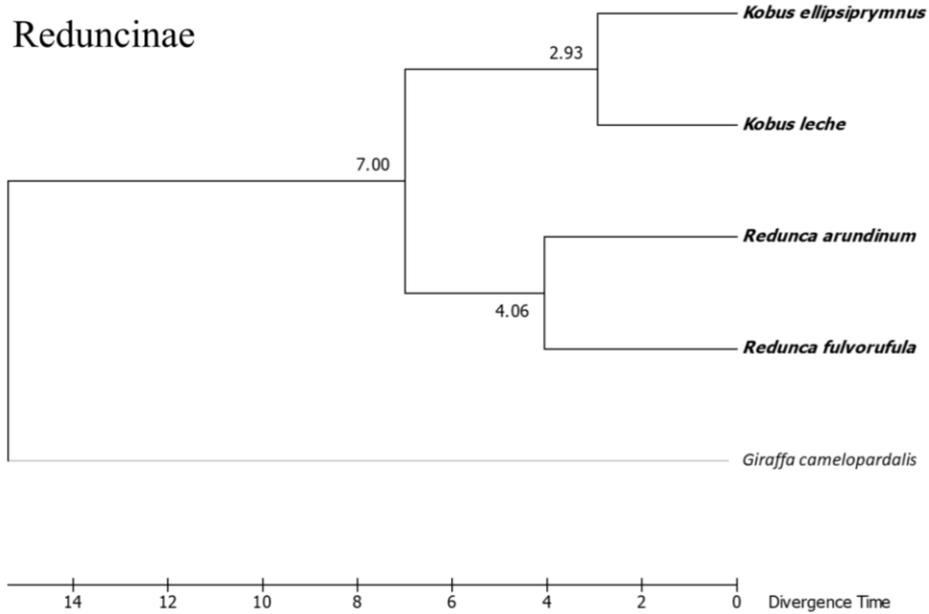


Figura 10. Reduncinae, grupo en función de la clasificación del NCBI, a partir de las secuencias de *COXI*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Kobus leche* y *Redunca arundinum* (7,0 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

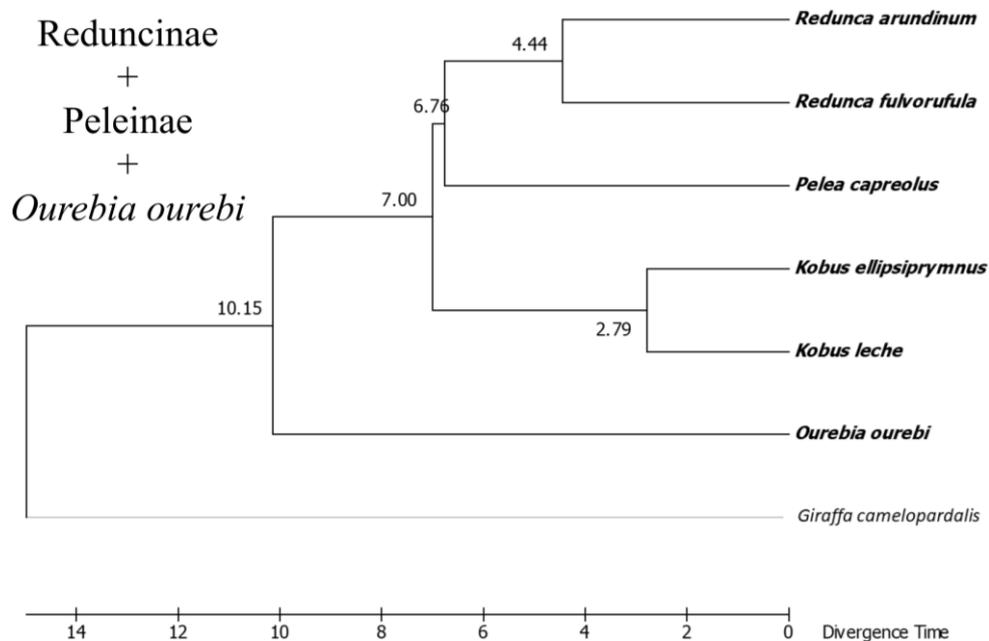


Figura 11. Reduncinae, Peleinae y *Ourebia ourebi*, grupo en función del árbol de la Figura 2, a partir de las secuencias de *COXI*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Kobus leche* y *Redunca arundinum* (7,0 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

En la Figura 12 se muestra el árbol de la subfamilia Antilopinae construido a partir de las especies que formaban un grupo monofilético en el árbol de la Figura 2. Para elaborar esta filogenia se ha utilizado el alineamiento del gen *COXI*. Las especies incluidas proceden principalmente de Asia y África (Anexo 1). En esta figura se puede ver que las especies han divergido ampliamente en 14 millones de años, lo que no es demasiado tiempo en términos evolutivos. Cuando la diversificación ocurre muy rápido, las relaciones evolutivas no suelen estar muy claras. Sin embargo, en este caso se puede ver que todos los géneros con varias especies son monofiléticos. La diversificación de los géneros *Gazella* y *Nanger* se ha producido hace menos de 2 MY y las ocho especies de gacela parecen el resultado de una rápida radiación adaptativa.

