

**Universidad Nacional  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Escuela de Ciencias Biológicas**

**Informe Escrito Final**

Determinación de los patrones de orden de genes del genoma mitocondrial del *Paropisthopatus* sp. con respecto a otros onicóforos y al artrópodo (*Limulus polyphemus*) por medio de la bioinformática

**Katherine Andrea González Picado (117100637)  
Carné: 165009**

**Tutor: M.Sc. Bernal Morera Brenes**

**Asesores: Dr. Federico Villalobos Brenes y Dr. Frank Solano Campos**

**Campus Omar Dengo**

**Heredia, Costa Rica**

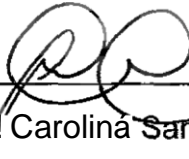
**Marzo, 2023**

Este trabajo de graduación fue APROBADO por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



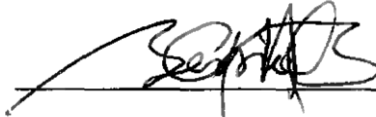
---

M.Sc. Rodolfo Umaña Castro  
Representante, Decano, quién preside



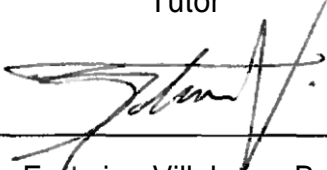
---

M.Ed. Carolina Sancho Blanco  
Representante Unidad Académica



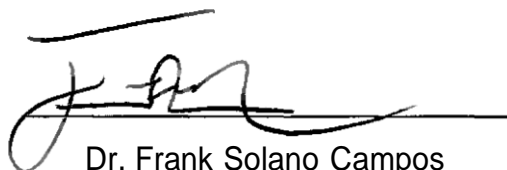
---

M.Sc. Bernal Morera Brenes  
Tutor



---

Dr. Federico Villalobos Brenes  
Asesor



---

Dr. Frank Solano Campos  
Asesor



---

M.Sc. Julián Monge Nájera  
Invitado especial

## **Agradecimiento**

Para el presente trabajo agradezco primeramente a Dios por ser mi guía e inspirador, por acompañarme en el transcurso de mi vida académica, brindándome paciencia y sabiduría en este proceso de obtener uno de mis anhelos más deseados. Quiero agradecer también a mis padres, por todo su amor, trabajo y sacrificio en estos años, gracias a ellos he podido culminar con éxito todas mis metas propuestas y convertirme en lo que soy hoy.

Un agradecimiento muy especial a mis docentes de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Costa Rica, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi profesión, de manera especial, al M.Sc. Bernal Morera Brenes tutor de esta tesis, y a mis asesores de tesis Dr. Federico Villalobos Brenes y Dr. Frank Solano Campos quienes me han guiado con su paciencia y experiencia para la realización de esta investigación. Y de forma especial al Dr. Sergio Vargas por toda la ayuda brindada con la secuenciación de la muestra. Para finalizar, un agradecimiento a todas las personas que me han brindado su apoyo y han hecho que el trabajo se llevará a cabo con éxito.

## **Dedicatoria**

Dedico el presente trabajo a Dios quien como guía ha estado en el camino de mi vida, me ha bendecido y me ha dado la fuerza para perseguir mis metas sin rendirme.

También quiero dedicar esta tesis a mi familia que ha sido un apoyo a lo largo de esta trayectoria académica y durante toda mi vida, pues con su amor, dedicación y comprensión me han permitido llevar a cabo mi carrera y han hecho de mí una mejor profesional.

A todas las personas especiales que, con su apoyo incondicional y confianza han contribuido a la formación de mi carrera profesional y a mi vida personal.

# Índice

Miembros del tribunal	I
Agradecimiento	II
Dedicatoria	III
Índice	IV
Índice de figuras	VI
Abreviaturas o acrónimos	VII
Resumen	VIII
1. Introducción	11
1.1 Antecedentes	11
1.2 Justificación	13
1.3 Planteamiento del problema	14
1.4 Objetivos	14
1.4.1 Objetivo general	15
1.4.2 Objetivos específicos	15
2. Marco Teórico	15
2.1 Onicóforos: habitantes secretos del bosque	15
2.1.1 Descripción general de los onicóforos	15
2.1.2 Mecanismo de defensa e importancia biotecnológica	17
2.2 Características del género <i>Paropisthopatus</i> (Ruhberg, 1985)	18
2.3 Posición filogenética de onicóforos y artrópodos	18
2.3.1 Relaciones evolutivas	18
2.4 Características del genoma mitocondrial animal	19
2.4.1 Generalidades sobre el genoma	19
2.4.2 Uso del genoma mitocondrial como herramienta para estudiar las relaciones evolutivas animales	20
2.5 Técnicas moleculares y herramientas bioinformáticas para la construcción del genoma mitocondrial	21
2.5.1 Amplificación y secuenciación de la secuencia de ADN	21
2.5.2 Construcción del genoma mitocondrial por medio de herramientas como GetOrganelle y Geneious R9	22
2.5.3 Anotación de genes	23
2.6 Herramientas bioinformáticas para la construcción del árbol filogenético y su visualización a nivel de orden genómico	23
2.6.1 Mesquite para agrupamiento de secuencias de ADN	23

2.6.2	Análisis evolutivo bayesiano y construcción del árbol filogenético	23
2.6.3	Visualización genómica por medio de Mauve Alignment	24
3.	Marco Metodológico	25
3.1	Extracción de ADN del <i>Paropisthopatus</i> sp.	25
3.2	Calidad e integridad del ADN	25
3.3	Amplificación del gen COI por medio de la técnica de PCR	26
3.4	Secuenciación del ADN del <i>Paropisthopatus</i> sp. por medio del secuenciador Illumina	26
3.5	Comprobación de la calidad de las lecturas	27
3.6	Ensamblaje del mitogenoma a partir de las lecturas utilizando GetOrganelle	27
3.7	Ensamblaje del genoma mitocondrial del <i>Paropisthopatus</i> sp. utilizando Geneious R9	28
3.8	Uso del servidor web MITOS para realizar anotaciones	28
3.9	Formación de archivos Nexus por medio del programa Mesquite	28
3.10	Generación de archivos XML en BEAUti	29
3.11	Corrida de los archivos XML por medio de BEAST	30
3.12	Análisis de datos por medio de Tracer y combinación de archivos por medio de LogCombiner	30
3.13	Creación y visualización del árbol filogenético	30
3.14	Visualización del orden de genes mitocondriales con Mauve y Microsoft Excel	30
4.	Resultados	31
4.1	Extracción y cuantificación de ADN del <i>Paropisthopatus</i> sp.	31
4.2	La integridad del ADN extraído	32
4.3	Visualización de la calidad de las lecturas después de realizar la secuenciación del genoma por medio del secuenciador Illumina HiSeq	33
4.4	Construcción y anotación del genoma mitocondrial	36
4.5	Comparación del orden de genes mitocondriales de diversos onicóforos y un artrópodo con respecto al organismo de estudio	37
5.	Discusión	43
5.1	Derivación del arreglo de genes mitocondriales	43
5.2.	Orden de genes mitocondriales ancestrales en Onychophora	44
5.3.	Barreras geográficas como proceso clado-genético complejo presente en Onychophora	46
5.4	Análisis filogenético	47
6.	Conclusiones	48
7.	Recomendaciones	49
8.	Referencias bibliográficas	49

## Índice de figuras

Figura 1. Visualización del ADN íntegro del <i>Paropisthopatus</i> sp. en gel de agarosa al 1%	32
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los resultados de la PCR del gen COI	32
Figura 3. Calidad de las lecturas del organismo en estudio visualizadas por medio del programa FASTQC	33
Figura 4. Distribución del porcentaje de bases nucleotídicas de las lecturas del <i>Paropisthopatus</i> sp. por medio del programa FASTQC	34
Figura 5. Distribución del porcentaje total de GC de las lecturas del <i>Paropisthopatus</i> sp. por medio del programa FASTQC	35
Figura 6. Porcentaje de contaminación por adaptadores en las lecturas del <i>Paropisthopatus</i> sp. por medio del programa de visualización FASTQC	35
Figura 7. Genoma mitocondrial del <i>Paropisthopatus</i> sp. ensamblado por medio de los programas bioinformáticos GetOrganelle y Geneious R9	37
Figura 8. Alineamiento múltiple de mitogenomas de diversas especies de onicóforos por medio del programa Mauve para identificar reordenamientos	39
Figura 9. Alineamiento múltiple de dos especies de onicóforos y un artrópodo por medio del programa Mauve para identificar reordenamientos	40
Figura 10. Listado del orden de los genes en el genoma mitocondrial de seis distintas especies de onicóforos	41
Figura 11. Árbol filogenético de las diversas especies de onicóforos	42

## Abreviaturas o acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNt	Ácido ribonucleico transferente
ATP	Trifosfato de adenosina
COI	Citocromo oxidasa 1
COII	Citocromo oxidasa 2
COIII	Citocromo oxidasa 3
Cytb	Citocromo b
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FASTA	Formato de fichero informático basado en texto
FASTQC	A quality control tool for high throughput sequence data
LABSGE	Laboratorio de Sistemática, Genética y Evolución
MCMC	Cadena de Markov Monte Carlo
MEGA	Análisis de genética evolutiva molecular
MESQUITE	Sistema modular para el análisis evolutivo
MITOS	Anotación mejorada del genoma mitocondrial de metazoos de novo
N	Aminoácido no identificado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
ND1	Nicotinamida adenina dinucleótida 1
ND4L	NADH-ubiquinona oxidorreductasa cadena 4L
ND6	Nicotinamida adenina dinucleótida 6
NGS	Secuenciación de última generación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa



## Resumen

Los onicóforos, conocidos también como gusanos de terciopelo presentan un endemismo muy marcado por su historia de vida, pues son considerados como fósiles vivientes debido a su larga trayectoria histórica en el planeta. Se clasifican en dos familias, Peripatopsidae, propia de zonas templadas y Peripatidae de zonas tropicales. El ADN mitocondrial es uno de los marcadores genéticos más usados para delimitar taxas, y diversos estudios realizados confirman la diversidad de los patrones de orden genético mitocondrial que están presentes entre los onicóforos, y cómo esto puede ser útil para aclarar la filogeografía de Onychophora y su relación con otros organismos diferentes a su filo pues Onychophora es un filo relativamente pequeño dentro de Ecdysozoa, y se considera que es el grupo hermano de “Arthropoda”. Tradicionalmente, para complementar estudios se han utilizado los árboles filogenéticos, pues este sistema de clasificación se encarga de demostrar las diferentes relaciones existentes con respecto a la evolución entre las especies que se consideran tienen una descendencia en común. Por lo tanto, en este estudio se analizó el patrón de orden genético mitocondrial del *Paropisthopatus* sp., con respecto a otros onicóforos, especialmente el *Opisthopatus cinctipes*, y el artrópodo *Limulus polyphemus*, y se encontró que la región ARN L – ND1 – CYTB en el organismo de estudio presenta un reordenamiento de genes al compararlo con estas otras dos especies que poseen el mismo orden genético. El análisis del árbol filogenético nos permitió concluir que el *Paropisthopatus* sp. se ubica en el mismo clado del *O. cinctipes* con un valor del 66% que representa su parentesco a pesar de las diferencias geográficas que los separa, y se posiciona al artrópodo como grupo externo con el cual comparten un ancestro en común. Concluyendo que los factores de aislamiento físico usualmente son el resultado de cambios geográficos o de la propagación de organismos en nuevos territorios, siendo esta la forma más común de especiación en los animales. De modo que la separación de estas taxa siguió un patrón de varianza que concuerda con la ruptura tectónica de Gondwana en Sudamérica y África.

# 1. Introducción

## 1.1 Antecedentes

Los onicóforos, o peripatos como se les llama comúnmente, han sido reconocidos como “fósiles vivientes” debido a que han permanecido en el planeta por más de 500 millones de años y su morfología no ha cambiado mucho (Morera, 2012). El filo Onychophora, conocido también como gusanos aterciopelados, pertenece a un pequeño grupo de ecdysozoos (invertebrados terrestres y acuáticos) (Nielsen, 2001). Se conocen alrededor de 180 especies de onicóforos, los cuales se dividen en dos familias alopátricas: Peripatidae, la cual se distribuye de América Central a Suramérica, África occidental y el sureste de Asia; y la familia Peripatopsidae que se encuentra en Sudáfrica, Australia, Nueva Guinea, Nueva Zelanda y América del Sur (Oliveira et al., 2012a).

Costa Rica, al estar ubicada en la región Neotropical, alberga diversas especies de la familia Peripatidae, tales como: *Epiperipatus biolleyi* (Bouvier, 1902a), *Epiperipatus isthmicola* (Bouvier, 1902b), *Peripatus ruber* (Fuhrmann, 1913), *Macroperipatus valerioi* (Morera & León, 1986), *Epiperipatus hilkae* (Morera & Monge, 1990), *Peripatus solorzanoi* (Morera & Monge, 2010), y *Principapillatus hitoyensis* (Oliveira et al., 2012a), y la más reciente *Mongeperipatus keköldi* (González, Sánchez & Morera, 2020) ubicada en la provincia de Limón. A pesar de que se encuentran distribuidos en varias partes del mundo, los gusanos de terciopelo del país se encuentran dentro de las especies más estudiadas a nivel taxonómico, así como en otros campos de la biología (Barquero et al., 2016; Morera, 2012).

La genética y la genómica brindan nuevo conocimiento y el aporte de mucha información referente a la taxonomía de este grupo de organismos (Rota et al., 2010; Jeffery et al., 2012; Oliveira et al., 2012b). Por ejemplo, puede brindar información acerca del contenido y el tamaño del genoma de una especie, el cual a su vez se relaciona con el tamaño de sus células, su fisiología y desarrollo (Gregory, 2001a, b; Bennett & Leitch, 2005). Es así como en un estudio realizado por Jeffery et al. (2012) se muestrearon onicóforos de la familia

Peripatidae (*Eoperipatus* sp., *Epiperipatus* sp., *Principapillatus hitoyensis* y *Epiperipatus biolleyi*), así como de la familia Peripatopsidae (*Oroperipatus hispidus*, *Phalloecephale tallagandensis*, *Euperipatoides rowelli* y *Euperipatoides kanangrensis*) de diferentes continentes tales como; América (Costa Rica y Brasil), Asia (Tailandia) y Oceanía (Australia). Este filo posee especies con uno de los genomas más grandes en los invertebrados, sin embargo, esto no es una limitante para los estudios de secuenciación utilizando herramientas genómicas. Tanto así, que los onicóforos representan un buen sistema modelo para investigar la evolución de genomas grandes, a pesar de las propuestas de restricciones de tamaño del cuerpo, desarrollo y modo de reproducción, las cuales son las responsables de haber limitado el tamaño del genoma junto con los tardígrados y demás artrópodos (Gregory, Hebert & Kolasa 2000; Gregory 2002 y Wyngaard et al., 2005).

El clado de animales de muda reconocido como Ecdysozoa comprende gran cantidad de especies animales, sin embargo, las relaciones evolutivas dentro de este clado aún siguen sin ser resueltas, lo cual hace que la interpretación de los estudios genómicos comparativos no sea tan precisa (Rota et al., 2010). Entre los temas más polémicos que presenta la sistemática de Ecdysozoa, se encuentran las relaciones entre los tres filos Panarthropoda (Arthropoda, Onychophora y Tardígrada). Para ello Rota et al., (2010) analizaron diversas secuencias completas del genoma mitocondrial de dos tardígrados; *Hypsibius dujardini* y *Thulinia* sp., un priapulido; *Halicryptus spigulosus*, y tres onicóforos; *Peripatoides* sp., *Epiperipatus biolleyi*, una secuencia parcial de *Euperipatoides kanangrensis* y el artrópodo *Limulus polyphemus*. Los genomas mitocondriales de los tardígrados se asemejan más al de los artrópodos, esto debido a la similitud que presentan en el orden de los genes y la asimetría de filamentos, mientras que los genomas mitocondriales del filo Onychophora presentan reordenamientos en el orden de genes.

