

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Filogenia molecular de las especies del género *Drosophila* pertenecientes al grupo *Drosophila mesophragmatica* en base a los genes *ADH*, *amd* y *COII*

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias
Biológicas**

Franco Stelios Cabrera Ruiz

Quito, 2020

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Franco Stelios Cabrera Ruiz ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Doris Vela
Directora de la disertación

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Agradezco cordialmente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por financiar este proyecto de investigación. A mi directora Dra. Doris Vela, por permitirme formar parte del proyecto “Mecanismos de divergencia y adaptación de las especies andinas del género *Drosophila* en el Ecuador”, por abrirme las puertas de su laboratorio desde mi inicio en la carrera de Ciencias Biológicas, por su cariño y conocimientos brindados que me han permitido crecer a nivel académico y personal. Y especialmente por su apoyo e incentivo que forjo mi interés en la bioinformática.

A la Doctora Violeta Rafael, por sus enseñanzas, afecto y observaciones que me ayudaron mucho en mi época de estudiante.

A todos mis queridos docentes de Biología por todos los conocimientos brindados durante los cuatro años de la carrera.

A todos técnicos, tesistas y voluntarios que formaron parte del laboratorio de Genética Evolutiva.

A mis padres, por su amor, apoyo y paciencia. A mi hermana y mi cuñado que son mi ejemplo a seguir.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 3.1. OBJETIVOS | 7 |
| 3.1.1.OBJETIVO GENERAL | 7 |
| 3.1.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 7 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 8 |
| 4.1. ESPECIES INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS..... | 8 |
| 4.2. EXTRACCIÓN DE SECUENCIAS A PARTIR DEL GENOMA COMPLETO..... | 8 |
| 4.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO | 9 |
| 5. RESULTADOS | 10 |
| 5.1. EXTRACCIÓN DE SECUENCIAS | 10 |
| 5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS..... | 10 |
| 6. DISCUSIÓN | 12 |
| 6.1. FILOGENIA DE LOS GENES <i>ADH</i> , <i>amd</i> y <i>COII</i> | 12 |
| 6.2. RELACIONES ENTRE LAS ESPECIES DEL GRUPO <i>MESOPHRAGMATICA</i> 13 | |
| 7. CONCLUSIONES..... | 15 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 16 |
| 9. FIGURAS | 21 |
| 10. TABLAS..... | 25 |
| 11. ANEXO..... | 26 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Filograma del grupo *mesophragmatica* con el gen nuclear *ADH*. Los colores de las ramas representan los diferentes grupos obtenidos en el estudio. Sobre cada rama se encuentra el valor de soporte bootstrap.21
- Figura 2.** Filograma del grupo *mesophragmatica* con el gen nuclear *amd*. Los colores de las ramas representan los diferentes grupos obtenidos en el estudio. Sobre cada rama se encuentra el valor de soporte bootstrap.22
- Figura 3.** Filograma del grupo *mesophragmatica* con el gen mitocondrial *COII*. Los colores de las ramas representan los diferentes grupos obtenidos en el estudio. Sobre cada rama se encuentra el valor de soporte bootstrap.23
- Figura 4.** Filograma del grupo *mesophragmatica* con genes concatenados. Los colores de las ramas representan los diferentes grupos obtenidos en el estudio. Sobre cada rama se encuentra el valor de soporte bootstrap.24

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Características de las secuencias analizadas de los genes <i>ADH</i> , <i>amd</i> y <i>COII</i> | 25 |
|---|----|

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Especies utilizadas en el estudio y número de acceso GenBank | 26 |
| Anexo 2. Información de los contigs extraídos | 26 |