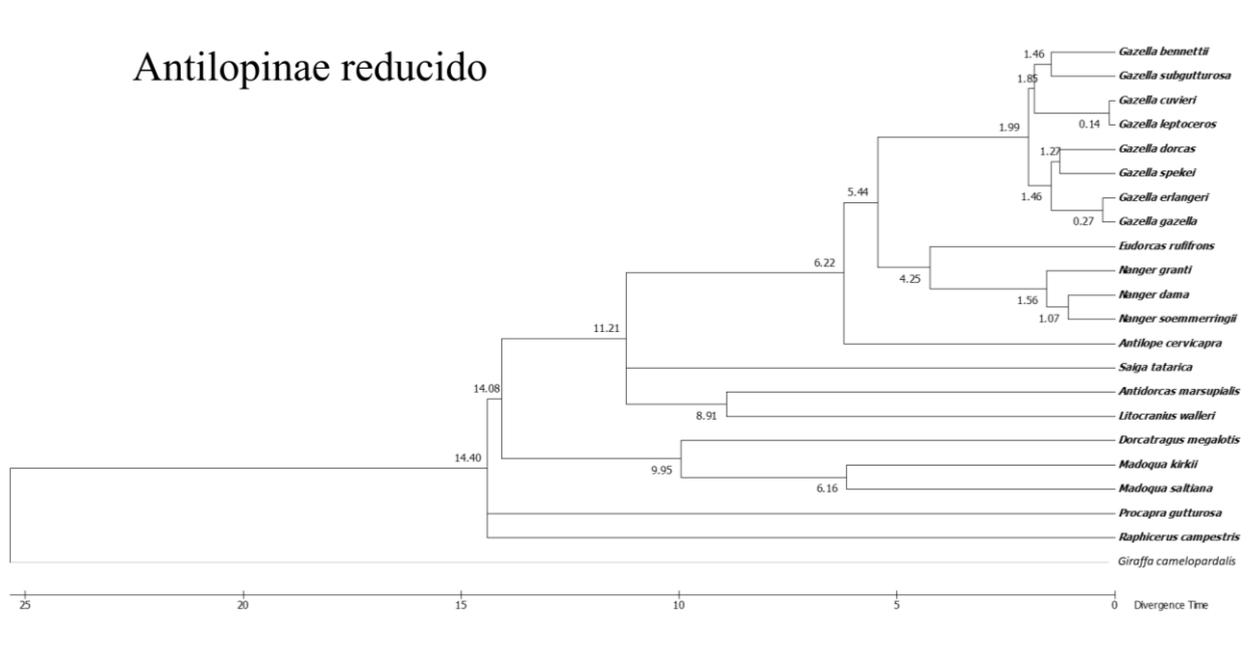


Figura 12. Antilopinae reducido, grupo en función del árbol de la Figura 2, a partir de las secuencias de *COXI*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Gazella dorcas* y *Procopra gutturosa* (14,4 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

En las Figuras 13 y 14 se muestran los árboles con tiempos de divergencia construidos con las especies de la subfamilia Bovinae. En la Figura 14 también se encuentran la especie de la subfamilia Aepycerotinae y las dos especies del género *Neotragus* (Antilopinae). Como ocurre con la subfamilia Antilopinae, Bovinae también se ha diversificado en distintos grupos tras aparecer hace unos 13,7 MY. El primero de los tres grupos de Bovinae está formado por especies procedentes de todo el mundo (Anexo 1), siendo algunas de ellas silvestres y otras

domésticas. Los toros y los búfalos se engloban en especies del género *Bos* y el género *Bison*, y descenderían de un ancestro de hace 3,15 MY, pero no forman grupos monofiléticos. Como grupos hermanos tendrían a *Pseudoryx nghetinhensis*, *Syncerus caffer* (búfalo cafre) y los búfalos del género *Bubalus*, este sí, monofilético y de diversificación reciente. El segundo grupo de la subfamilia incluye siete especies del género *Tragelaphus* que se suelen considerar antílopes, todos africanos. Su ancestro ha servido como punto de calibración aunque formaría un grupo parafilético, ya que incluye como descendiente a *Taurotragus derbianus*, muy próximo evolutivamente a *Tragelaphus oryx* y ambos conocidos como eland. Se han incluido tres individuos de *Tragelaphus scriptus*. Los procedentes de Sudáfrica y Tanzania se encuentran muy próximos entre ellos, aunque habrían divergido hace 1,26 MY, y muy separados del procedente de Camerún. El tercer grupo lo forman otros dos antílopes, *Boselaphus tragocamelus* y *Tetracerus quadricornis*, que habrían divergido hace 7 MY.

La inclusión en el análisis de Aepycerotinae y las dos especies de *Neotragus* (Figura 14) no modifica las relaciones filogenéticas de Bovinae, ya que que Aepycerotinae (impalas) se mantendría como grupo externo a Bovinae al igual que los antílopes enanos del género *Neotragus*, de posición incierta pero que normalmente se incluyen en la subfamilia Antilopinae.

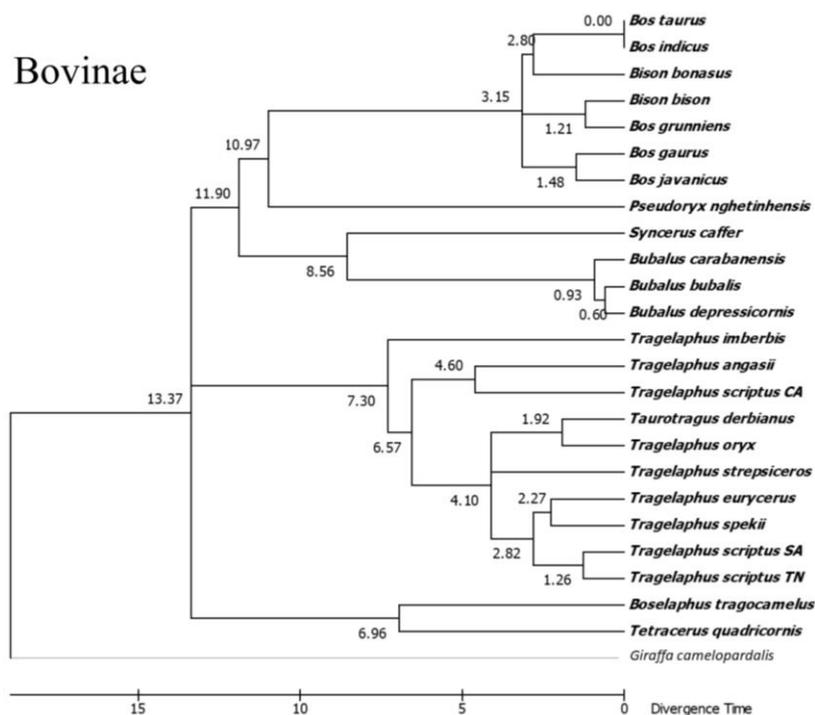


Figura 13. Bovinae, grupo en función de la clasificación del NCBI, a partir de las secuencias de *COXI*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Tragelaphus imberbis* y *Taurotragus derbianus* (7,3 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