El estudio realizado por Braband et al., (2010a) confirma la diversidad de los patrones de orden genético mitocondrial que hay entre los onicóforos, y cómo esto puede ser útil para aclarar la filogeografía del filo Onychophora y de su relación filogenética con otros organismos de filos relacionados. Se tomaron genomas mitocondriales de tres especies de onicóforos las cuales revelaron diferentes patrones de orden de genes, es decir, altamente

conservados en un representante de Peripatopsidae (*Opisthopatus cinctipes*) y altamente variables en una especie de Peripatidae (*Epiperipatus biolleyi*), siendo esta información potencialmente importante para aclarar la filogenia entre los mismos onicóforos. Por otra parte, al analizar el genoma mitocondrial completo de otra especie perteneciente a la familia Peripatopsidae llamada *Metaperipatus inae*, y compararla con el orden genético ancestral ya descrito en Onychophora (ancestro común de Panarthropoda), se encontró que *M. inae* muestra muchos reordenamientos, sin embargo, los genes del ARN ribosómico y de codificación de proteínas no presentan alteración en cuanto a reordenamientos.

Los análisis moleculares realizados hasta ahora demuestran que los onicóforos son parientes cercanos de los tardígrados y los artrópodos. Esta cercanía evolutiva se puede observar en las similitudes en el orden de genes mitocondriales. Braband et al., (2010b) compararon el genoma mitocondrial completo del onicóforo *Opisthopatus cinctipes* y los patrones de orden de genes mitocondriales entre el artrópodo *Limulus polyphemus* y otros onicóforos como *M. inae*, y llegaron a concluir que estos organismos antes mencionados (*Opisthopatus cinctipes* y *Limulus polyphemus*) presentaron una disposición idéntica en trece genes codificadores de proteínas, doce genes de ARN transferente, dos genes ribosomales y la región de control. Por ende, se concluyó que posiblemente este arreglo se debe a una característica ancestral de los onicóforos que de igual forma estuvo presente en el ancestro común de Onychophora y Arthropoda.

## 1.2 Justificación

Los onicóforos son organismos poco conocidos, por ende, la importancia de estos tiene como fundamento los requisitos ecológicos cosmopolitas. El hábitat de estos organismos presenta condiciones húmedas y los tipos de vegetación tienen grandes implicaciones de conservación, por ende, la protección de estas áreas debe de ser de importancia en la planificación de la conservación donde habitan estos seres (Trewick, 1999). Por otra parte, los estudios que implementan la secuenciación mitocondrial son escasos, ya que actualmente solo se han secuenciado y publicado los genomas mitocondriales completos de: *Epiperipatus biolleyi* (Podsiadlowski, Kohlhagen & Koch, 2007), *Metaperipatus inae*

(Braband et al., 2010a), *Opisthopatus cinctipes* (Braband et al., 2010b) y *Oroperipatus* sp. (Segovia et al., 2011). Estos trabajos han permitido estudiar la relación que existe entre los filos Onychophora y Arthropoda, en donde se han logrado encontrar similitudes en cuanto al patrón de orden de los genes mitocondriales, es decir, que se ha logrado visualizar que las diferentes especies presentan los mismos genes, ubicados en la misma posición o se llegan a encontrar muy cerca, confirmando así su posible parentesco, sin embargo, aún hay muchos puntos que no se han aclarado.

Por ello, esta investigación tiene como propósito brindar a la comunidad científica la primera secuencia del genoma mitocondrial del *Paropisthopatus* sp. proveniente de Chile, para descifrar las relaciones filogenéticas y entender su proceso evolutivo por medio de los mitogenomas de los organismos de su mismo filo y un organismo del filo Arthropoda utilizando la Bioinformática como rama de la Biotecnología. Esto para ayudar a los biólogos evolutivos a comprender la variación biológica y genética, el origen geográfico y la dispersión de poblaciones de especies por medio del ADN mitocondrial, evaluando cómo se comparten y distribuyen estas variaciones. Además, se resalta la trascendencia de los resultados obtenidos en esta tesis para la Escuela de Ciencias Biológicas debido a que es el primer estudio que involucra el tema de evolución del orden de genes mitocondriales en una especie nueva no secuenciada, siendo de utilidad para futuros trabajos científicos ya que describe las variaciones encontradas en el genoma mitocondrial del *Paropisthopatus* sp ayudando a esclarecer las relaciones filogenéticas con respecto a organismos de su misma especie y artrópodos.

### **1.3 Planteamiento del problema**

En cuanto al patrón de orden de los genes del genoma mitocondrial de *Paropisthopatus* sp., ¿cuáles son las similitudes y diferencias que presenta el organismo con respecto a ciertos onicóforos y un artrópodo?

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Comparar los patrones de orden de genes del genoma mitocondrial de *Paropisthopatus* sp. con respecto al del artrópodo *Limulus polyphemus* y otras especies de onicóforos por medio de la bioinformática para una mejor comprensión de su relación evolutiva.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la secuencia del ADN mitocondrial de *Paropisthopatus* sp. por medio de la secuenciación de próxima generación.
- Construir el genoma mitocondrial de *Paropisthopatus* sp. mediante ensamblaje *de novo* por medio del uso de herramientas bioinformáticas.
- Identificar el patrón de orden de genes del genoma mitocondrial de *Paropisthopatus* sp. comparando con otras especies de onicóforos y el artrópodo *Limulus polyphemus*.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Onicóforos: habitantes secretos del bosque

#### 2.1.1 Descripción general de los onicóforos

El filo Onychophora (del griego portadores de uñas) comprende organismos invertebrados parecidos a las orugas o gusanos, conocidos comúnmente como peripatos por

el género *Peripatus* (Guilding, 1825), o como gusanos aterciopelados por su aspecto. Estos animales son carnívoros, poseen cuerpo vermiforme, blando, y no poseen metamerización externa (Peck, 1975; Barnes, 1986). Los onicóforos son animales que habitan en la vegetación húmeda comprendida de hojarasca, troncos descompuestos, grietas en la tierra, etc. Se encuentran principalmente en los bosques primarios y secundarios poco alterados por el ser humano, y cada hallazgo realizado corresponde a eventos de casualidad tal como lo expone Morera (2012) ya que son de hábitos nocturnos. Estos organismos son más activos en la noche, debido a que cambian de madriguera por un lapso de treinta horas y se ocultan del sol la mayoría del tiempo, también evitan la exposición a la luz de diferente longitud de onda, especialmente la amarilla (565-590 nm) y azul (450-485nm) (Morera, 2012).

Este grupo, desde el punto de vista evolutivo, es considerado como fósil viviente debido a que han permanecido en el planeta por muchos millones de años sin presentar cambios considerables en su morfología (Morera, 2012). Sin embargo, se menciona que los peripatos están emparentados con los artrópodos a pesar de no presentar articulaciones en sus numerosos pares de apéndices llamados oncópodos o lobopodios (Nielsen, 2001). La locomoción de estos organismos es muy peculiar debido a que los lobopodios (lóbulos cónicos) están ubicados en posición ventrolateral que terminan con un tipo de garra o uña. Cuando el gusano aterciopelado comienza a caminar, cada lobopodio desciende sobre tres o seis almohadillas distales. Esta forma de locomoción se logra por la acción de las patas, su extensión y contracción con respecto al cuerpo (Morera, 2012).

Por otro lado, estos organismos se dividen en dos familias: Peripatidae y Peripatopsidae. La primera es sobre todo de distribución ecuatorial, América Neotropical, el Caribe (no incluye a Cuba), algunas zonas de África, Malasia, Borneo, Sumatra y laderas del Himalaya. La segunda familia se distingue por ser de distribución austral con organismos hallados en África del sur, Nueva Zelanda, Australia, Tasmania y Chile (Clark, 1915; Peck, 1975; Barnes, 1986; Monge, 1994). Estos invertebrados poseen sexos separados, su fertilización se da en forma interna o externa, según la especie. Además, estas especies presentan dimorfismo sexual, ya que por lo general la hembra es más grande que el macho, y presenta mayor número de patas dependiendo de la especie. Los especímenes neotropicales presentan una característica importante que los diferencia debido a que los embriones en

gestación (quince meses) están conectados a un oviducto que cumple la función de una placenta, lo cual solo es común en mamíferos (Morera, 2012).

A nivel global, los onicóforos son escasos, ya que presentan baja densidad poblacional que dificulta tomar medidas para determinar su estado de conservación y proveer mecanismos para su protección y la de su hábitat, además de estudios sobre ecología y biogeografía (Rodríguez, 2011). Aunque estos organismos poseen un rol importante en los estudios de evolución animal, biogeografía y conservación (Monge, 1995; New, 1995), la taxonomía y diversidad de especies de este taxón no han sido bien estudiadas, por esta razón es importante seguir aprendiendo sobre estas especies, sus relaciones filogenéticas y evolutivas para entender más sobre ellas.

### **2.1.2 Mecanismo de defensa e importancia biotecnológica**

Una de las características peculiares de los onicóforos es su modo de caza y defensa, en el cual usan una secreción blanca pegajosa que se expulsa a través de sus extremidades modificadas conocidas como papilas orales (Baer et al., 2014). Su mecanismo de expulsión se da a escala micrométrica y la secreción contiene diversas sustancias que son consideradas de gran potencial comercial y biotecnológico ya que está formada de proteínas adhesivas y moléculas como lectinas, tensoactivos, polifenoles y péptidos con potencial antimicrobiano. La secreción adhesiva o goma viscosa está compuesta por un 90% de agua y 10% de proteínas, además de péptidos (Concha et al., 2015).

A pesar de que esta sustancia ha sido estudiada por diversos autores (Peck, 1975), recientemente se han descubierto diversas propiedades en donde se sugirió la posible fabricación de un material compuesto de fibras rígidas que puedan estirarse y regenerarse (Baer et al., 2017). Corrales et al., (2017) proponen en su trabajo de investigación que los estudios fisicoquímicos son necesarios para entender la relación que existe entre las estructuras y sus propiedades para la creación de un nuevo producto adhesivo de alta



resistencia inspirado en la goma de estos organismos, que pueda aplicarse en campos biomédicos en un futuro.

## **2.2 Características del género *Paropisthopatus* (Ruhberg, 1985)**

### **1. *Paropisthopatus umbrinus* (Johow, 1911)**

Esta especie tiene como sinónimo, *Peripatus (Peripatopsis) umbrinus* descrita por Johow (1911) y *Paropisthopatus umbrinus* descrita por Ruhberg (1985). Posee un holotipo que no se encuentra designado, localizado en Valparaíso, Chile. La descripción de la especie está en idioma español, y en cuanto a las observaciones principales esta especie requiere revisión, ya que no hay publicaciones de esta (Oliveira, Read & Mayer, 2012b).

### **2. *Paropisthopatus costesi* (Gravier & Fage, 1925)**

Posee de sinónimo *Opisthopatus costesi*, por nombramiento original de Gravier & Fage (1925) y cambió a *Paropisthopatus umbrinus* por Ruhberg (1985). Esta de igual forma presenta un holotipo que no está designado, originaria de Colchagua, Chile. A diferencia de la primera especie, esta fue descrita en idioma francés, y debido a datos imprecisos y ninguna publicación, esta especie está de igual forma bajo revisión (Oliveira, Read & Mayer, 2012b).

## **2.3 Posición filogenética de onicóforos y artrópodos**

### **2.3.1 Relaciones evolutivas**

Los quelicerados, miriápodos, crustáceos y hexápodos son parte del filo Arthropoda, conocido por ser el más numeroso, diverso y abundante del reino animal (Zhang, 2011; Zhang, 2013). Por este motivo, estos grupos llaman la atención de muchos investigadores, los cuales tratan de descubrir su éxito evolutivo. Algunas de las contribuciones que han ayudado a su exitosa especiación se deben a la compleja organización que presentan sus cuerpos (segmentaciones y tagmatización). A pesar de los grandes esfuerzos que realizan los

investigadores, aún quedan muchos vacíos sin resolver acerca de su evolución (Fortey & Thomas 1998; Minelli, Boxshall & Fusco, 2013).

Los artrópodos, onicóforos y tardígrados pertenecen al gran taxón llamado Panarthropoda que unidos al clado Cycloneuralia forman parte del superfilo Ecdysozoa. Sin embargo, las relaciones entre cada uno de estos clados no se han resuelto aún, por lo tanto, surgen varias hipótesis para describir las relaciones de estos tres grupos y su filogenia de linaje (Rota, Daley & Pisani, 2013). Estos supuestos difieren entre sí, ya que algunos consideran a los tardígrados como el grupo hermano del clado formado por onicóforos y artrópodos, mientras otros consideran a los onicóforos como el grupo hermano de los artrópodos y tardígrados (Campbell et al., 2011; Mayer et al., 2013).

Otras hipótesis no tan respaldadas mencionan al grupo Tardígrada y Onicófora como grupos hermanos de los artrópodos (Mallatt, Garey & Shultz, 2004; Mallatt & Giribet 2006; Rota et al., 2010) o incluso afirman a Panarthropoda como un grupo parafilético (Dunn et al., 2008; Hejnol et al., 2009; Rehm et al., 2011). Por ende, para llevar a cabo estos estudios evolutivos, independientemente si son realizados por medio de biología molecular o morfológicamente, se requiere de análisis comparativos (Harzsch 2006; Richter et al., 2010).

## **2.4 Características del genoma mitocondrial animal**

### **2.4.1 Generalidades sobre el genoma**

El ADN mitocondrial (ADNmt) codifica para tres subunidades del citocromo c oxidasa (COI, COII y COIII), para el citocromo b del citocromo c reductasa (Cyt b), para siete subunidades de NADH deshidrogenasa (ND1-ND6 y ND4L) y, por último, las subunidades seis y ocho del F<sub>0</sub> de la ATP sintasa (ATPasa 6 y 8). Las demás proteínas presentes en la mitocondria tales como (ADN y ARN polimerasas, proteínas del ribosoma y enzimas ubicadas en la matriz) están codificadas en el genoma nuclear y deben ser translocadas a la mitocondria. El genoma mitocondrial posee algunas características que lo hacen único y diferente de los demás genomas, debido a su pequeño tamaño, su bajo

porcentaje de G-C, y las variantes del código genético en ciertos organismos (Anderson et al., 1981; Chomyn et al., 1985). El tamaño promedio del genoma mitocondrial de doble cadena circular es de aproximadamente 16000 pares de bases, el tamaño suele ser similar entre las especies animales.

#### **2.4.2 Uso del genoma mitocondrial como herramienta para estudiar las relaciones evolutivas animales**

El estudio de los genomas mitocondriales animales hoy día ha sido una herramienta de importancia para estudiar las relaciones evolutivas por dos razones. La primera, es que los datos del ADNmt pueden ser utilizados para estudiar las relaciones filogenéticas, y la segunda, es que permiten estudiar la evolución de los reordenamientos génicos, brindando información valiosa para la construcción filogenética (Dowton, Castro & Austin, 2002; Bleidorn et al., 2007). La filogenia de los gusanos aterciopelados en las dos principales familias de onicóforos es incierta. Sin embargo, estudios previamente realizados de los genomas mitocondriales completos han revelado los dos patrones de disposición génica diferentes que presentan, es decir, desde muy conservados en un organismo de Peripatopsidae (*Opisthopatus cincipes*) hasta otro con muchas derivaciones en el representante de Peripatidae (*Epiperipatus biolleyi*), esto al compararlos con el genoma ancestral Onychophora (Panarthropoda), lo que sugiere que estos datos podrían ser útiles para aclarar la filogenia que existe entre los onicóforos (Braband et al., 2010a).

Al ser considerados como parientes cercanos a los artrópodos (Nielsen, 2001; Kusche et al., 2002; Mallatt & Giribet, 2006; Roeding et al., 2007; Dunn et al., 2008), el filo Onychophora representa un grupo importante para comprender la evolución de Panarthropoda y Ecdysozoa. Por lo tanto, Braband et al., (2010b) compararon el orden del genoma mitocondrial de tres especies de onicóforos, *O. cincipes* (Peripatopsidae; Braband et al., 2010b), *M. inae* (Peripatopsidae; Braband et al., 2010a) y *E. biolleyi* (Peripatidae; Podsiadlowski, Braband & Mayer, 2008), en donde se halló que los órdenes de genes en *M. inae* y *E. biolleyi* presentan muchas diferencias considerables al orden de genes reportados por varios artrópodos y el priapulido *Priapululus caudatus* (Webster et al., 2006, 2007). Estas

altas derivaciones de *E. biolleyi* podrían ser ocasionadas por eventos de translocación génica, mientras que en *M. inae* se deben a las extensas duplicaciones del genoma y una pérdida al azar de genes (Podsiadlowski, Braband & Mayer, 2008; Braband *et al.*, 2010a). Sin embargo, se logró mostrar que el genoma mitocondrial completo de *O. cinctipes*, posee un orden genético altamente conservado similar al encontrado en el artrópodo *Limulus polyphemus*.

## **2.5 Técnicas moleculares y herramientas bioinformáticas para la construcción del genoma mitocondrial**

### **2.5.1 Amplificación y secuenciación de la secuencia de ADN**

El descubrimiento del ADN (ácido desoxirribonucleico) por Watson y Crick (Mullis, 1990) ha sido uno de los descubrimientos más importantes para la historia. Desde ese momento, muchos científicos han mostrado interés en desarrollar protocolos rápidos y fáciles de reproducir que les permitan estudiar los ácidos nucleicos. Es así como ha surgido la técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual ha sido la herramienta principal en la biología molecular hasta hoy día, debido a la versatilidad que presenta como técnica para el análisis molecular (Ranjbar *et al.*, 2014).

Este método se ha ido perfeccionando con el tiempo implementando diferentes tipos de secuenciación, destacando hoy día las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés), tal es el caso de la secuenciación Illumina, la cual se utiliza para ensamblar genomas teniendo o no un genoma previo como referencia (Golan & Medvedev, 2013). La gran ventaja de la NGS es la cantidad, calidad y robustez de los datos, actualmente, el uso de la plataforma Illumina requiere de un pre-procesamiento del ADN, que involucra la fragmentación del mismo y la incorporación de secuencias adaptadoras, para crear una biblioteca adecuada para su posterior secuenciación (Rubio *et al.* 2020), tal y como lo mencionan Giribet & Edgecombe (2012) en su estudio sobre la reevaluación del árbol de la vida de los artrópodos.

### **2.5.2 Construcción del genoma mitocondrial por medio de herramientas como GetOrganelle y Geneious R9**

El programa bioinformático GetOrganelle (Jin et al., 2020) es conocido por incluir un grupo de herramientas de próxima generación encargado de ensamblar genomas de organelas a partir de la secuenciación completa de un organismo, incluyendo los genomas mitocondriales, tal es el caso del estudio realizado por Machado et al., (2021) donde utilizaron esta herramienta para secuenciar uno de los especímenes en estudio. Este programa incluye scripts y bibliotecas para seleccionar las lecturas correspondientes a la organela objetivo, pues realiza un ensamblaje de novo, llega a filtrar hasta generar configuraciones de genomas de orgánulos circulares de forma confiable. El procesamiento de lectura se lleva a cabo por medio del script “get\_organelle\_from\_reads.py”, el cual continúa con un comando de una sola línea como flujo de trabajo. Este script hace uso de las herramientas Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012), BLAST (Camacho et al., 2009), y SPAdes (Bankevich et al., 2012), así como las bibliotecas de Python (Numpy, Scipy, Sympy y sus dependencias).

Por otra parte, el programa Geneious (Kearse et al., 2012) está diseñado para ser una aplicación de software accesible y fácil de usar para organizar y analizar datos biológicos, con un enfoque en la secuenciación molecular y los tipos de datos relacionados. Geneious reúne una gran cantidad de fuentes de datos complementarias, métodos de análisis y herramientas de visualización, ya que se puede utilizar la herramienta como control de calidad de las lecturas, e implementar un mapeador de lecturas contra un mitogenoma cercano (genoma de referencia), para así poder unir, ordenar y ensamblar lecturas del genoma en estudio.

### **2.5.3 Anotación de genes**

MITOS (Servidor de anotación del genoma mitocondrial) (<http://mitos2.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>), es el servidor web que permite la anotación de novo de este tipo de genomas. Esta herramienta utiliza una estrategia novedosa basada en búsquedas BLAST de secuencias de proteínas previamente anotadas para una identificación más rápida de genes codificantes (Cock et al., 2009). MITOS requiere solamente de un archivo en formato FASTA y del código genético correspondiente. Este proceso lleva a cabo dos etapas en donde primero se identifican las secuencias candidatas para cada gen para luego unirlos y realizar una anotación final, tal como lo expone Bernt et al., (2013).

## **2.6 Herramientas bioinformáticas para la construcción del árbol filogenético y su visualización a nivel de orden genómico**

### **2.6.1 Mesquite para agrupamiento de secuencias de ADN**

Mesquite (Maddison & Maddison, 2021) es un software de biología evolutiva modular diseñado para ayudar a organizar y analizar datos comparativos sobre organismos. Hace hincapié en el análisis filogenético, pero algunos de sus módulos se ocupan de la genética de poblaciones, mientras que otros realizan análisis multivariados no filogenéticos. Debido a que es modular, los análisis disponibles dependen de los módulos instalados, Mesquite tiene además funciones para administrar datos, así como varias opciones de visualización; en los cuales, los nucleótidos de las secuencias de ADN se representan con colores en las celdas, de igual forma, se pueden adjuntar metadatos de muchos tipos a taxones, caracteres o celdas en la matriz para ayudar con la clasificación y manipulación de datos que se guardan en varias extensiones.

### **2.6.2 Análisis evolutivo bayesiano y construcción del árbol filogenético**

Los métodos de filogenia bayesiana se introdujeron en la década de 1990 (Rannala & Yang, 1996) y desde ese entonces han revolucionado la forma en que se analizan los datos de secuencias genómicas (Huelsenbeck et al., 2001). Diversos ejemplos de análisis incluyen, inferir la historia filogenética y la migración entre especies (Bloomquist, Lemey & Suchard, 2010). BEAST 2 es un programa multiplataforma para el análisis bayesiano de secuencias moleculares que usa la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC, por sus siglas en inglés). Puede usarse como un método para reconstruir filogenias, pero también es un punto de partida para comprobar hipótesis evolutivas sin restringir una topología del árbol (Johnson, 2021).

Barnes & Daniels (2020) en su estudio evolutivo de la estimación del tiempo de divergencia utilizan el programa BEAST 2 para el estudio de la sistemática del complejo de especies de *Peripatopsis* con la descripción de cinco nuevas especies. Para la visualización de los árboles filogenéticos se utiliza el programa FigTree, el cual está diseñado para visualizar gráficos de árboles filogenéticos y se caracteriza como un programa para generar figuras listas para su publicación (Rambaut, 2020). El software fue diseñado para mostrar árboles resumidos y anotados producidos por BEAST según Rambaut (2007).

### **2.6.3 Visualización genómica por medio de Mauve Alignment**

Mauve, conocido como Alineación Múltiple de Secuencia Genómica Conservada con Reordenamientos (Darling et al., 2004), representa un método para identificar y alinear el ADN genómico conservado en presencia de reordenamientos y translocaciones. Mauve presenta el primer sistema de alineación que integra el análisis de eventos evolutivos a gran escala con la alineación de multisequencia tradicional. Este programa es de uso sencillo y presenta, más sensibilidad que otros sistemas al comparar genomas con grandes reordenamientos (Darling et al., 2004). Yoshida et al., (2017) en su estudio utilizó el programa para llevar a cabo la comparación genómica de los tardígrados *Hypsibius dujardini* y *Ramazzottius varieornatus*, las filogenias moleculares del genoma completo respaldaron una relación Tardigrada – Nematoda, pero los cambios genómicos poco usuales tendieron a respaldar la relación Tardigrada – Arthropoda.

### **3. Marco Metodológico**

#### **3.1 Extracción de ADN del *Paropisthopatus* sp.**

Se extrajo el ADN de un individuo de *Paropisthopatus* sp. ubicado en las coordenadas (35°35'55.24"S, 71°03'06.50"W). La muestra consistió en una pequeña porción del tegumento del organismo a partir del cuarto o quinto lobopodio de la parte trasera, de aproximadamente 2 x 2 mm de longitud, sin profundizar mucho con el bisturí. Esta pequeña porción se colocó en un filtro de 42.5 mm, seguidamente se almacenó en un microtubo de 1.5 ml con un poco de alcohol al 70% y se refrigeró por un día. Posteriormente, se procedió a extraer su ADN haciendo uso del kit de purificación del ADN genómico Wizard® (Promega) con la modificación de que para realizar la primera mezcla de 120 µl de EDTA 0.5 M con 500 µl de solución de lisis de núcleos, esta se refrigeró por no más de dos minutos para proceder a mezclarlo con la muestra de tejido.

#### **3.2 Calidad e integridad del ADN**

Una vez realizada la extracción de ADN, se verificó la calidad de esa extracción, utilizando el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) por medio de los coeficientes 260/280 con un rango establecido de (1.8-2.2) y 260/230 con el rango establecido de (2-2.2) para extracciones de ácidos nucleicos según lo descrito por el Thermo Scientific User Manual (2009). Estos coeficientes se utilizaron para determinar la contaminación con sales, carbohidratos, péptidos, fenoles o compuestos aromáticos. Una vez realizada la cuantificación del ADN, se procedió a realizar un gel de agarosa al 1% para apreciar la integridad de la muestra, así como su tamaño de banda (500 - 750 pb) aproximadamente en los resultados de la PCR.



### **3.3 Amplificación del gen COI por medio de la técnica de PCR**

Se realizó una PCR para amplificar el gen COI de la muestra para corroborar la integridad del ADN y así descartar la presencia de inhibidores que puedan afectar procesos moleculares posteriores. Los cebadores que se utilizaron fueron el COI5584 (5'-TGTGACTGGTCATGCATTTGT-3') y el COI6174 (5'-GAAACTATTCCAAAGCCAGGAA-3') (Lacorte, Oliveira & Da Fonseca, 2011).

Se realizó el protocolo de amplificación en un volumen de 25 µl que incluye 7.5 µl de Dream Taq Buffer con una concentración inicial de 10X, 3 µl de una mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) con una concentración inicial de 5mM, 3.75 µl de cada cebador con una concentración inicial de 10 µM, 2.25 µl de DMSO al 100%, 0.75 µl de Taq Polimerasa (5 U/ µl), 51 µl de agua ultrapura y 1 µl de ADN (249,6 ng/ul). Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el termociclador (ESCO – Swift MiniPro), siguiendo el siguiente perfil térmico: una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación a 50°C por 30s, extensión a 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min.

Las muestras de ADN y los productos de PCR fueron evaluados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 0.5x con pH 8.23, con un voltaje de 125 V y un tiempo de corrida de 20 min. Se incluyó el agente intercalante Bromuro de Etidio en el gel, y la visualización se realizó en un transiluminador con una longitud de onda de 300 nm (LABCONCO), en donde el tamaño esperado de los amplicones fue de 650 pb.

### **3.4 Secuenciación del ADN del *Paropisthopatus* sp. por medio del secuenciador Illumina**

Una vez comprobada la integridad del ADN mediante la PCR, la muestra fue enviada al Departamento de Geología y Ciencias Ambientales de la Ludwig-Maximilians-Universität München, Alemania, como parte de un servicio colaborativo al LABSGE. Posteriormente, la muestra se utilizó para preparar una biblioteca siguiendo el protocolo establecido por el kit

de preparación de bibliotecas de “Nextera DNA Flex Library Prep” (Illumina, 2018) y esta biblioteca fue secuenciada en un equipo Illumina HiSeq 1500 con lecturas en parejas (PE) de 50 pares de bases. Una vez realizado todo el proceso que conlleva la secuenciación, los resultados de las secuencias obtenidas fueron enviadas por correo electrónico en un archivo comprimido al LABSGE, para proseguir con el análisis de estas por medio de programas computacionales bioinformáticos.

### **3.5 Comprobación de la calidad de las lecturas**

Se utilizó el programa FASTQC para analizar los dos archivos con lecturas en formato FASTQ que generó el secuenciador. De esta forma se pudo visualizar la información básica de los resultados de la secuenciación, la cual además de verificar el nombre y tipo de archivo, indicó el número total de lecturas, el número de lecturas filtradas, la longitud de lecturas sentido y anti-sentido del *Paropisthopatus* sp. También brindó datos estadísticos por medio de las gráficas que presenta el programa. De igual forma, se logró apreciar la información acerca del contenido de GC por base en las lecturas, el contenido de N por base y del porcentaje de N por posición. Por otro lado, el programa mostró la distribución de longitud de las lecturas en donde se recomienda que todas tengan una longitud uniforme, en este caso (50 pb).

### **3.6 Ensamblaje del mitogenoma a partir de las lecturas utilizando GetOrganelle**

Por medio de la consola del sistema operativo Linux – Ubuntu se ejecutaron una serie de comandos, en donde primeramente se debió instalar Miniconda en su última versión (Miniconda3) siguiendo las recomendaciones del desarrollador (<https://docs.conda.io/en/latest/miniconda.html>). Posteriormente, se instaló el programa GetOrganelle versión 1.7.6 (Jin et al., 2020), siguiendo las instrucciones recomendadas por el desarrollador (<https://github.com/Kinggerm/GetOrganelle>). Después de la instalación, se

descargó y se generó la base de datos de la mitocondria, identificado como animal\_mt. Una vez ejecutado el comando anterior se procedió a ejecutar el comando que brindará los resultados por medio de uno o varios contigs, donde el genoma mitocondrial utilizado de referencia corresponde al del *O. cinctipes*.

### **3.7 Ensamblaje del genoma mitocondrial del *Paropisthopatus* sp. utilizando Geneious R9**

Debido a que el programa GetOrganelle generó 3 contigs separados de distintos tamaños (1,751 pb, 1,387 pb y 8,552 pb) y se desconocía el orden correcto de los fragmentos, se decidió realizar un mapeo de los contigs utilizando el genoma mitocondrial del *O. cinctipes* como organismo de referencia en el programa Geneious R9 (<https://www.geneious.com/>). Para de esta forma, conocer el orden de los fragmentos generados por GetOrganelle, unirlos en un solo archivo fasta y así poder realizar la anotación del genoma del *Paropisthopatus* sp.

### **3.8 Uso del servidor web MITOS para realizar anotaciones**

Una vez obtenido el genoma mitocondrial del *Paropisthopatus* sp., este se ingresó al servidor MITOS (Bernt et al, 2013) por medio del enlace (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>), especificando el nombre del organismo, el código genético a utilizar; en este caso “05-Invertebrado” y la secuencia fasta generada con el programa Geneious R9. Finalmente, se siguió el tutorial establecido en la página para la interpretación de los resultados.