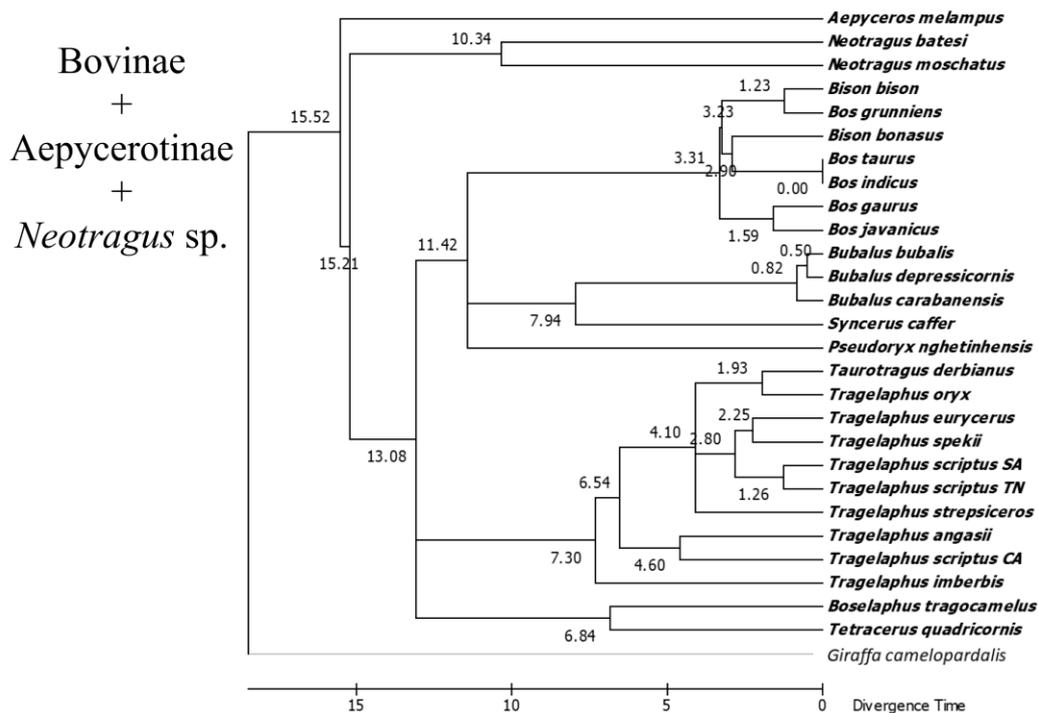


Figura 14. Bovinae, Aepycerotinae y *Neotragus* sp., grupo en función de la clasificación del NCBI, a partir de las secuencias de *COXI*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Tragelaphus imberbis* y *Taurotragus derbianus* (7,3 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

En la Figura 15 se muestra el árbol de la subfamilia Hippotraginae. Las especies incluidas proceden todas de África salvo *Oryx leucoryx* que se encuentra en la Península arábiga (Anexo 1). El género *Oryx* forma un grupo monofilético que se ha ido diversificando desde hace solo 2,5 MY, y está próximo a *Addax nasomaculatus*. El último ancestro de estos géneros y los antílopes sable del género *Hippotragus* habría vivido hace 8,7 MY. Como se indicó anteriormente, no todos los grupos presentan reloj molecular y, además, como se puede observar en las Figuras 4-15, no depende de las especies que componen el grupo, sino del gen que se mire. El único grupo que muestra reloj molecular con ambos citocromos es la subfamilia Reduncinae, pero incluso entre ellos hay diferencias en los tiempos de divergencia.

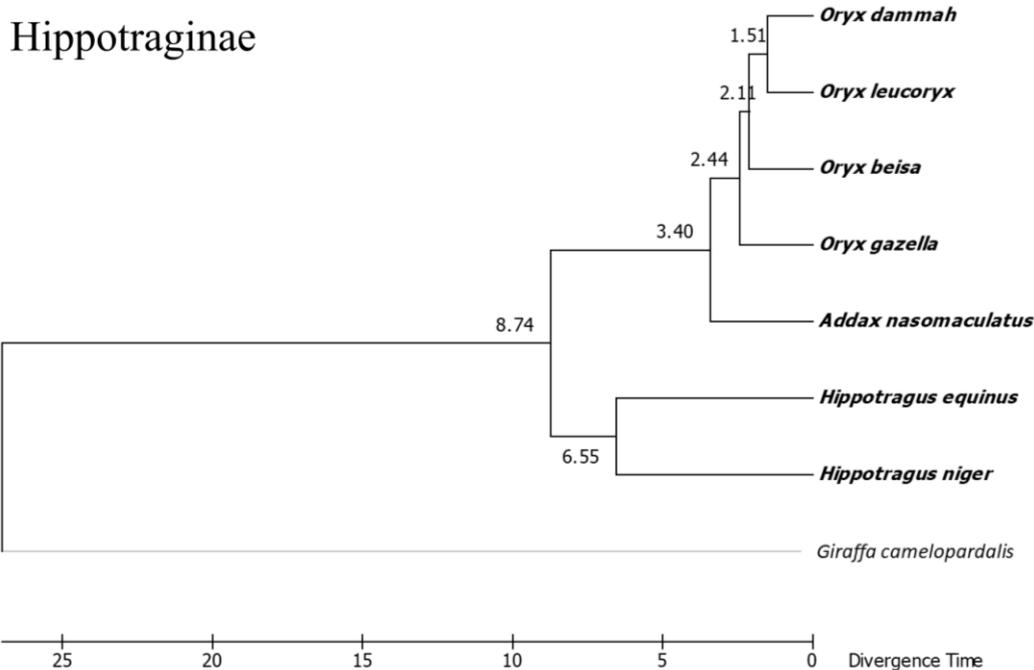


Figura 15. Hippotraginae, grupo en función de la clasificación del NCBI, a partir de las secuencias de *COXI*. Filogenia con tiempos de divergencia calculados por MEGA7 a partir de un punto de calibración obtenido de la página de *Timetree* entre las especies *Oryx dammah* y *Addax nasomaculatus* (3,4 MYA). Árbol obtenido con el modelo GTR+G+I.

En los grupos donde no hay reloj molecular las ramas tienen diferentes longitudes porque las especies que componen esos árboles han evolucionado a distintos ritmos. Esto puede deberse, entre otras cosas, a distintas condiciones ambientales que hacen que se produzca una evolución más rápida o más lenta respecto a otras especies. Se puede ver en las Figuras 16 y 17 cómo en algunos grupos las longitudes de las ramas son muy diferentes entre sí. Así, en la subfamilia Cephalophinae, las secuencias de ambos genes acumulan más cambios en algunas especies del género *Cephalophus* que en el género *Philantomba*. Mientras que las dos especies estudiadas del género *Philantomba* forman un grupo monofilético, *Cephalophus* es un género parafilético al recibir el duiker común el nombre de *Sylvicapra grimmia*.