### **3.9 Formación de archivos Nexus por medio del programa Mesquite**

Para realizar el árbol filogenético de diversas especies de onicóforos y el artrópodo, se seleccionaron las secuencias de los genes COI, 12S y 16S de los diversos organismos en

estudio para conformar tres grupos respectivamente. Cada grupo de genes (COI, 12S y 16S) contenía las secuencias de nueve distintos organismos, los cuales son: *Metaperipatus blainvilli*, *Metaperipatus inae*, *Opisthopatus cinctipes*, *Paropisthopatus* sp., *Peripatooides* sp., *Peripatooides sympatrica*, *Epiperipatus biolleyi*, *Oroperipatus* sp. y *Limulus Polyphemus*, de los cuales se buscaba inferir cuál sería el parentesco de estas especies con el organismo de estudio (*Paropisthopatus* sp.). Una vez que las secuencias estaban listas y separadas según su grupo, se introdujeron al programa de Análisis Genético Evolutivo Molecular (MEGA) (Tamura, Stecher, & Kumar, 2021) versión 11 (<https://www.megasoftware.net/>), el cual es un software informático utilizado para llevar a cabo análisis estadísticos de la evolución molecular. Este programa fue utilizado para generar un alineamiento de múltiples secuencias por cada grupo con el programa ClustalW (Larkin et al., 2007) versión 2.0. Una vez realizado estos alineamientos, se procedió a visualizarlos en el programa Mesquite (Maddison & Maddison, 2021) version 3.70 (<https://www.mesquiteproject.org/>) y se guardaron en formato NEXUS.

### **3.10 Generación de archivos XML en BEAUti**

Una vez que los archivos NEXUS fueron creados, correspondientes a los genes COI, 12S y 16S, se utilizó el programa BEAUti (Bouckaert et al., 2019) (<https://beast.community/>) versión 2.6.6, en el cual se introdujeron los archivos NEXUS de cada uno de los grupos de genes y se indicaron los siguientes parámetros del análisis, para la selección del tipo de Modelo “Template” se eligió la opción de (StarBeast), el Sitio Modelo “Site Model” se realizó sin ligar, el tipo de modelo del reloj “Clock Model” utilizado fue el (Ligado), el tipo de Árbol “Tree” fue ligado también. Prosiguiendo con los parámetros, el segundo Sitio Modelo elegido fue el (B-model test), el Modelo del Reloj fue (Relaxed Clock Log Normal), el Coalescente Multiespecie “MultiSpecies Coalescent” utilizado en el estudio fue (Linear with Constant Root), y el antecedente “Priors” (birthRate.t:Species: set the prior to Log Normal with M of 4.0 and S of 1.25; popMean (scale parameter of the gamma priors for population sizes): set the prior to Log Normal with M of -5.0 and S of 1.25; uclDStdev lognormal) y por último MCMC (corridas de 40 millones, lo demás parámetros de mantuvieron en la opción de default).

### **3.11 Corrida de los archivos XML por medio de BEAST**

Después de que se generaron los archivos XML por medio del programa informático BEAUti v2.6.6, estos se introdujeron al programa BEAST v2.6.6 (Bouckaert et al., 2019) se ejecutó el análisis cuatro veces, esto para asegurar que las MCMC de las cuatro corridas convergen, cada corrida se modificó con un nombre distinto.

### **3.12 Análisis de datos por medio de Tracer y combinación de archivos por medio de LogCombiner**

Una vez realizadas las cuatro corridas y obtenidos los archivos “.log” se procedió a visualizar los resultados por medio del programa Tracer (Rambaut et al., 2018) (<https://github.com/beast-dev/tracer/releases/latest>) versión 1.7.2 y seguidamente se combinaron los archivos para generar uno solo y convertirlo a formato “. trees”, para esto se utiliza el programa LogCombiner (Bouckaert et al., 2019) versión 2.6.6, ambos partes del paquete de la familia de BEAST.

### **3.13 Creación y visualización del árbol filogenético**

Para la generación del árbol filogenético con los tiempos de divergencia se ejecutó el programa TreeAnnotator (Bouckaert et al., 2019) versión 2.6.6, también parte del paquete de la familia de BEAST en el cual se cargó el archivo generado por LogCombiner “. trees” y se introdujo un nombre final (Output file) “. tree” el cual se visualizó después por medio de FigTree (Rambaut, 2018) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) versión 1.4.4.

### **3.14 Visualización del orden de genes mitocondriales con Mauve y Microsoft Excel**

Para generar una visualización del orden de los genes mitocondriales del organismo en estudio y proceder a compararlo con el orden de los genes de otras secuencias de onicóforos

y artrópodos, se instaló el programa Mauve, por medio del enlace de instalación (<https://darlinglab.org/mauve/user-guide/installing.html>) versión 2.4.0, y las secuencias de los mitogenomas por comparar fueron descargadas de las bases de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), tales como;

- *Epiperipatus biolleyi* NC\_009082
- *Metaperipatus inae* NC\_010961
- *Opisthopatus cinctipes* NC\_014273
- *Oroperipatus* sp. NC\_015890
- *Peripatoides sympatrica* JF\_800075
- *Limulus polyphemus* NC\_003057

Las cuales se introdujeron al programa para así obtener el resultado de esta comparación del orden de los genes mitocondriales. De igual forma, para visualizar el orden genómico más detallado, se recurrió al programa Microsoft Excel, para crear una tabla en donde se puede apreciar de una forma más detallada los reordenamientos de genes.

## 4. Resultados

### 4.1 Extracción y cuantificación de ADN del *Paropisthopatus* sp.

Una vez obtenida una pequeña porción del tegumento del *Paropisthopatus* sp. se procedió a extraer su ADN haciendo uso del kit de purificación del ADN genómico Wizard® (Promega). Posteriormente se verificó la calidad de esa extracción por medio del NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). En cuanto a la pureza, se obtuvieron valores 260/280 de 1,94 para la muestra 1 y 1,95 para la muestra 2, estando estos valores dentro del rango establecido (1.8-2.2). Además, se determinaron valores 260/230 de 1,95 y 2,06 para las muestras 1 y 2, respectivamente, estando la muestra 1 con una ligera contaminación en comparación con la muestra 2, según el rango establecido (2-2.2).

## 4.2 La integridad del ADN extraído

Una vez realizada la cuantificación del ADN, se procedió a realizar geles de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN genómico (Figura 1) y verificar el éxito de la PCR (Figura 2). Se consideran muestras positivas aquellas cuyos tamaños se encontraban en 650 pb (Figura 1).

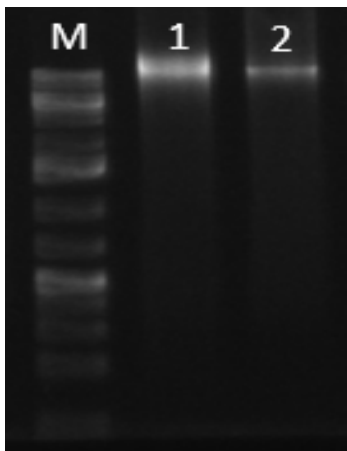


Figura 1. Visualización del ADN íntegro del *Paropisthopatus* sp. en gel de agarosa al 1%. M, marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder, GeneRuler); carriles 1 y 2, muestras independientes de ADN genómico del onicóforo. El agente intercalante utilizado para la visualización del gel fue el Bromuro de Etidio.

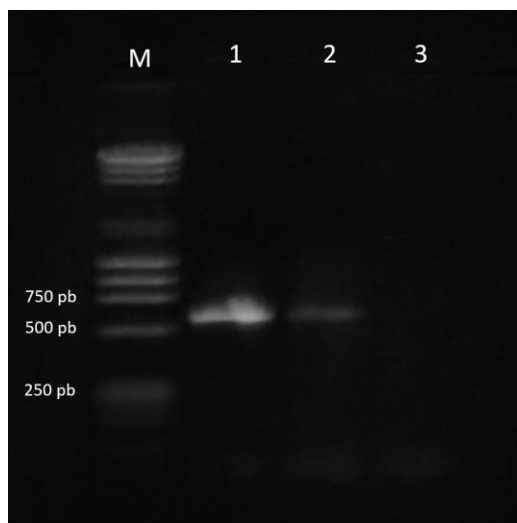


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los resultados de la PCR del gen COI. M, marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder, GeneRuler); carriles 1 y 2 corresponden a la muestra de PCR duplicada; carril 3, control negativo.

### 4.3 Visualización de la calidad de las lecturas después de realizar la secuenciación del genoma por medio del secuenciador Illumina HiSeq

Para comprobar la calidad de las lecturas proporcionadas por el secuenciador Illumina HiSeq, se procedió a utilizar el programa FASTQC que visualiza los dos archivos de lecturas en formato FASTQ. Por medio del programa se pudo verificar el nombre y tipo de archivo de las lecturas sentido, el número total de lecturas (79 647 146 lecturas), y la distribución de longitud de las lecturas (50 pb). También se obtuvieron datos estadísticos por medio de gráficas presenta la calidad de las lecturas, en donde se logró observar una buena calidad de las lecturas, con valores mayores a 30 (Figura 3).

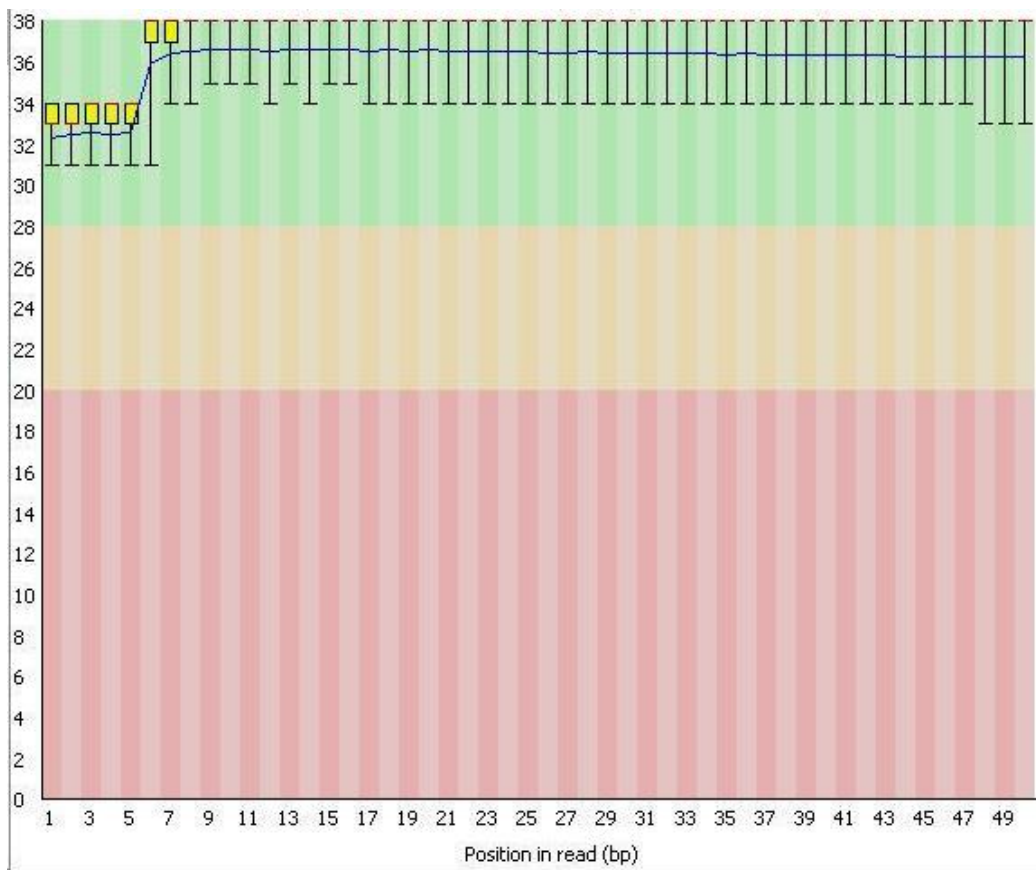


Figura 3. Calidad de las lecturas del organismo en estudio visualizadas por medio del programa FASTQC. El eje de la X corresponde a la posición en pares de bases de la lectura y el eje de la Y corresponde a la calidad de las lecturas.



Por otro lado, se obtuvo cero resultados en cuanto al contenido N por base, y se observa variación en la distribución del porcentaje de bases nucleotídicas (Figura 4). Así mismo, se pudo obtener el valor del porcentaje de GC de un 32% (Figura 5), el cual sobrepasó por un 2% el valor al 30% establecido por el programa, indicando así un poco de contaminación con dímeros de adaptadores por la elaboración de la biblioteca antes de realizar la secuenciación (Figura 6).

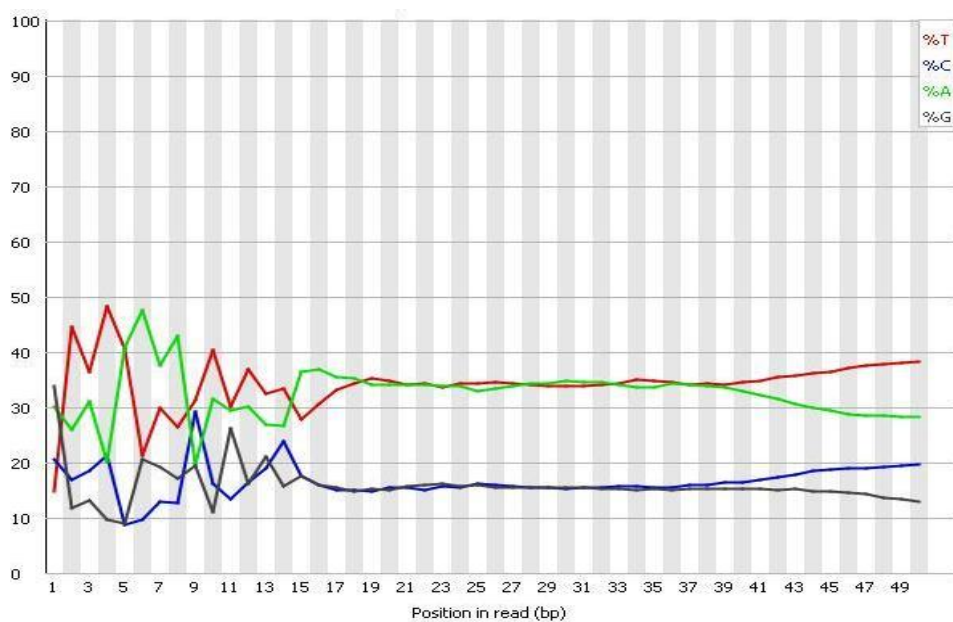


Figura 4. Distribución del porcentaje de bases nucleotídicas de las lecturas del *Paropisthopatus* sp. por medio del programa FASTQC. Se logra apreciar que al inicio de las lecturas los porcentajes presentan mucha variación, pero conforme avanza se mantienen constantes.

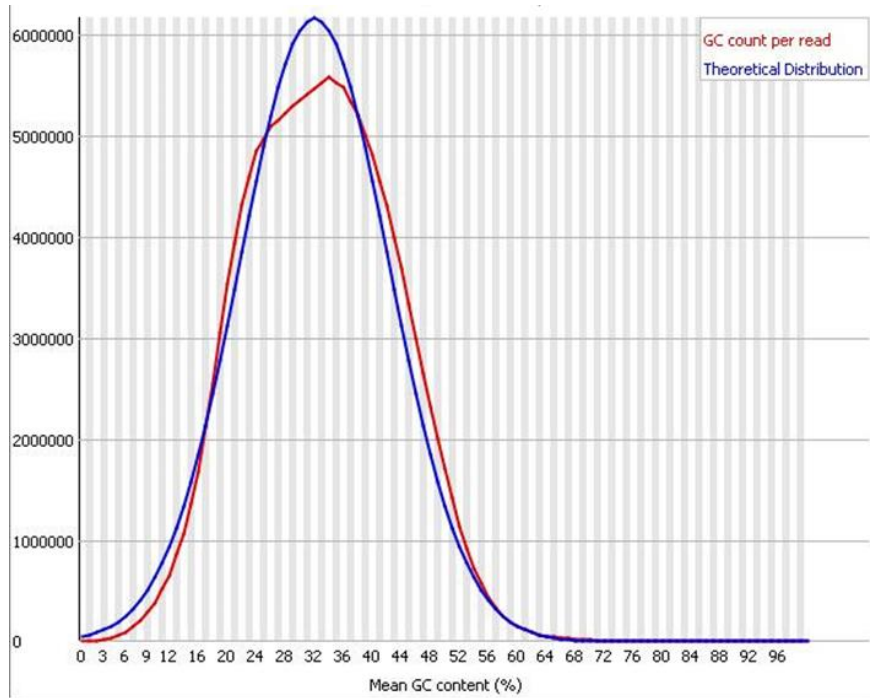


Figura 5. Distribución del porcentaje total de GC de las lecturas del *Paropisthopatus* sp. por medio del programa FASTQC. El porcentaje total de GC para las secuencias en estudio es del 32%.

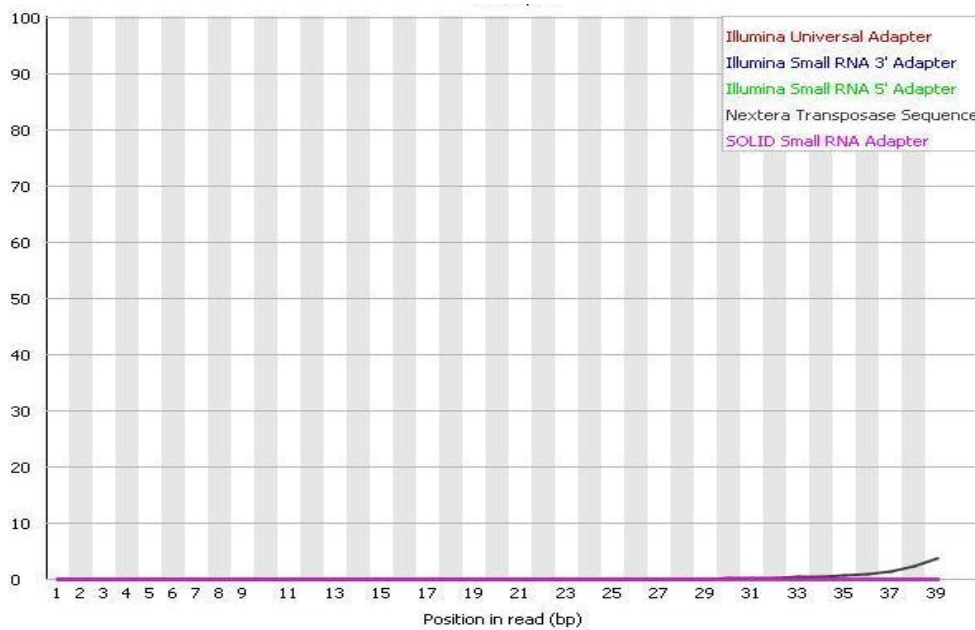


Figura 6. Porcentaje de contaminación por adaptadores en las lecturas del *Paropisthopatus* sp. por medio del programa de visualización FASTQC

#### 4.4 Construcción y anotación del genoma mitocondrial

Para la creación del genoma mitocondrial se utilizaron dos programas bioinformáticos con el fin reconstruir en su totalidad el mitogenoma, esto debido a que el programa GetOrganelle generó tres secuencias separadas que suman un total de 11,690 pb, pero del cual se desconocía su orden. Por lo tanto, se decidió utilizar el programa Geneious R9, en el cual se pudieron unir las tres secuencias generadas anteriormente utilizando un genoma mitocondrial de referencia (*O. cinctipes*, NC\_014273). De esta forma se pudo reconstruir y ordenar el genoma mitocondrial del organismo en estudio para crear una sola secuencia completa de 12,421 pb, la cual fue introducida al servidor web MITOS para realizar las anotaciones correspondientes. Se determinó que el gen ND4L no está presente y que solo una pequeña parte del gen 12S fue anotada (Figura 7). Debido al pequeño fragmento encontrado del gen 12S se decidió realizar múltiples mapeos utilizando el mismo gen del organismo de referencia antes mencionado y solo se lograron recuperar 64 pb. Por otro lado, con respecto al gen ND4L de igual forma se realizaron múltiples mapeos, pero no fue posible ensamblarlo, por lo tanto, en este organismo de estudio se omitirá su presencia. Aun así, MITOS fue capaz de anotar los genes ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND5, ND4, ARN-S, ND6, ARN-L, ND1 Y CYTB en el mitogenoma ensamblado.

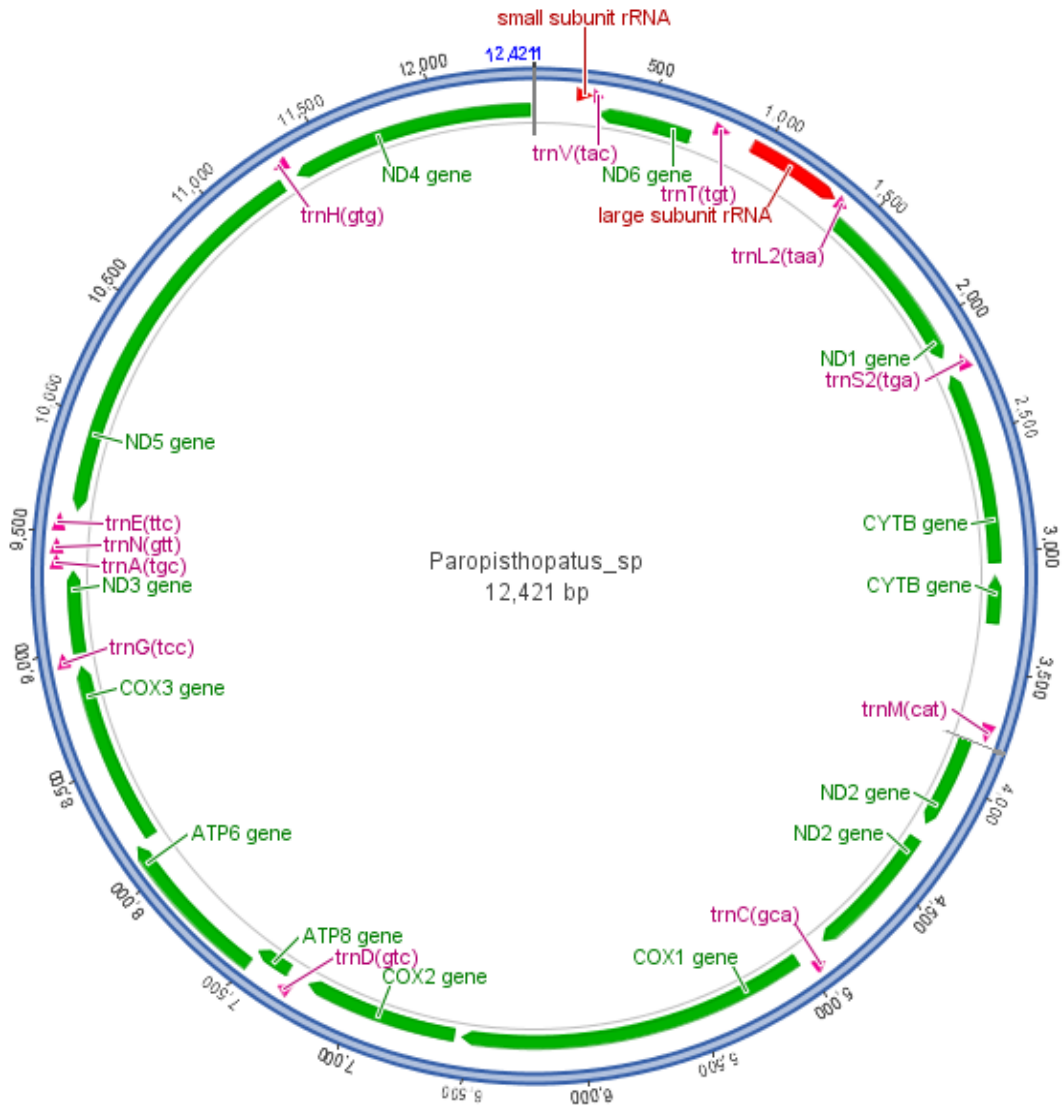


Figura 7. Genoma mitocondrial del *Paropisthopatus* sp. ensamblado por medio de los programas bioinformáticos GetOrganelle y Geneious R9, anotado en el servidor web MITOS. Los genes anotados son los siguientes ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND5, ND4, ARN-S, ND6, ARN-L, ND1, CYTB.

#### 4.5 Comparación del orden de genes mitocondriales de diversos onicóforos y un artrópodo con respecto al organismo de estudio

En cuanto a la comparación del orden de genes del genoma mitocondrial de las

distintas especies de onicóforos, se utilizó el programa Mauve para la realización de un alineamiento múltiple y así conocer el orden de los genes de los onicóforos, tal y como se observa en la (Figura 8). Los organismos por comparar fueron: *Epiperipatus biolleyi*, *Metaperipatus inae*, *Opisthopatus cinctipes*, *Oroperipatus* sp., *Paropisthopatus* sp., y *Peripatoides sympatrica*. La mayoría de estos onicóforos pertenecen a la familia Peripatopsidae, a excepción de *E. biolleyi* y *Oroperipatus* sp. La intención de este análisis fue poder comparar las diferencias y similitudes en cuanto al orden y ubicación de los genes mitocondriales que presentan los diversos onicóforos de la familia Peripatopsidae, así como con aquellos que pertenecen a la familia Peripatidae, y se logró observar que efectivamente el *Metaperipatus inae* es el organismo que presenta más cantidad de reordenamientos genéticos y el *P. sympatrica* y el *O. cinctipes* son los onicóforos que presentan la mayor conservación de orden genético mitocondrial.

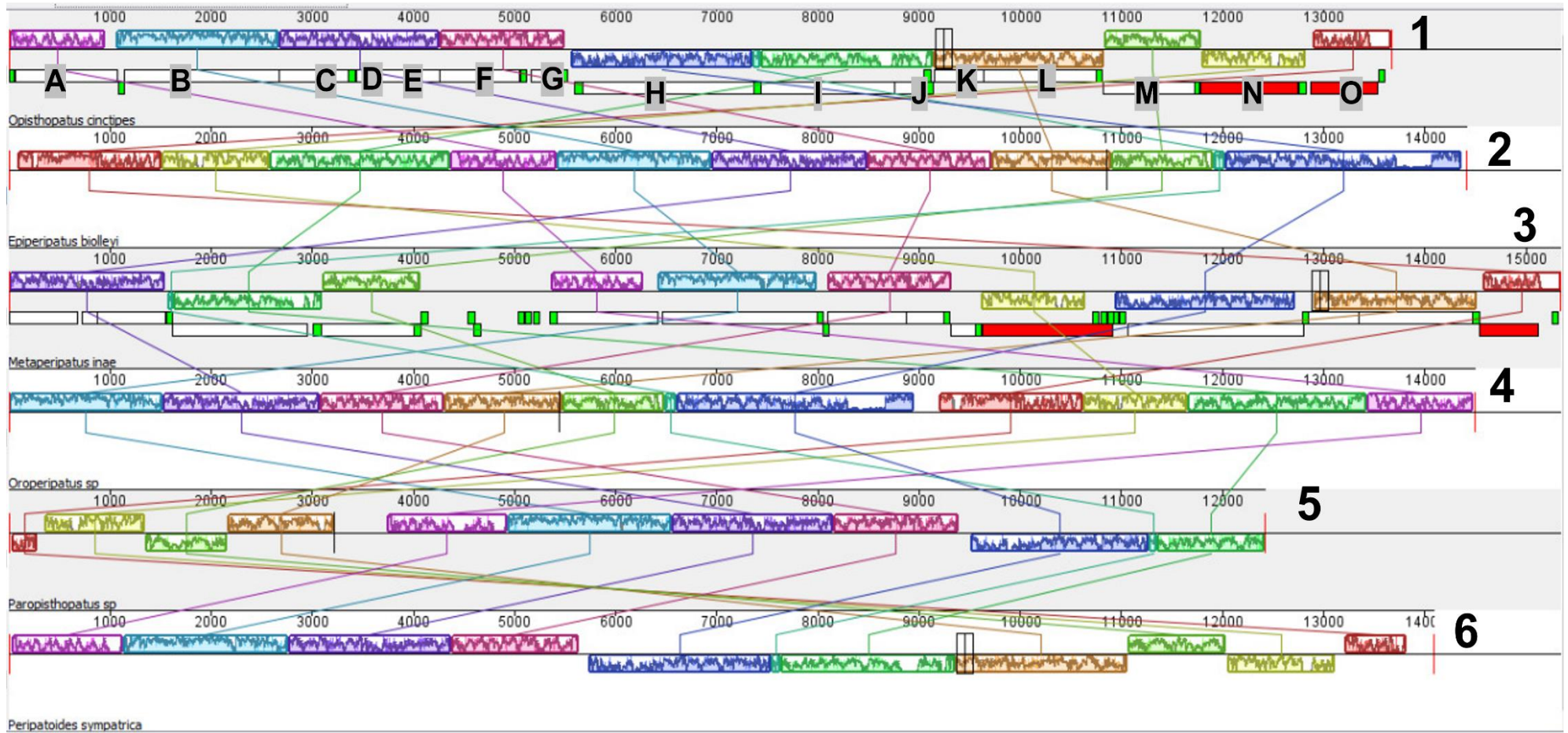


Figura 8. Alineamiento múltiple de mitogenomas de diversas especies de onicóforos por medio del programa Mauve para identificar reordenamientos. Las especies en estudio son las siguientes: *Opisthopatus cinctipes* (NC\_014273) Organismo 1, *Epipeperipatus biolleyi* (NC\_009082) Organismo 2, *Metaperipatus inae* (NC\_010961) Organismo 3, *Oroperipatus sp.* (NC\_015890) Organismo 4, *Paropisthopatus sp.* (En estudio) Organismo 5 y el *Peripatoides sympatrica* (JF800075) Organismo 6. Las letras corresponden a los genes que componen sus genomas mitocondriales en donde: A corresponde al gen ND2, B al gen COX1, C al gen COX2, D al gen ATP8, E al gen ATP6, F al gen COX3, G al gen ND3, H al gen ND5, I al gen

ND4, J al gen ND4L, K al gen ND6, L al gen CYTB, M al gen ND1, N al gen 16S y por último la letra O al gen 12S. Las cajas de colores representan regiones de sintenia (bloques localmente colineares) y las líneas verticales que se entrecruzan indican ortología.

Por otro lado, en la (Figura 9), se logra apreciar el alineamiento del mitogenoma de los onicóforos *Opisthoptatus cinctipes* con el número de accesión NC\_014273 y *Paropisthoptatus* sp., junto con el artrópodo *Limulus polyphemus* con el número de accesión NC\_003057. Es posible observar que el orden de genes del *O. cinctipes* y *L. polyphemus* es muy similar, comprobando así la relación evolutiva de Onychophora y Arthropoda con el ancestro en común que los une. A su vez, se puede observar la presencia de una región invertida que corresponde a los genes 16S, ND1 y el COI del organismo en estudio con respecto a los otros dos organismos, siendo este un hallazgo muy interesante para los biólogos evolutivos, ya que el organismo de estudio y el *O. cinctipes* no conviven en la misma zona geográfica, fortaleciendo el tema de la dispersión de especies poblaciones hace millones de años.