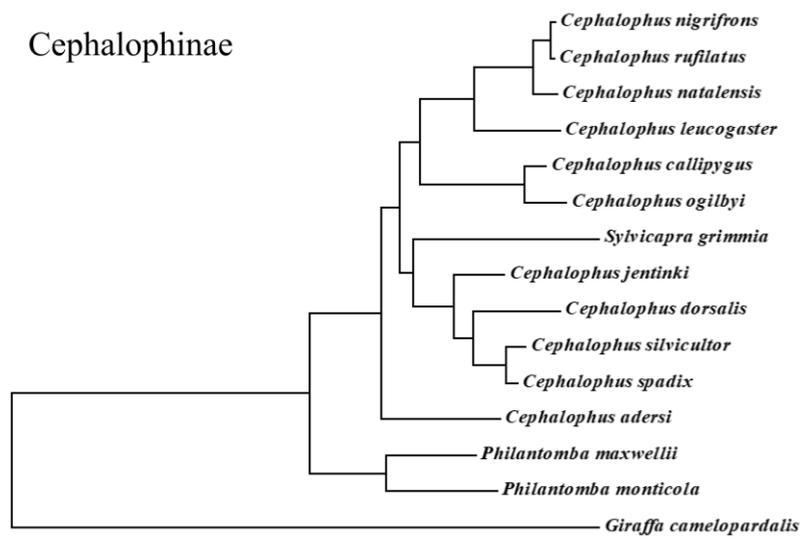


Figura 16. Filogenia de Cephalophinae. Árbol sin reloj molecular construido a partir de *COXI*.

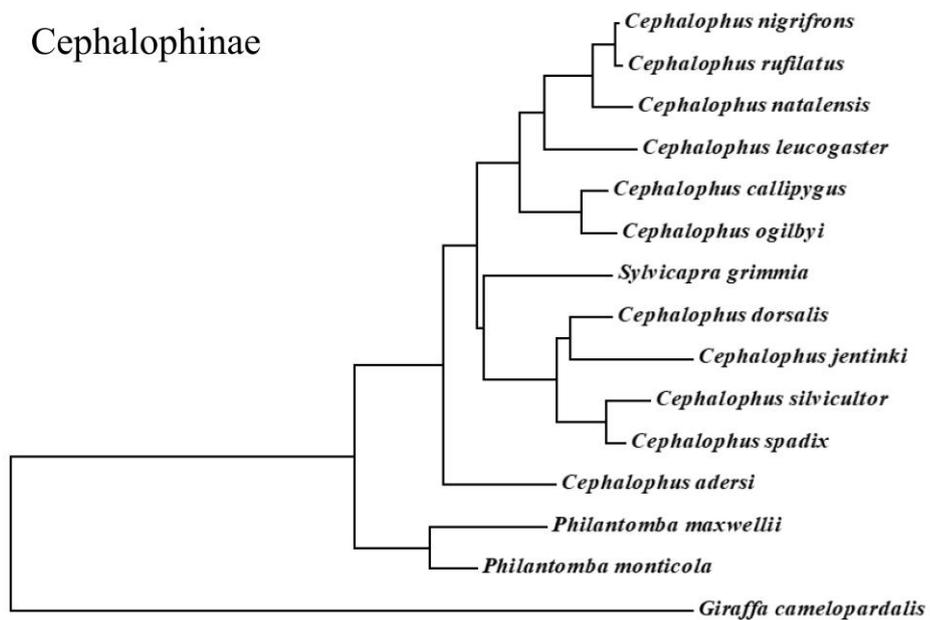


Figura 17. Filogenia de Cephalophinae. Árbol sin reloj molecular construido a partir de *CytB*.

4. Discusión

En los resultados se han presentado los árboles filogenéticos construidos a partir de *CytB* y *COXI*, y los filogramas ultramétricos de los grupos que tenían reloj molecular según los test realizados. En este apartado se compararán dichos resultados con los obtenidos en otros trabajos con los mismos o distintos genes. Además, es interesante comprobar cuál de las dos secuencias codificantes de los citocromos es más fiable a la hora de realizar filogenias en los bóvidos. A continuación, se propondrán posibles ampliaciones o mejoras que se podrían incluir en este trabajo que podrían aplicarse a estudios futuros. Para finalizar la discusión, se expondrá qué implicaciones tienen los análisis filogenéticos a partir de *CytB* y *COXI* para la investigación y que líneas futuras podrían abrirse a raíz de nuestro trabajo.

4.1 Comparación de los árboles filogenéticos con otras investigaciones

Con las filogenias construidas a partir de los genes *COXI* (Figura 2) y *CytB* (Figura 3) ya se pueden apreciar diferencias en la filogenia de Bovidae, tanto en la posición de algunas especies como en la relación existente entre las diferentes subfamilias. Esta filogenia ha sido estudiada también por otros investigadores, siguiendo distintos modelos, con genes diferentes (casi siempre mitocondriales), y no siempre obteniendo los mismos resultados. Así, la filogenia presentada por Zhao *et al.* (2018), fue obtenida a partir de secuencias de la región control de ADN mitocondrial; el de Hassanin y Douzery (1999), a partir de secuencias de *CytB*; el de Bärmann *et al.* (2013), a partir del consenso de nueve genes (*CytB*, *COX2*, *12S*, *16S*, *KCAS*, *SPTBN1*, *PRKCI*, *MC1R* y *THYR*); el de Hassanin *et al.* (2012), a partir de genomas mitocondriales completos; y el de Toljagić *et al.* (2018), construido con los mismos datos de secuencias mitocondriales que Hassanin *et al.* (2012).

Para el *COXI* el primer grupo en separarse del resto de bóvidos en la evolución es la subfamilia Alcelaphinae. Sin embargo, el *CytB* indica que el primer taxón en separarse es una especie (*Pseudoryx nghetinhensis*) incluida dentro de Bovinae, según la clasificación del NCBI. El resultado obtenido con el *CytB* está más próximo al resultado del árbol de Zhao *et al.* (2018), donde también el grupo basal del árbol es Bovinae, aunque lo hace como un grupo monofilético. En su árbol, Hassanin y Douzery, (1999) incluyen todo el orden Cetartiodactyla, pero el primer grupo de bóvidos en separarse del resto es Bovinae; y lo mismo ocurre en el de Hassanin *et al.* (2012) y en el de Toljagić *et al.* (2018). Hay un consenso entre la mayoría de árboles en cuanto a que los bovinos pudieron ser los primeros en separarse del resto de bóvidos, sin embargo, este resultado no es unánime.