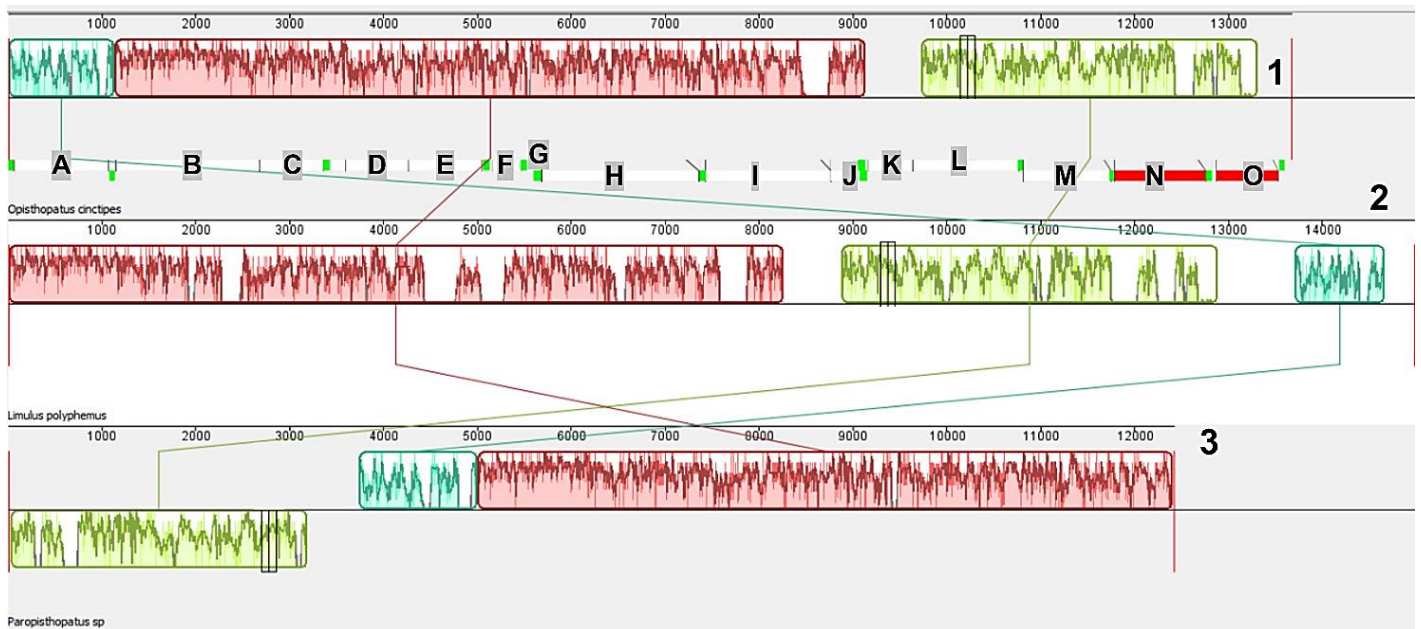


Figura 9. Alineamiento múltiple de dos especies de onicóforos y un artrópodo por medio del programa Mauve para identificar reordenamientos. Las especies en estudio son las siguientes: *Opisthoptatus cinctipes* (NC\_014273) representado con el número 1, *Limulus polyphemus* (NC\_003057) con el número 2 y el *Paropisthoptatus* sp. (Organismo de estudio) con el número 3. Las letras corresponden a los genes que componen sus genomas mitocondriales en donde: A corresponde al gen ND2, B al gen COX1, C al gen COX2, D al gen

ATP8, E al gen ATP6, F al gen COX3, G al gen ND3, H al gen ND5, I al gen ND4, J al gen ND4L, K al gen ND6, L al gen CYTB, M al gen ND1, N al gen 16S y por último la letra O al gen 12S. Las cajas de colores representan regiones de sintenia (bloques localmente colineares) y las líneas que se entrecruzan indican ortología. Se logra apreciar la región de reorganización que presenta el organismo de estudio con respecto a los demás organismos en comparación, esta región corresponde a los genes ARN L – ND1 – CYTB del *Paropisthopatus* sp.

Según el orden de los genes presentados en la (Figura 10) y según los resultados del alineamiento realizado, *Epiperipatus biolleyi* y *Oroperipatus* sp. representan el mismo orden de genes mitocondriales, esto puede deberse a que ambos organismos pertenecen a la familia Peripatidae. Por otro lado, el *Metaperipatus inae* es el organismo que presenta mayor cantidad de reordenamientos con el resto de los onicóforos. También se logra observar que el *Opisthopatus cinctipes* y el *Peripatoides sympatrica* presentan un reordenamiento de genes en la región CYTB – ND1 – ARN L – ARN S con respecto al resto de los onicóforos, los cuales tiene el mismo orden que en el artrópodo *L. polyphemus*. Así también se logra identificar que hay presencia de un reordenamiento en el *Paropisthopatus* sp. el cual incluye la región ARN L – ND1 – CYTB, con respecto al *O. cinctipes* y el *P. sympatrica*. Así mismo, otro hallazgo importante presente en el trabajo de investigación es que el gen 12S del organismo en estudio se ubicó cerca del gen NAD6, cuando es común ubicarlo cerca del gen 16S, por lo cual se puede concluir que en el *Paropisthopatus* sp., ocurrió una translocación del gen, con respecto al resto de los onicóforos y el artrópodo que se estudiaron.

<i>Epiperipatus biolleyi</i>	1 ND2	2 COX1	3 COX2	4 ATP8	5 ATP6	6 COX3	7 ND3	12 CYTB	13 ND1	8 ND5	11 ND6	15 ARN-S	14 ARN-L	10 ND4L	9 ND4
<i>Metaperipatus inae</i>	3 COX2	4 ATP8	5 ATP6	9 ND4	13 ND1	1 ND2	2 COX1	6 COX3	7 ND3	10 ND4L	14 ARN-L	8 ND5	11 ND6	12 CYTB	15 ARN-S
<i>Opisthopatus cinctipes</i>	1 ND2	2 COX1	3 COX2	4 ATP8	5 ATP6	6 COX3	7 ND3	8 ND5	9 ND4	10 ND4L	11 ND6	12 CYTB	13 ND1	14 ARN-L	15 ARN-S
<i>Oroperipatus</i> sp	1 ND2	2 COX1	3 COX2	4 ATP8	5 ATP6	6 COX3	7 ND3	12 CYTB	13 ND1	8 ND5	11 ND6	15 ARN-S	14 ARN-L	10 ND4L	9 ND4
<i>Paropisthopatus</i> sp	1 ND2	2 COX1	3 COX2	4 ATP8	5 ATP6	6 COX3	7 ND3	8 ND5	9 ND4	15 ARN-S	11 ND6	14 ARN-L	13 ND1	12 CYTB	
<i>Peripatoides sympatrica</i>	1 ND2	2 COX1	3 COX2	4 ATP8	5 ATP6	6 COX3	7 ND3	8 ND5	9 ND4	10 ND4L	11 ND6	12 CYTB	13 ND1	14 ARN-L	15 ARN-S
<i>Limulus polyphemus</i>	1 ND2	2 COX1	3 COX2	4 ATP8	5 ATP6	6 COX3	7 ND3	8 ND5	9 ND4	10 ND4L	11 ND6	12 CYTB	13 ND1	14 ARN-L	15 ARN-S

Figura 10. Listado del orden de los genes en el genoma mitocondrial de seis distintas especies de onicóforos: *Epiperipatus biolleyi* NC\_009082, *Metaperipatus inae* NC\_010961, *Opisthopatus cinctipes* NC\_014273, *Oroperipatus* sp. NC\_015890, *Paropisthopatus* sp. (Organismo en estudio), *Peripatoides sympatrica* JF\_800075 y el artrópodo *Limulus polyphemus* NC\_003057.



## 4.6 Inferencia del árbol filogenético

En el árbol filogenético realizado (Figura 11) se incluye una barra de escala, la cual indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio, es decir, hay 7 diferencias a nivel nucleotídico por cada 100 bases. *Metaperipatus blainvilli* y el *Metaperipatus inae*, formaron un clado monofilético (PP 97%). *Epiperipatus biolleyi* y el *Oroperipatus* sp. presentan un valor de soporte de un 74%, obteniendo el mismo valor el nodo representado por el *Peripatooides* sp. y el *Peripatooides sympatrica*. Por otro lado, el valor más bajo de soporte mostrado en el gráfico corresponde al nodo formado por *Opisthopatus cincitipes* y el *Paropisthopatus* sp., el cual tiene un valor correspondiente al 66%.

*Epiperipatus biolleyi* y el *Oroperipatus* sp conformaron un clado que divergió inicialmente del resto de las especies analizadas, lo cual corrobora su clasificación en una familia diferente (Peripatidae) mientras que las demás especies pertenecen a la familia Peripatopsidae. Las especies del género *Peripatooides* también conformaron un grupo monofilético. Sin embargo, las relaciones internas del árbol recuperado presentaron valores de probabilidad posterior altos.

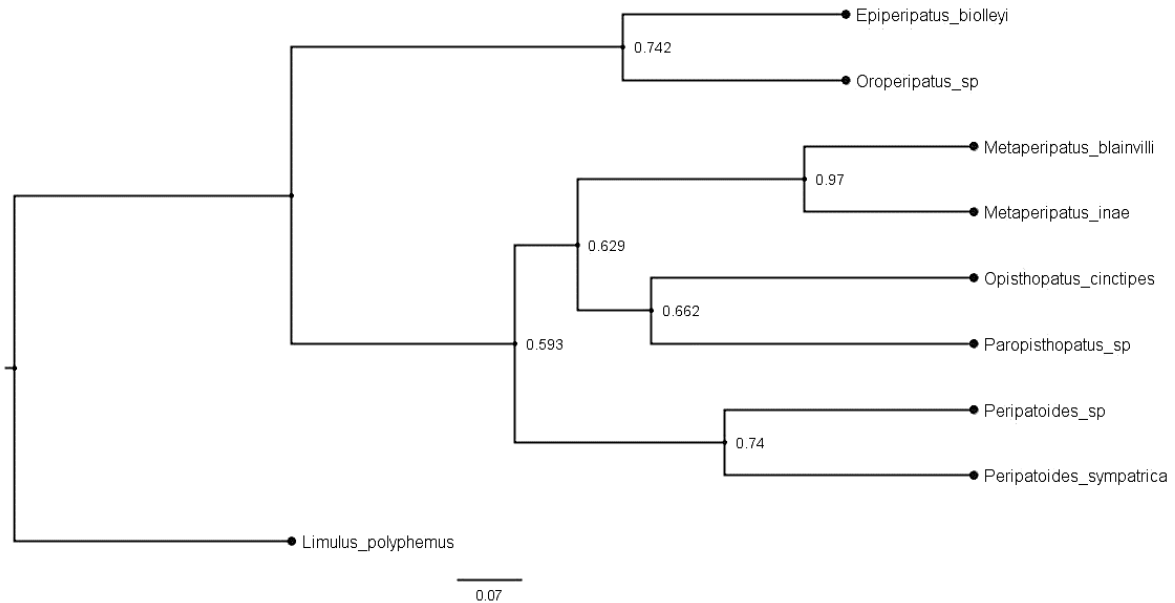


Figura 11. Árbol filogenético de las diversas especies de onicóforos; *Epiperipatus biolleyi* NC\_009082, *Oroperipatus sp.* NC\_015890, *Metaperipatus blainvilli* MG696666, *Metaperipatus inae* NC\_010961, *Opisthopatus cincipes* NC\_014273, *Paropisthopatus sp.* (Organismo en estudio), *Peripatoides sp.* KC\_754684, *Peripatoides sympatrica* JF\_800075 y el *L. polyphemus* NC\_003057 del filo Arthropoda utilizando como estudio los genes 12S, 16S y COI por medio de la estimación filogenética bayesiana utilizando los programas BEAST y FigTree para su posterior visualización.

## 5. Discusión

### 5.1 Derivación del arreglo de genes mitocondriales

Las tres especies de Onychophora más estudiadas hasta la fecha muestran tres patrones de distribución de genes mitocondriales diferentes, desde altamente conservados en *O. cincipes*, hasta altamente derivados en *E. biolleyi* y *M. inae* (Podsiadlowski, Braband & Mayer, 2008; Braband et al., 2010b). Los resultados de Braband et al. (2010a) sugieren que el patrón de derivación del arreglo de genes en *M. inae* puede haber evolucionado por un mecanismo muy diferente al de *E. biolleyi*, ya que están involucrados eventos de replicación. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que todos los genes que codifican proteínas y ARN ribosomal son redundantes, así como por la presencia de múltiples regiones de control y pseudogenes en *M. inae*. Por lo tanto, se ha sugerido que el orden genético derivado y disímil en *E. biolleyi* y *M. inae* han evolucionado convergentemente (Braband et al., 2010a).

En *Metaperipatus inae*, el orden relativo de la mayoría de los genes que codifican proteínas y dos genes de ARN ribosomal son marcadamente diferentes del modelo base reconstruido de Onychophora y Panarthropoda (Braband et al., 2010b). Sin embargo, debido a que la mayoría de los genes están codificados en la misma hebra que en el genoma mitocondrial ancestral, es muy improbable que el orden de genes que se originó en *M. inae* haya sido por múltiples eventos de desplazamiento e inversión, como sucede con el *E. biolleyi* (Podsiadlowski, Braband & Mayer 2008). En cambio, el patrón de mosaico de genes en *M. inae* evolucionó como resultado de la duplicación parcial del genoma seguida de la

eliminación del exceso de genes (Moritz et al., 1987; Boore, 2000; Bensch & Harlid, 2000; Lavrov et al., 2002; Zhang et al., 2008), este mecanismo también se ha propuesto para explicar los reordenamientos del genoma mitocondrial en otros animales.

El escenario más parsimonioso que explica el patrón de distribución de genes en *M. inae* implica cuatro eventos de replicación. Para empezar, se tomó el orden ancestral de genes en Onychophora, en el que se duplicó la región de control. Posteriormente, la duplicación involucró casi todo el genoma mitocondrial, seguida de la pérdida de genes no esenciales. Una segunda duplicación parcial del mitogenoma, seguida de eliminaciones aleatorias de genes, dio como resultado el patrón de asociación de genes que se encuentra en *M. inae*, pero con solo dos regiones de control en lugar de tres.

Finalmente, las dos regiones de control se duplicaron e invirtieron, y una de ellas se redujo de tamaño. Este último paso condujo a la localización de los genes mitocondriales expresados que se encuentran en *M. inae*. Este escenario parece más probable ya que cualquier otra suposición de un evento doble conduciría a un escenario menos parsimonioso con la necesidad de duplicaciones adicionales o mover tres zonas de control (Braband et al., 2010a). La suposición de la duplicación parcial del genoma en el escenario sigue el patrón típico que se encuentra comúnmente en los genomas mitocondriales animales (Boore, 2000), esto debido a que todas las regiones de duplicación incluyen o limitan con una de las zonas de control. Este patrón particular puede estar relacionado con errores de replicación en regiones de control, lo que lleva a la duplicación de regiones genómicas vecinas (Moritz et al., 1987; Boore, 2000; Lavrov et al., 2002).

## **5.2. Orden de genes mitocondriales ancestrales en Onychophora**

La comparación del orden de los genes mitocondriales de tres especies de onicóforos, *O. cinctipes* (familia Peripatopsidae; Braband et al., 2010b), *M. inae* (Peripatopsidae; Braband et al., 2010a) y *E. biolleyi* (Peripatidae; Podsiadlowski, Braband & Mayer, 2008), presenta tres patrones de distribución de genes diferentes. El orden de genes mitocondriales en *M. inae* y *E. biolleyi* es significativamente diferente de la descrita para los artrópodos y

priapulidos (Clary & Wolstenholme, 1985; Valverde et al., 1994; Staton et al., 1997; Webster et al., 2006, 2007). El arreglo genético, como se mencionó anteriormente, está altamente derivado en *E. biolleyi* debido a múltiples eventos de translocación, mientras que en *M. inae* por una gran duplicación del mitogenoma seguida de una pérdida aleatoria de genes (Podsiadlowski, Braband & Mayer, 2008; Braband et al., 2010a). Por el contrario, la disposición de los genes mitocondriales en *O. cinctipes* y en el organismo de estudio *Paropisthopatus* sp. son similares a la del artrópodo *Limulus polyphemus*, aunque hay tres translocaciones (ARNt) y faltan siete genes en *O. cinctipes* (Braband et al., 2010b). Los diferentes patrones de pérdida de genes en cada especie de Onychophora mostraron que los genes de ARN faltantes se perdieron de forma convergente en estas especies.

El conjunto ancestral de los genes de ARNt mitocondrial en Onychophora, podría haber comprendido al menos 20 genes de ARNt. En *O. cinctipes*, doce de los quince genes de ARNt restantes están ubicados de manera idéntica a los genes correspondientes en *L. polyphemus* y *Priapulius caudatus*, si se tiene en cuenta la gran inversión en el genoma del priapulido (Braband et al., 2010b). Esto indica que los sitios de al menos doce de estos genes de ARNt se conservan en *O. cinctipes* y en el último ancestro común de Onychophora. Tal conservadurismo es inusual porque los genes de ARNt mitocondrial generalmente se consideran factores móviles o de transición, y varios se han transferido en diferentes especies animales, incluidas *E. biolleyi* y *M. inae* (Moritz et al., 1987; Saccone et al., 1999, 2002; Podsiadlowski, Braband & Mayer, 2008; Braband et al., 2010a). En la actualidad, no es posible inferir la ubicación ancestral de los genes de ARNt restantes en Onychophora, ya que faltan o son transponibles en las tres especies mencionadas anteriormente.

En resumen, la comparación del patrón de orden de genes para *O. cinctipes* con *L. polyphemus* como un grupo externo reveló disposiciones idénticas de trece genes codificadores de proteínas, dos genes ribosómicos, doce genes de ARN transferente y regiones de control de ambas especies. Dado que es poco probable que esta correspondencia haya evolucionado por casualidad, Braband et al., (2010b) sugiere que este arreglo es un rasgo heredado y que también está presente en el último ancestro común de Onychophora y otros artrópodos. En conclusión, patrones similares de secuencias de genes mitocondriales

en onicóforos, algunos artrópodos y priapulidos indican que el arreglo genético encontrado en *L. polyphemus*, está presente en el último ancestro común de Arthropoda, Onychophora y Priapulida, es decir, en el patrón de Ecdysozoa.

### **5.3. Barreras geográficas como proceso clado-genético complejo presente en Onychophora**

Como se muestra en este estudio, el orden de los genes del *O. cinctipes* es muy similar al que presenta el *Paropisthopatus* sp., con la excepción de la inversión de la región ARN-L, ND1 y CYTB presente en el organismo de estudio, por lo tanto, se puede deducir que el *Paropisthopatus* sp. muestra un patrón de disposición de genes muy similar al del *O. cinctipes* a pesar de la barrera geográfica (el océano Atlántico) que los separa: *Opisthopatus cinctipes* es proveniente de Sudáfrica, y el organismo de este estudio es proveniente de Chile, al igual que el *Metaperipatus inae*. Independientemente de que estas dos últimas especies pertenecen a la misma zona geográfica, los diversos cambios en el orden de genes son significativos, por lo tanto, la aparición de estas líneas filogenéticamente distintas muestra que este grupo de animales experimentó procesos de diversificación que dieron forma a la gran diversidad de las especies. Aunque estos animales están restringidos a hábitats húmedos, diferentes linajes tuvieron la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Cunha et al., 2017).

Estas diferencias también se presentan en el estudio de Sampaio-Costa, Chagas-Junior & Baptista (2009) en donde, los resultados muestran la importancia de la región amazónica para la diversidad de especies neotropicales, indicando que la variedad de especies de onicóforos es mucho más amplia de lo que se pensaba. De igual forma, entender cómo habitaron los onicóforos en esta región y qué barreras existieron para diversificarse, porque los gusanos aterciopelados presentan sensibilidad al impacto del cambio ambiental (Murienne et al., 2013). Estas características pueden contribuir al aislamiento de estos seres, convirtiéndolos en un modelo idóneo para analizar muestras biogeográficas y explicar así a factores de aislamiento, tales como levantamiento de montañas, desertificación, división de ríos, cambios en el nivel del mar y especialmente la deriva continental. Por lo tanto, esta diversidad puede deberse al hecho de que los principales subgrupos de Onychophora tienen

una larga historia y se han separado al menos 100 millones de años desde la ruptura de Gondwana (Brinck, 1957; Monge, 1995; Reid, 1996).

#### 5.4 Análisis filogenético

Un análisis filogenético reciente ha demostrado que la divergencia de varios subgrupos de Peripatopsidae podría haberse originado desde la desintegración de Gondwana (Reid, 1996; Allwood et al., 2009). En efecto, los resultados del análisis filogenético molecular muestran que los géneros de África del Sur, *Opisthopatus* y *Peripatopsis* no son taxones hermanos porque *Peripatopsis* se ubica en el mismo grupo que *Metaperipatus* de Chile (Allwood et al., 2010). El estudio del genoma mitocondrial de *Peripatopsis* puede respaldar aún más el parentesco de este grupo hermano, siempre que se encuentre el mismo patrón genético en *Peripatopsis* y *M. inae*. Además, el análisis del genoma mitocondrial de *Peripatopsis* puede revelar una estructura genética intermedia entre el tipo ancestral, como lo muestra el *O. cincipes* y el sistema ancestral que se encuentra en *M. inae*.

Por lo tanto, el análisis del genoma mitocondrial en especies de *Peripatopsis* incluidas en este estudio proporcionará una imagen más detallada de la evolución del genoma mitocondrial en la familia Peripatopsidae y ayudará a dilucidar la filogenia de Onychophora. En este proyecto realizado se pudo observar que con la elaboración del árbol filogenético el organismo de estudio se ubica en el clado que representa un 66.2% de parentesco genético con el *Opisthopatus cincipes* (Figura 11), esto porque se ha planteado la hipótesis de que el *Paropisthopatus* está estrechamente relacionado con *Opisthopatus* (Daniels et al., 2016). Y, por otro lado, representa un 62.9% con respecto al clado que comprende a los *Metaperipatus*. Este es sin duda un resultado muy importante, debido a que se esperaba que al ser el *Paropisthopatus* un espécimen de la zona chilena, al igual que el *M. inae*, el parentesco de ambos fuese más alto o se encontraran formando parte del mismo clado, pero en este caso no fue así. Este resultado es clave debido a que todos los análisis en el estudio realizado por Giribet et al., (2018) respaldan al clado del *Metaperipatus* chileno como grupo hermano del *Peripatopsis* sudafricano y el *Opisthopatus* sudafricano como grupo hermano separado.

Resultados filogenéticos realizados recientemente indican que las dos familias de gusanos de terciopelo (Peripatidae y Peripatopsidae) son monofiléticas (Murienne et al., 2014). Por su parte, los géneros de los gusanos sudafricanos (*Peripatopsis* y *Opisthopatus*), ambos monofiléticos, no son taxones hermanos, pues conforman un grupo hermano con dos géneros chilenos (*Metaperipatus* y *Paropisthopatus*) (Daniels et al., 2009; Allwood et al., 2010; Murienne et al., 2014). *Peripatopsis* se considera un grupo hermano de *Metaperipatus* mientras que el *Opisthopatus* se piensa que es un grupo hermano de *Paropisthopatus* (Reid, 1996). Y los resultados de este estudio representan evidencia sólida a favor de ese planteamiento.

## 6. Conclusiones

El presente trabajo demuestra en el árbol filogenético realizado, que el *Paropisthopatus* sp., se ubica dentro del clado que comprende al *Opisthopatus cincipes*, con un valor de soporte del 66.2% en parentesco, fortaleciendo la hipótesis planteada de la relación estrecha del *Paropisthopatus* con el género *Opisthopatus*, a pesar de que el *O. cincipes* es un onicóforo originario de África del sur, y el organismo de estudio originario de Chile.

Otros hallazgos relevantes fueron la inversión de la región ARN L – ND1 – CYTB, con respecto al *O. cincipes* y al *L. polyphemus*, así como la pequeña reconstrucción del ARN-S, en el que ningún programa bioinformático pudo reconstruirlo por completo, esto debido a que la biología del gen hace que este sea más variable, además de que se ubicó cerca del gen NAD6, cuando es común ubicarlo cerca del gen 16S, por ende, se puede concluir que en el *Paropisthopatus* sp., ocurrió una translocación del gen con respecto al resto de los onicóforos y el artrópodo que se estudiaron.

Para finalizar, se puede concluir también que tanto al *O. cincipes* como el *L. polyphemus*, a pesar de ser organismos de distintos filos presentan un ordenamiento de genes

idénticos, por lo tanto, con los hallazgos en otros estudios donde se hace la comparación de los genomas mitocondriales completos de estos organismos, así como en este estudio del onicóforo *Paropisthopatus* sp., se llega a la conclusión de que este arreglo podría deberse al rasgo ancestral presente en los onicóforos, así también como en el ancestro común de Onychophora y Arthropoda.

## 7. Recomendaciones

- Una de las recomendaciones sería amplificar por medio de la Secuenciación Sanger la máxima cantidad de secuencias del gen 12S y ND4L, esto para lograr secuenciar la región faltante y poder reconstruir el gen faltante.
- Otra recomendación sería utilizar el gen 12S y ND4L del *Opisthopatus cinctipes* como organismo de referencia en vez del genoma mitocondrial completo del mismo en el programa GetOrganelle, para de esta manera obtener la máxima cantidad de secuencias de los genes posibles.

## 8. Referencias bibliográficas

- Allwood, J., Gleeson, D., Mayer, G., Daniels, S., Beggs, J. R., & Buckley, T. R. (2010). Support for vicariant origins of the New Zealand Onychophora. *Journal of Biogeography*, 37(4), 669-681.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith A. J. H., Staden R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465.
- Baer, A., de Sena Oliveira, I., Steinhagen, M., Beck-Sickinger, A. G., & Mayer, G. (2014). Slime protein profiling: a non-invasive tool for species identification in Onychophora (velvet worms). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 52(4), 265-272.



- Baer, A., Schmidt, S., Haensch, S., Eder, M., Mayer, G., & Harrington, M. J. (2017). Mechanoresponsive lipid-protein nanoglobules facilitate reversible fibre formation in velvet worm slime. *Nature communications*, 8 (1), 1-7.
- Bankevich, A., Nurk S, Antipov D, Gurevich A. A., Dvorkin M, Kulikov A, S., Lesin V. M., Nikolenko S, I., Pham S, Prjibelski A, D., Pyshkin A, V., Vyahhi S, N., Tesler G, Alekseyev, M, A., & Pevzner P, A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* (19), 455-477.
- Barnes, A., Reiss, T., & Daniels, S. R. (2020). Systematics of the Peripatopsis clavigera species complex (Onychophora: Peripatopsidae) reveals cryptic cladogenic patterning, with the description of five new species. *Invertebrate Systematics*, 34(6), 569-590.
- Barnes, Robert. (1986). *Zoología de los invertebrados*. Ed. Interamericana.
- Barquero, G, J. P., Cabrera A, A, A., Valle C, S., Monge N, J., & Morera B, B. (2016). The geographic distribution of Costa Rican velvet worms (Onychophora: Peripatidae). *Revista de Biología Tropical*, 64(4), 1401-1414.
- Bennett M, D., & Leitch I, J. (2005). Genome size evolution in plants. *The evolution of the genome*, 89–162
- Bensch, S., Härlid, A., (2000). Mitochondrial genomic rearrangements in songbirds. *Mol. Biol. Evol.* 17, 107–113.
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritsch, G., Pütz, J., Middendorf, M., y Stadler, P, F. (2013). MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 69(2), 313-319.
- Bleidorn, C., Eeckhaut, I., Podsiadlowski, L., Schult, N., McHugh, D., Halanych, K. M., Milinkovitch, M, C., & Tiedemann, R. (2007). Mitochondrial genome and nuclear sequence data support Myzostomida as part of the annelid radiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1690-1701.
- Bloomquist, E. W., Lemey, P., & Suchard, M. A. (2010). Three roads diverged? Routes to phylogeographic inference. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(11), 626-632.
- Boore, J.L. (2000). The duplication/random loss model for gene rearrangement exemplified by mitochondrial genomes of deuterostome animals. In: Sankoff, D., Nadeau, J. (Eds.), *Comparative Genomics*. Kluwer, Dordrecht, pp. 133–147.
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., ... & Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 15(4), e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>

- Bouvier, E. L. (1902a). Un péripate de Costa Rica. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 239-240.
- Bouvier, E. L. (1902b). *Peripatus biolleyi*, Onychophore nouveau de Costa-Rica. *Bulletin de la Société entomologique de France*, 7(16), 258-259.
- Braband, A., Cameron, S. L., Podsiadlowski, L., Daniels, S. R., & Mayer, G. (2010b). The mitochondrial genome of the onychophoran *Opisthopatus cinctipes* (Peripatopsidae) reflects the ancestral mitochondrial gene arrangement of Panarthropoda and Ecdysozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(1), 285-292.
- Braband, A., Podsiadlowski, L., Cameron, S. L., Daniels, S., & Mayer, G. (2010a). Extensive duplication events account for multiple control regions and pseudo-genes in the mitochondrial genome of the velvet worm *Metaperipatus inae* (Onychophora, Peripatopsidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(1), 293-300.
- Brinck, P. (1957). Onychophora, a review of South African species, with a discussion on the significance of the geographical distribution of the group. *South African animal life*, 4, 7-32.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 1-9.
- Campbell, L. I., Rota, S. O., Edgecombe, G. D., Marchioro, T., Longhorn, S. J., Telford, M. J., Philippe, H., Rebecchi, L., Peterson, K. J., & Pisani, D. (2011). MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 15920-15924.
- Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M. W., Ragan, C. I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R. F., & Attardi, G. (1985). Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature*, 314(6012), 592-597.
- Clark, Austin. (1915). The Present Distribution of the Onychophora: A Group of Terrestrial Invertebrates. *Smithsonian Misc. Coll., Pub*, 2319, 1-25.
- Clary, D.O., & Wolstenholme, D.R., 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22, 252–271.
- Cock, P.J.A., Antao, T., Chang, J.T., Chapman, B.A., Cox, C.J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & de Hoon, M.J.L., (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422-1423.
- Concha A, Mellado P, Morera, B, B., Sampaio, C, C., Mahadevan, L., & Monge-Najera J (2015). Oscillation of the velvet worm slime jet by passive hydrodynamic instability *Nat. Commun.* 6(1) 6292.