La especie *Pantholops hodgsonii*, que aparece en la clasificación del NCBI dentro de la subfamilia Antilopinae, aparece en los árboles filogenéticos de todos los autores que se comparan dentro de Caprinae o como taxón hermano de esta subfamilia. Bärmann *et al.* (2013), cuyo trabajo se centra en la tribu Antilopini también sitúan a *P. hodgsonii* dentro de Caprinae. Nuestros resultados también indican que se debería incluir a esta especie dentro de Caprinae para que esta subfamilia formara un grupo monofilético. En cualquier caso, la diferencia en la posición de *P. hodgsonii* (antílope tibetano) en los árboles de los dos genes podría estar relacionada con una adaptación al hábitat que ocupa en la zona nororiental de la meseta del Tíbet.

Otras especies que deberían cambiar sus nombres son *Taurotragus derbianus*, ya denominada *Tragelaphus derbianus* por Hassanin *et al.* (2012); *Sylvicapra grimmia*, para evitar que *Cephalophus* sea un género parafilético; y bien *Capra sibirica* o *Hemitragus jemlahicus*, para evitar la parafilia del género *Capra*.

Hay tres ejemplares de *Tragelaphus scriptus* procedentes de diferentes lugares (Sudáfrica, Camerún y Tanzania) en los dos árboles de este trabajo y en los de Hassanin *et al.* (2012). En los tres casos, los procedentes de Sudáfrica y Tanzania están muy próximos, pero estos están bastante alejados del procedente de Camerún. Dadas las diferencias que hay entre las tres mitocondrias, quizá sería razonable considerar que el *Tragelaphus scriptus* de Camerún sea una especie distinta como proponen Hassanin *et al.* (2012). También sería interesante estudiar la variación genética entre los individuos de las poblaciones de Sudáfrica y Tanzania porque las diferencias encontradas parecen suficientes para considerarlos especies diferentes.

Las especies del género *Bos* y las del género *Bison* se encuentran mezcladas en todos los árboles donde aparecen. No hay ninguna razón para considerar que estas especies pertenecen a géneros distintos.

Pelea capreolus es la única especie incluida dentro de la subfamilia Peleinae. Tanto en las filogenias obtenidas en este trabajo como en el árbol de Hassanin *et al.* (2012), aparece incluido dentro de la subfamilia Reduncinae. En los árboles de Hassanin y Douzery (1999), Toljagić *et al.* (2018) y Zhao *et al.* (2018) aparece como taxón hermano de Reduncinae, aunque no incluido en esa subfamilia. Por este motivo, algunos autores consideran que la subfamilia Peleinae no existe y que esta especie está o debería estar incluida dentro de Reduncinae. Otros, en cambio, siguen utilizando esta clasificación.

El género *Neotragus* también es otro punto de controversia. Según la clasificación del NCBI se incluye dentro de la subfamilia Antilopinae, aunque algunos autores consideran que podrían formar otra subfamilia: Neotraginae. En la filogenia del gen *COXI* de este trabajo, las dos especies de *Neotragus* forman un taxón hermano de las subfamilias Aepycerotinae y Bovinae. En los árboles de Hassanin y Douzery (1999), Hassanin *et al.* (2012), Bärmann *et al.* (2013) y Toljagić *et al.* (2018) también el género *Neotragus* es un taxón hermano de *Aepyceros melampus*, aunque con el *CytB* estaría situado en otra posición. Parece claro que no debe incluirse en la subfamilia Antilopinae.

Oreotragus oreotragus también aparece incluido dentro de Antilopinae según la clasificación del NCBI. Tanto en las filogenias de este trabajo como en los árboles de Hassanin y Douzery (1999), Hassanin *et al.* (2012), Bärmann *et al.* (2013) y Toljagić *et al.* (2018) aparece como taxón hermano de la subfamilia Cephalophinae o alguna de las especies de dicha subfamilia. Además, en el árbol de Zhao *et al.* (2018) también se separa del resto de Antilopinae. Para que esta especie se incluyera en un grupo monofilético, debería incluirse dentro de la subfamilia Cephalophinae como una especie basal, ya que todos los estudios comparados muestran un consenso respecto a su proximidad con esta subfamilia y su polifilia con Antilopinae.

No es posible determinar cuál de los citocromos utilizados muestra una filogenia que refleje la historia evolutiva de las subfamilias de Bovidae. Las topologías son diferentes, por lo que no podemos afirmar que uno de los genes sea mejor que el otro en el análisis filogenético de Bovidae, sobre todo en la radiación evolutiva que generó las distintas subfamilias. En los análisis moleculares la solución para encontrar topologías más fiables es aumentar la información, añadiendo nuevos genes e incluso la mitocondria completa. En el análisis de Hassanin *et al.* (2012) se analizaron mitocondrias completas y aún así se encontraron nodos dudosos entre los bóvidos, por lo que sería necesario recurrir también a genes nucleares.

4.2 Reloj molecular

Reduncinae fue la única subfamilia para la que había reloj molecular con las secuencias de *COXI* y *CytB* según los test de reloj molecular (Tabla 2). Ninguno de los trabajos citados que realizan análisis filogenéticos con las secuencias mitocondriales de los bóvidos se centraron en incluir tiempos de divergencia entre taxones, por lo que, en este trabajo, únicamente es posible comparar los resultados entre ambos citocromos.

En los diferentes subárboles, o cuando se añaden diferentes especies a los subárboles, se obtienen variaciones en los tiempos de divergencia de distintos taxones. Al comparar los resultados de los dos citocromos se observa que el ritmo de evolución de cada uno no es el mismo. En la mayoría de los casos el ritmo de evolución de uno de los dos citocromos se ajusta a reloj molecular, las sustituciones de nucleótidos serían neutras, y la selección actuaría como una fuerza depuradora eliminando los alelos que produjesen un citocromo menos eficiente. Mientras que en el otro citocromo se produciría una selección positiva, algunos cambios aportarían ventajas en las condiciones ambientales en las que vive cada bóvido y las secuencias no se ajustarían al reloj molecular.