- Corrales U, Y, R., Sánchez, A., Pereira, R., Rischka, K., Kowalik, T., & Vega B, J. (2017). Extracellular micro and nanostructures forming the velvet worm solidified adhesive secretion. *Materials Research Express*, 4(12), 125013.
- Cunha, W. T., Santos, R. C., Araripe, J., Sampaio, I., Schneider, H., & Rêgo, P. S. (2017). Molecular analyses reveal the occurrence of three new sympatric lineages of velvet worms (Onychophora: Peripatidae) in the eastern Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology*, 40, 147-152.
- Daniels, S. R., Dambire, C., Klaus, S., & Sharma, P. P. (2016). Unmasking alpha diversity, cladogenesis and biogeographical patterning in an ancient panarthropod lineage (Onychophora: Peripatopsidae: *Opisthopatus cinctipes*) with the description of five novel species. *Cladistics*, 32(5), 506-537.
- Daniels, S. R., Picker, M. D., Cowlin, R. M., & Hamer, M. L. (2009). Unravelling evolutionary lineages among South African velvet worms (Onychophora: Peripatopsis) provides evidence for widespread cryptic speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97(1), 200-216.
- Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T., (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research*, 14(7), 1394-1403.
- Dowton, M., Castro, L. R., & Austin, A. D. (2002). Mitochondrial gene rearrangements as phylogenetic characters in the invertebrates: the examination of genome'morphology'. *Invertebrate Systematics*, 16(3), 345-356.
- Dunn, C, W., Hejnal, A., Matus, D, Q., Pang, K., Browne, W, E., Smith, S, A., Seaver, E., Rouse, G, W., Obst, M., Edgecombe, G, D., Sørensen, M, V., Haddock, S, H, D., Schmidt, R, A., Okusu, A., Kristensen, R, M., Wheeler, W, C., Martindale, M, Q., & Giribet, G. (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452(7188), 745-749.
- Fortey, R, A & Thomas, R, H. (1998). *Arthropod relationships*. Chapman & Hall.
- Fuhrmann, O. (1913). Über einige neue neotropische Peripatus- Arten. *Zoologischer Anzeiger*, (42), 241-248.
- Giribet, G., Buckman-Young, R. S., Costa, C. S., Baker, C. M., Benavides, L. R., Branstetter, M. G., ... & Pinto-da-Rocha, R. (2018). The 'Peripatos' in Eurogondwana? Lack of evidence that south-east Asian onychophorans walked through Europe. *Invertebrate Systematics*, 32(4), 842-865.
- Giribet, G., & Edgecombe, G. D. (2012). Reevaluating the Arthropod Tree of Life. *Annual Review of Entomology*, 57(1), 167-186. doi:10.1146/annurev-ento-120710-100659
- Golan, D & Medvedev, P. (2013). Using state machines to model the Ion Torrent sequencing process and to improve read error rates. *Bioinformatics*, 29(13), 344-351.
- González, J. P. B, Sánchez, S., & Morera, B., (2020). A new giant velvet worm from Costa Rica suggests absence of the genus *Peripatus* (Onychophora: Peripatidae) in Central America. *Revista de Biología Tropical*, 68(1) 300-320.

- Goodman, N. (2002). Biological data becomes computer literate: new advances in bioinformatics. *Current opinion in biotechnology*, 13(1), 68-71.
- Gravier C & Fage L (1925). Sur une nouvelle espèce de Péripate du Chili (*Opisthopatus costesi*). *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie et Biologie Animale* (8),185–200.
- Gregory, T. R. (2001a). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological reviews*, 76(1), 65-101.
- Gregory, T. R. (2001b). The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 27(5), 830-843.
- Gregory, T. R. (2002). Genome size and developmental complexity. *Genetica*, 115(1), 131-146.
- Gregory, T. R., Hebert, P. D., & Kolasa, J. (2000). Evolutionary implications of the relationship between genome size and body size in flatworms and copepods. *Heredity*, 84(2), 201-208.
- Harzsch, S. (2006). Neurophylogeny: architecture of the nervous system and a fresh view on arthropod phylogeny. *Integrative and Comparative Biology*, 46(2), 162-194.
- Hejnal, A., Obst, M., Stamatakis, A., Ott, M., Rouse, G, W, Edgecombe, G, D., Martinez, P., Baguña, J., Bailly, X., Jondelius, U., Wiens, M., Müller, W, E, G., Seaver, E., Wheeler, W, C, Martindale, M, Q, Giribet, G, & Dunn, C, W. (2009). Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1677), 4261-4270.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., & Bollback, J. P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294(5550), 2310-2314.
- Illumina (2018). *Nextera™ DNA Flex Library Prep – Reference Guide*. <https://usermanual.wiki/Document/Illuminanexteradnaflexlibrarypreferenceguide10000000254160120180523.1362088390/view>.
- Jeffery, N. W., Oliveira, I. S., Gregory, T. R., Rowell, D. M., & Mayer, G. (2012). Genome size and chromosome number in velvet worms (Onychophora). *Genetica*, 140(10-12), 497-504.
- Jin, J. J., Yu, W. B., Yang, J. B., Song, Y., Depamphilis, C. W., Yi, T. S., & Li, D. Z. (2020). GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. *Genome biology*, 21(1), 1-31.
- Johnson, T (2021). BEAST software - Bayesian evolutionary analysis sampling trees. *Beast.community*. <https://beast.community/>
- Johow, F. (1911). Observaciones sobre los Onicóforos Chilenos. *Boletín Museo Nacional de Historia Natural* (3), 79-98.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones, H, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An

- integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data, *Bioinformatics*, (28), 1647–1649.
- Kusche, K., Ruhberg, H., & Burmester, T. (2002). A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10545-10548.
- Lacorte, G. A., Oliveira, I. D. S., & Da Fonseca, C. G. (2011). Phylogenetic relationships among the *Epiperipatus* lineages (Onychophora: Peripatidae) from the Minas Gerais State, Brazil. *Zootaxa*, 2755(1), 57-65.
- Langmead, B & Salzberg, S, L (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Meth.* (9), 357-359.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Lavrov, D.V., Boore, J.L., & Brown, W.M., (2002). Complete mtDNA sequences of two millipedes suggest a new model for mitochondrial gene rearrangements: duplication and nonrandom loss. *Mol. Biol. Evol.* 19, 163–169.
- Machado, A. M., Gomes-dos-Santos, A., Fonseca, M., da Fonseca, R. R., Veríssimo, A., Felício, M., ... & Castro, L. F. C. (2021). A genome assembly of the Atlantic chub mackerel (*Scomber colias*): a valuable teleost fishing resource. *bioRxiv*. 1-34.
- Maddison W., P & Maddison D., R, (2021). Introducción al mezquite. *Mezquite*. <http://www.mesquiteproject.org/What%20Mesquite%20does.html?OverviewOfMesquitePanel=ope>  
[u](#)
- Mallatt, J. M., Garey, J. R., & Shultz, J. W. (2004). Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Molecular phylogenetics and evolution*, 31(1), 178-191.
- Mallatt, J., & Giribet, G. (2006). Further use of nearly complete 28S and 18S rRNA genes to classify Ecdysozoa: 37 more arthropods and a kinorhynch. *Molecular phylogenetics and evolution*, 40(3), 772-794.
- Mardis E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9: 387–402.
- Mayer, G., Martin, C., Rüdiger, J., Kauschke, S., Stevenson, P. A., Poprawa, I., Hohberg, K., Schill, R, O., Pflüger, H, J., & Schlegel, M. (2013). Selective neuronal staining in tardigrades and onychophorans provides insights into the evolution of segmental ganglia in panarthropods. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 230.
- Minelli, A, Boxshall, G, & Fusco, G. (2013). Arthropod biology and evolution: molecules, development, morphology. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 52(1), 94-94.

- Monge, N, J. (1994). Ecological biogeography in the Phylum Onychophora. *Biogeographica*, 70(3), 111-123.
- Monge, N, J. (1995). Phylogeny, biogeography, and reproductive trends in the Onychophora. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 114(1), 21-60.
- Morera, B, B. (2012). Los onicóforos, fósiles caminantes. *El Salvador Ciencia & Tecnología*, 17(23), 8-13.
- Morera, B, B., & León, M. D. (1986). Description of *Macroperipatus valerioi* n. sp. from Costa Rica, and comments on the genus *Macroperipatus* (Onychophora: Peripatidae). *Revista de Biología Tropical*, 34(2), 277-282.
- Morera, B, B., & Monge, N, J. (1990). *Epiperipatus hilkae*, n. sp. from Costa Rica (Onychophora: Peripatidae). *Revista de Biología Tropical*, 38(2), 449-456.
- Morera, B, B., & Monge, N, J. (2010). A new giant species of placented worm and the mechanism by which onychophorans weave their nets (Onychophora: Peripatidae). *Revista de Biología Tropical*, 58(4), 1127-1142.
- Moritz, C., Dowling, T.E., & Brown, W.M., (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 269–292.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65.
- Murienne, J., Daniels, S. R., Buckley, T. R., Mayer, G., & Giribet, G. (2014). A living fossil tale of Pangaean biogeography. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1775), 20132648.
- New, T. R. (1995). Onychophora in invertebrate conservation: priorities, practice and prospects. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 114(1), 77-89.
- Nielsen, C., (2001). *Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla*. Oxford University Press.
- Oliveira, I. S., Franke, F. A., Hering, L., Schaffer, S., Rowell, D. M., Weck-Heimann, A., Monge, N, J., Morera, B, B., & Mayer, G. (2012a). Unexplored character diversity in Onychophora (velvet worms): a comparative study of three peripatid species. *Plos One*, 7(12), 1-20.
- Oliveira, I. S., Read, V. M. S. J., & Mayer, G. (2012b). A world checklist of Onychophora (velvet worms), with notes on nomenclature and status of names. *ZooKeys*, 211 (1), 1-70.
- Patel, R. K., & Jain, M. (2012). NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *Plos One*, 7(2).
- Peck, S (1975). A review of the New World Onychophora species and genus from Jamaica. *Psyche*, 82 (3-4), 341-358.

- Podsiadlowski, L., Braband, A., & Mayer, G. (2008). The complete mitochondrial genome of the onychophoran *Epiperipatus biolleyi* reveals a unique transfer RNA set and provides further support for the Ecdysozoa hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*, 25(1), 42-51.
- Podsiadlowski, L., Kohlhagen, H., & Koch, M. (2007). The complete mitochondrial genome of *Scutigera* *causeyae* (Myriapoda: Symphyla) and the phylogenetic position of Symphyla. *Molecular phylogenetics and evolution*, 45(1), 251-260.
- Rambaut A. (2018). Fig Tree. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. *Ed.ac.uk*. <https://github.com/rambaut/figtree/releases>
- Rambaut, A (2007). FigTree. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A (2020). FigTree 1.4.4 (default version). *Institut Pasteur*. <https://bioweb.pasteur.fr/packages/pack@FigTree@1.4.4>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901-904.
- Ranjbar, R., Karami, A., Farshad, S., Giammanco, G. M., & Mammina, C. (2014). Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *The new microbiologica*, 37(1), 1-15.
- Rannala, B., & Yang, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution*, 43(3), 304-311.
- Rehm, P., Borner, J., Meusemann, K., von Reumont, B. M., Simon, S., Hadrys, H., Misof, B., & Burmester, T. (2011). Dating the arthropod tree based on large-scale transcriptome data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3), 880-887.
- Reid, A. L. (1996). Review of the Peripatopsidae (Onychophora) in Australia, with comments on peripatopsid relationships. *Invertebrate Systematics*, 10(4), 663-936.
- Richter, S., Loesel, R., Purschke, G., Schmidt, R. A., Scholtz, G., Stach, T., Vogt, L., Wanninger, A., Brenneis, G., Döring, C., Faller, S., Fritsch, M., Grobe, P., Heuer, C. M., Kaul, S., Møller, O. S., Müller, C. H. G., Rieger, V., Rothe, B. H., Stegner, M. E. J., & Harzsch, S. (2010). Invertebrate neurophylogeny: suggested terms and definitions for a neuroanatomical glossary. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 29.
- Rodríguez, M. C. (2011). Nueva localidad de *Oroperipatus quitensis* (Peripatidae-Onychophora) en el Ecuador por consideraciones biogeográficas. *Revista Geoespacial N° 8*, 8(1), 23-33.
- Roeding, F., Hagner, H. S., Ruhberg, H., Ebersberger, I., von Haeseler, A., Kube, M., Reinhardt, R., & Burmester, T. (2007). EST sequencing of Onychophora and phylogenomic analysis of Metazoa. *Molecular phylogenetics and evolution*, 45(3), 942-951.

- Rota, S. O., Daley, A. C., y Pisani, D. (2013). Molecular timetrees reveal a Cambrian colonization of land and a new scenario for ecdysozoan evolution. *Current Biology*, 23(5), 392-398.
- Rota, S. O., Kayal, E., Gleeson, D., Daub, J., Boore, J. L., Telford, M. J., Pisani, D., Blaxter, M., & Lavrov, D. V. (2010). Ecdysozoan mitogenomics: evidence for a common origin of the legged invertebrates, the Panarthropoda. *Genome biology and evolution*, 2 (1), 425-440.
- Rubio, Santiago; Pacheco-Orozco, Rafael Adrián; Milena Gómez, Ana; Perdomo, Sandra & García-Robles, Reggie (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*, 61(2).
- Ruhberg, H (1985). Die Peripatopsidae (Onychophora). *Systematik, Ökologie, Chorologie und phylogenetische Aspekte. E. Schweizerbartische Verlagsbuchhandlung, Stuttgart. Zoologica*.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., & Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195-209.
- Saccone, C., Gissi, C., Reyes, A., Larizza, A., Sbisà, E., & Pesole, G. (2002). Mitochondrial DNA in metazoa: degree of freedom in a frozen event. *Gene*, 286(1), 3-12.
- Sampaio-Costa C, Chagas-Junior A & Baptista RLC. (2009). Brazilian species of Onychophora with notes on their taxonomy and distribution. *Zoologia*, 26, 553-561
- Segovia, R., Pett, W., Trewick, S., & Lavrov, D. V. (2011). Extensive and Evolutionarily Persistent Mitochondrial tRNA Editing in Velvet Worms (Phylum Onychophora). *Journal Mol. Biol. Evol.* 28(10), 2873-2881.
- Staton, J.L., Daehler, L.L., & Brown, W.M., (1997). Mitochondrial gene arrangement of the horseshoe crab *Limulus polyphemus* L.: conservation of major features among arthropod classes. *Mol. Biol. Evol.* 14, 867-874.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Thermo Scientific User Manual (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. *ThermoFisher Scientific*. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- Trewick, S. A. (1999). Molecular diversity of Dunedin peripatus (Onychophora: Peripatopsidae). *New Zealand Journal of Zoology*, 26(4), 381-393.
- Valverde, J.R., Batuecas, B., Moratilla, C., Marco, R., & Garesse, R., (1994). The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. *J. Mol. Evol.*, 39, 400-408.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.



- Webster, B. L., Copley, R. R., Jenner, R. A., Mackenzie, D. J. A., Bourlat, S. J., Rota, S. O., Littlewood, D. T. J., & Telford, M. J. (2006). Mitogenomics and phylogenomics reveal priapulid worms as extant models of the ancestral Ecdysozoan. *Evolution & Development*, 8(6), 502-510.
- Webster, B. L., Mackenzie, D. J. A., Telford, M. J., & Littlewood, D. T. J. (2007). The mitochondrial genome of *Priapulid caudatus* Lamarck (Priapulida: Priapulidae). *Gene*, 389(1), 96-105.
- Wolstenholme, D. R., (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* (141), 173–216.
- Wyngaard, G. A., Rasch, E. M., Manning, N. M., Gasser, K., & Domangue, R. (2005). The relationship between genome size, development rate, and body size in copepods. *Hydrobiologia*, 532(1-3), 123-137.
- Yoshida, Y., Koutsovoulos, G., Laetsch, D. R., Stevens, L., Kumar, S., Horikawa, D. D., ... Arakawa, K. (2017). Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*. *PLOS Biology*, 15(7), e2002266. doi:10.1371/journal.pbio.2002266.
- Zhang, J., Zhou, C., Gai, Y., Song, D., & Zhou, K. (2008). The complete mitochondrial genome of *Parafironurus youi* (Insecta: Ephemeroptera) and phylogenetic position of the Ephemeroptera. *Gene*, 424(1-2), 18-24.
- Zhang, Z, Q (2013) Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*, 3703(1), 1–82.
- Zhang, Z, Q. (2011). Animal biodiversity: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa*, 3148(1), 7-12.