En ambos citocromos se pueden observar diferencias en los tiempos de divergencia de las filogenias. Aunque en ambos se introdujo el mismo punto de calibración, al comparar los resultados los tiempos de divergencia no fueron iguales. Esto ocurre porque cada gen tiene una tasa diferente de cambio, por lo que llevan un ritmo diferente de evolución.

4.3 *Barcodes*

Como hemos visto a lo largo de todo el trabajo, el hecho de utilizar genes distintos para realizar filogenias no da los mismos resultados en todos los casos, aun utilizando las secuencias completas. Los *barcodes* son fragmentos de secuencias de unos 500 pb de longitud que cada vez se utilizan más para reconocer y definir especies. La utilización de estos *barcodes* a la hora de construir filogenias es un error, ya que no proporcionan suficiente información. Por otro lado, los *barcodes* suponen uniformidad entre los individuos de una especie y no permite ver la diversidad entre secuencias correctamente. Por lo tanto, no parece correcto por la reducción de la información utilizada construir filogenias y delimitar la variación de las especies con *barcodes* de tan poca longitud.

El análisis realizado nos indica que, cuanta más información podamos tener, más fiables serán las filogenias. Inicialmente se utilizaba el *CytB* para construir árboles, y luego se empezó a utilizar el *COXI*, entre otras razones porque su secuencia era más larga que la de *CytB*. Si se utiliza el genoma mitocondrial completo, los resultados podrían ser mejores que utilizando únicamente un gen o un consenso de algunos genes. Teniendo esto en cuenta, el uso de secuencias tan cortas como son los *barcodes* no parece tener sentido.

5. Conclusiones

Las principales conclusiones que podemos sacar de este trabajo son las siguientes:

- Los nodos que unen a las subfamilias tienen valores de Bootstrap muy bajos, por lo que la fiabilidad es baja. La gran diversificación que sufrieron los bóvidos durante el Mioceno dificulta enormemente conocer las relaciones de parentesco entre las diferentes subfamilias. La filogenia de los bóvidos a nivel de subfamilias sigue sin estar muy clara.
- Algunas especies deberían estar clasificadas en otros grupos para poder formar grupos monofiléticos, descendientes todos de un mismo ancestro común, en base a los resultados de este y otros trabajos citados, principalmente *Pantholops hodgsonii*, *Oreotragus oreotragus* y el género *Neotragus* de Antilopinae, y la única especie de la subfamilia Peleinae.
- Cada gen tiene un ritmo de evolución diferente. No existe un gen que por sí solo pueda darnos toda la información sobre la filogenia de los bóvidos. Cuantos más genes se utilicen, más fiables serán los resultados.
- Utilizar *barcodes* para clasificar individuos o realizar filogenias no tiene en cuenta la variabilidad que hay dentro de cada especie. Secuenciar únicamente *barcodes* reduce la cantidad de información disponible para este tipo de análisis.

Referencias

- Akinyemi, M. O., Finucan, J., Grytsay, A., Osaiyuwu, O. H., Adegaju, M. S., Ogunade, I. M., Thomas, B. N., Peters, S. O. y Morenikeji, O. B. (2022) "Molecular Evolution and Inheritance Pattern of Sox Gene Family among Bovidae", *Genes*, 13(10). doi:10.3390/genes13101783.
- Allard, M. W., Miyamoto, M. M., Jarecki, L., Kraus, F. y Tennant, M. R. (1992) "DNA systematics and evolution of the artiodactyl family Bovidae", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(9), pp. 3972–3976. doi:10.1073/pnas.89.9.3972.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990) "Basic local alignment search tool", *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Ayala, F. J. (1999) "Molecular clock mirages", *BioEssays*, 21(1), pp. 71–75. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199901)21:1<71::AID-BIES9>3.0.CO;2-B.
- Bärmann, E. V., Rössner, G. E. y Wörheide, G. (2013) "A revised phylogeny of Antilopini (Bovidae, Artiodactyla) using combined mitochondrial and nuclear genes", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(2), pp. 484–493. doi:10.1016/j.ympev.2013.02.015.
- Cai, Y., Sen, Zhang, L., Shen, F. J., Zhang, W. P., Hou, R., Yue, B. S., Li, J. y Zhang, Z. H. (2011) "DNA barcoding of 18 species of Bovidae", *Chinese Science Bulletin*, 56(2), pp. 164–168. doi:10.1007/s11434-010-4302-1.
- Choudhuri, S. (2014) "Phylogenetic Analysis", in *Bioinformatics for Beginners*. Academic Press, pp. 209–218. doi:10.1016/B978-0-12-410471-6.00009-8.
- Efron, B. (1982) *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans*. Monograph. Philadelphia: SIAM. doi:10.1137/1.9781611970319.
- Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammer, C., Jansen Van Vuuren, B., Matthee, C., Ruiz-Garcia, M., Catzeflis, F., Areskoug, V., Nguyen, T. T. y Couloux, A. (2012) "Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes", *Comptes Rendus - Biologies*, 335(1), pp. 32–50. doi:10.1016/j.crv.2011.11.002.
- Hassanin, A. y Douzery, E. J. P. (1999) "The Tribal Radiation of the Family Bovidae (Artiodactyla) and the Evolution of the Mitochondrial Cytochrome b Gene", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(2), pp. 227–243. doi:10.1006/mpev.1999.0619.
- Hebert, P. D. N. y Ratnasingham, S. (2007) "The Barcode of Life Data System BOLD", *Molecular Ecology Notes*, 7(3), pp. 355–364. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016) "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets", *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp. 1870–1874. doi:10.1093/MOLBEV/MSW054.
- Kumar, S., Suleski, M., Craig, J. M., Kaspruwicz, A. E., Sanderford, M., Li, M., Stecher, G. y Hedges, S. B. (2022) "TimeTree 5: An Expanded Resource for Species Divergence Times", *Molecular Biology and Evolution*. Oxford University Press, 39(8), pp. 1–6. doi:10.1093/molbev/msac174.
- Nei, M. y Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Oyston, J. W., Wilkinson, M., Ruta, M. y Wills, M. A. (2022) "Molecular phylogenies map to biogeography better than morphological ones", *Communications Biology*. Springer US, 5(1), pp. 1–12. doi:10.1038/s42003-022-03482-x.
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., Tse, T., Wang, J., Williams, R., Trawick, B. W., Pruitt, K. D. y Sherry, S. T. (2022)

"Database resources of the national center for biotechnology information", *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 50(D1), pp. D20–D26. doi:10.1093/nar/gkab1112.

Tajima, F. (1993) "Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis", *Genetics*, 135(2), pp. 599–607. doi:10.1093/genetics/135.2.599.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994) "CLUSTAL W (improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice)", *Nucleic Acids Research*, 22(22), pp. 4673–4680. doi:10.1093/NAR/22.22.4673.

Toljagić, O., Voje, K. L., Matschiner, M., Liow, L. H. y Hansen, T. F. (2018) "Millions of Years Behind: Slow Adaptation of Ruminants to Grasslands", *Systematic Biology*, 67(1), pp. 145–157. doi:10.1093/sysbio/syx059.

Warnow, T. (2021) "Revisiting Evaluation of Multiple Sequence Alignment Methods", *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). *Methods Mol Biol*, 2231, pp. 299–317. doi:10.1007/978-1-0716-1036-7_17.

Yang, S. y De Angelis, D. (2013) "Maximum Likelihood", in Reisfeld, B. (ed.) *Computational Toxicology*. vol. 930. Fort Collins: Humana Press, pp. 581–595. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-62703-059-5_24.

Zhao, F., Lin, G. y Huang, Z. (2018) "Variation of the Bovidae (Mammalia: Artiodactyla) mitochondrial DNA control region and their phylogenetic relationship", *Mitochondrial DNA Part B: Resources*. Taylor & Francis, 3(2), pp. 792–793. doi:10.1080/23802359.2018.1492885.

Anexos

Anexo 1. Listado de especies utilizadas en el análisis filogenético de los bóvidos. El Código se refiere al identificador de la secuencia de la mitocondria completa en el NCBI.

Nombre científico	Nombre común	Código	Lugar de procedencia
AEPYCEROTINAE			
<i>Aepyceros melampus</i>	Impala	JN632592	Kenia a Sudáfrica
ALCELAPHINAE			
<i>Alcelaphus buselaphus</i>	Búbalo común	JN632593	Marruecos a Sudáfrica
<i>Alcelaphus lichtensteinii</i>	Antílope de Lichtenstein	JN632594	África central
<i>Connochaetes gnou</i>	Ñu negro	JN632626	África austral
<i>Connochaetes taurinus</i>	Ñu azul	JN632628	África oriental y austral
<i>Damaliscus pygargus</i>	Bontebok	FJ207530	Sudáfrica y Lesoto
ANTILOPINAE			
<i>Antidorcas marsupialis</i>	Gacela saltarina de El Cabo	JN632596	África austral
<i>Antilope cervicapra</i>	Antílope negro	JN632598	India, Pakistán y Nepal
<i>Dorcatragus megalotis</i>	Beira	JN632631	Etiopía, Somalia y Yibuti
<i>Eudorcas rufifrons</i>	Gacela de frente roja	JN632634	África central
<i>Gazella bennettii</i>	Chinkara	JN632635	India, Pakistán, Afganistán e Irán
<i>Gazella cuvieri</i>	Gacela de Cuvier	JN632636	Cordillera del Atlas
<i>Gazella dorcas</i>	Gacela dorcas	JN632637	Norte de África
<i>Gazella erlangeri</i>	Gacela de Neumann	JN632639	Arabia Saudita y Yemen
<i>Gazella gazella</i>	Gacela árabe	JN632640	Península árabe
<i>Gazella leptoceros</i>	Gacela de Loder	JN632641	Del desierto del Sahara al oeste del Nilo
<i>Gazella spekei</i>	Gacela de Speke	JN632642	Cuerno de África
<i>Gazella subgutturosa</i>	Gacela persa	JN632644	Irán, Pakistán y Asia Central
<i>Litocranius walleri</i>	Gerenuc	JN632653	África oriental
<i>Madoqua kirkii</i>	Didic de Kirk	JN632654	Este y suroeste de África
<i>Madoqua saltiana</i>	Didic de Salt	JN632655	Este de África

Nombre científico	Nombre común	Código	Lugar de procedencia
<i>Nanger dama</i>	Gacela dama	JN632665	Níger, Malí, Chad, Argelia y Marruecos
<i>Nanger granti</i>	Gacela de Grant	JN632666	África oriental
<i>Nanger soemmerringii</i>	Gacela de Soemmerring	JN632667	Cuerno de África
<i>Neotragus batesi</i>	Antílope pigmeo de Bates	JN632668	África central y occidental
<i>Neotragus moschatus</i>	Suni	JN632669	África del este
<i>Oreotragus oreotragus</i>	Saltarrocas	JN632675	Este y suroeste de África
<i>Ourebia ourebi</i>	Oribí	JN632680	África
<i>Pantholops hodgsonii</i>	Chirú	NC_007441	Meseta tibetana
<i>Procapra gutturosa</i>	Gacela de Mongolia	JN632689	Mongolia, China y Siberia
<i>Raphicerus campestris</i>	Raficero común	JN632693	África oriental y austral
<i>Saiga tatarica</i>	Saiga	JN632700	Asia central

BOVINAE

<i>Bison bison</i>	Búfalo	JN632601	América del Norte
<i>Bison bonasus</i>	Bisonte europeo	JN632602	Europa
<i>Bos gaurus</i>	Bisonte de la India	JN632604	India, Nepal e Indochina
<i>Bos grunniens</i>	Yak	NC_006380	Asia central e Himalaya
<i>Bos indicus</i>	Cebú	EU177868	Asia
<i>Bos javanicus</i>	Banteng	JN632606	Indochina, Malaca, Sumatra, Java y Borneo
<i>Bos taurus</i>	Vaca/toro doméstico	EU177832	Cosmopolita
<i>Boselaphus tragocamelus</i>	Nilgó	EF536350	India
<i>Bubalus bubalis</i>	Búfalo de agua	AF547270	Sudeste asiático
<i>Bubalus carabanensis</i>	Carabao	JN632607	Filipinas y Guam
<i>Bubalus depressicornis</i>	Anoa de llanura	EF536351	Islas Célebes y Buton
<i>Pseudoryx nghetinhensis</i>	Saola	EF536352	Montes Annamitas, Laos
<i>Syncerus caffer</i>	Búfalo cafre	EF536353	África subsahariana, Centroáfrica y Sudáfrica
<i>Taurotragus derbianus</i>	Eland gigante	EF536354	Senegal, Sudán del Sur y Camerún
<i>Tetracerus quadricornis</i>	Antílope de cuatro cuernos	EF536355	India y Nepal
<i>Tragelaphus angasii</i>	Nyala	JN632702	África austral

Nombre científico	Nombre común	Código	Lugar de procedencia
<i>Tragelaphus eurycerus</i>	Bongo	JN632703	Selvas africanas
<i>Tragelaphus imberbis</i>	Kudú menor	EF536356	África oriental
<i>Tragelaphus oryx</i>	Eland común	JN632704	África austral
<i>Tragelaphus scriptus SA</i>	Antílope jeroglífico	JN632706	Sudáfrica
<i>Tragelaphus scriptus CA</i>	Antílope jeroglífico	JN632705	Camerún
<i>Tragelaphus scriptus TN</i>	Antílope jeroglífico	JN632707	Tanzania
<i>Tragelaphus spekii</i>	Sitatunga	EF536357	África central
<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	Kudú mayor	JN632708	África austral y oriental
CAPRINAE			
<i>Ammotragus lervia</i>	Arruí	FJ207522	Sahara y Sahel
<i>Arabitragus jayakari</i>	Tar árabe	FJ207523	Emiratos Árabes Unidos y Omán
<i>Budorcas taxicolor</i>	Takín	FJ207524	Himalaya
<i>Capra caucasica</i>	Tur del Caucásico occidental	JN632609	Azerbaiyán, Rusia y Georgia
<i>Capra falconeri</i>	Marjor	FJ207525	Asia central e Himalaya
<i>Capra hircus</i>	Cabra	GU295658	Cosmopolita
<i>Capra ibex</i>	Íbice alpino	FJ207526	Cordillera de los Alpes
<i>Capra nubiana</i>	Íbice nubio	FJ207527	África del norte, Nubia y Oriente Próximo
<i>Capra pyrenaica</i>	Cabra montés	FJ207528	Francia, Andorra, España y Portugal
<i>Capra sibirica</i>	Íbice asiático	FJ207529	Asia central
<i>Capricornis crispus</i>	Serau japonés	FJ207533	Japón
<i>Capricornis milneedwardsii</i>	Serau chino	FJ207534	China y sudeste de Asia
<i>Capricornis swinhoei</i>	Serau de Formosa	NC_010640	Taiwán
<i>Hemitragus jemlahicus</i>	Tar del Himalaya	FJ207531	Himalaya
<i>Naemorhedus baileyi</i>	Goral rojo	JN632663	China, India y Birmania
<i>Naemorhedus griseus</i>	Goral gris	FJ207532	China, India, Birmania, Tailandia y Vietnam
<i>Oreamnos americanus</i>	Cabra blanca	FJ207535	Noroeste de América
<i>Ovibos moschatus</i>	Buey almizclero	FJ207536	Groenlandia, Canadá y Rusia
<i>Ovis aries</i>	Oveja doméstica	NC_001941	Cosmopolita

Nombre científico	Nombre común	Código	Lugar de procedencia
<i>Pseudois nayaur</i>	Baral	FJ207537	Himalaya
<i>Rupicapra pyrenaica</i>	Rebeco pirenaico	FJ207538	Suroeste de Europa
<i>Rupicapra rupicapra</i>	Rebeco	FJ207539	Europa
CEPHALOPHINAE			
<i>Cephalophus adersi</i>	Duiker de Ader	JN632611	Tanzania y Kenia
<i>Cephalophus callipygus</i>	Duiker de Peters	JN632613	Oeste de África central
<i>Cephalophus dorsalis</i>	Duiker bayo	JN632615	Gabón, Sierra Leona, Liberia, Ghana, Benín, Camerún y Congo
<i>Cephalophus jentinki</i>	Duiker de Jentink	JN632616	Liberia, Costa de Marfil y Sierra Leona
<i>Cephalophus leucogaster</i>	Duiker de vientre blanco	JN632617	África central
<i>Cephalophus natalensi</i>	Duiker rojo de Natal	JN632618	Malawi, Mozambique y Tanzania
<i>Cephalophus nigrifrons</i>	Duiker de frente negra	JN632619	África central y Angola
<i>Cephalophus ogilbyi</i>	Duiker de Ogilby	JN632620	Sierra Leona, Liberia, Ghana, Guinea Ecuatorial y Gabón
<i>Cephalophus rufilatus</i>	Duiker de flancos rojos	JN632621	África central
<i>Cephalophus silvicultor</i>	Duiker de lomo amarillo	JN632622	África occidental y central
<i>Cephalophus spadix</i>	Duiker de Abbott	JN632623	Tanzania
<i>Philantomba maxwellii</i>	Duiker de Maxwell	JN632685	Senegal, Gambia y Nigeria
<i>Philantomba monticola</i>	Duiker azul	JN632686	África central y austral
<i>Sylvicapra grimmia</i>	Duiker común	JN632701	África subsahariana
HIPPOTRAGINAE			
<i>Addax nasomaculatus</i>	Addax	JN632591	Mauritania, Níger y Chad
<i>Hippotragus equinus</i>	Antílope ruano	JN632647	África central y austral
<i>Hippotragus niger</i>	Antílope sable	JN632648	Sureste de África
<i>Oryx beisa</i>	Órix beisa	JN632676	Kenia y Cuerno de África
<i>Oryx dammah</i>	Órix de cuernos de cimitarra	JN632677	Marruecos y Túnez (extinto en estado salvaje)
<i>Oryx gazella</i>	Órix del Cabo	JN632678	África austral
<i>Oryx leucoryx</i>	Órix de Arabia	JN632679	Península arábiga

Nombre científico	Nombre común	Código	Lugar de procedencia
PELEINAE			
<i>Pelea capreolus</i>	Antflope cabrío	JN632684	África austral
REDUNCINAE			
<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Antflope acuático	JN632651	África subsahariana
<i>Kobus leche</i>	Antflope Lechwe	JN632652	Congo, Botsuana y Zambia
<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Redunca meridional	JN632694	África austral
<i>Kobus leche</i>	Redunca de montaña	JN632695	África subsahariana
OUTGROUP (Artiodactyla, Giraffidae)			
<i>Giraffa camelopardalis</i>	Jirafa	JN632645	Angola