1. RESUMEN

El grupo *mesophragmatica* está conformado por 19 especies, más del 50% se encuentran en el Ecuador. Las relaciones filogenéticas del grupo son inconsistentes debido a la falta de análisis moleculares que sustenten las agrupaciones morfológicas que han sido sugeridas. En este estudio se estimaron las relaciones filogenéticas de 12 especies del grupo *mesophragmatica*, en donde se incluyeron 7 especies ecuatorianas (*D. amaguana*, *D. neoamaguana*, *D. cashapamba*, *D. rucux*, *D. chorlavi*, *D. mesophragmatica*, *D. yanayuyu*). Para establecer las relaciones filogenéticas en el grupo se usaron dos genes nucleares (alcohol deshidrogenasa, alfa metil dopa-resistente) y un gen mitocondrial (citocromo oxidasa II), los cuales fueron analizados mediante el método de máxima verosimilitud. El árbol filogenético resultante divide a las especies en dos grupos, el primer grupo se encuentra conformado por las especies *D. amaguana*, *D. neoamaguana*, *D. cashapamba* y *D. yanayuyu*, y el segundo agrupa a *D. rucux*, *D. chorlavi*, *D. mesophragmatica*, *D. pavani*, *D. gasici*, *D. viracochi*, *D. brncici*, y *D. gaucha*. Evidencias morfológicas y citológicas confirmaron las relaciones filogenéticas de 6 especies ecuatorianas en nuestro estudio, sin embargo *D. yanayuyu* presenta características morfológicas muy distantes al grupo *mesophragmatica*, por ende, sus relaciones dentro del grupo son inconsistentes; este estudio muestra un análisis preliminar de las relaciones filogenéticas del grupo *mesophragmatica*, los cuales necesitan ser complementados con las 19 especies del grupo.

Palabras clave: *Drosophila*, *mesophragmatica*, filogenia, *ADH*, *amd*, *COII*.

2. ABSTRACT

The *mesophragmatica* group is conformed by 19 species, more than 50% are found in Ecuador. The phylogenetic relationships of the group are inconsistent due to the lack of molecular analysis that support the morphological group that have been suggested. In this study, the phylogenetic relationships of 12 species of the *mesophragmatica* group were analyzed and 7 Ecuadorian species were included (*D. amaguana*, *D. neoamaguana*, *D. cashapamba*, *D. rucux*, *D. chorlavi*, *D. mesophragmatica*, *D. yanayuyu*). Two nuclear genes (alcohol dehydrogenase, alpha methyl dopa-resistnat) and one mitochondrial gene (cytochrome c oxidase II) were analyzed, using the maximum likelihood method, to establish the phylogenetic relationships in the group. The resulting phylogenetic tree show two groups, the first group includes the species *D. amaguana*, *D. neoamaguana*, *D. cashapamba* and *D. yanayuyu*, and the second includes *D. rucux*, *D. chorlavi*, *D. mesophragmatica*, *D. pavani*, *D. gasici*, *D. viracochi*, *D. brncici*, and *D. gaucha*. Morphological and cytological evidences confirmed the phylogenetic relationships of 6 Ecuadorian species in our study, however *D. yanayuyu* presents morphological characteristics very distant from the *mesophragmatica* group, therefore, their relationships within the group are inconsistent. This study shows a preliminary analysis of the phylogenetic relationships of the *mesophragmatica* group, which need to be complemented with the 19 species of the group.

Keywords: *Drosophila*, *mesophragmatica*, phylogeny, *ADH*, *amd*, *COII*.

3. INTRODUCCIÓN

Hace casi un siglo, Sturtevant, uno de los genetistas más destacados de todos los tiempos, contribuyó enormemente a la taxonomía de drosófilidos, aportando un catálogo con información morfológica, ecológica, taxonómica y sistemática de las especies norteamericanas de la familia Drosophilidae (Sturtevant, 1921), debido a la investigación tan completa realizada por este investigador, la familia Drosophilidae continua siendo de gran interés para la ciencia, especialmente en campos como la genética, genómica, biología del desarrollo, entre otros (Mishra, Sachan, Mutsuddi y Mukherjee, 2014; Palmieri, Nolte, Chen y Schlötterer, 2015; Andersen y Horne-Badovinac, 2016; Tidon y Almeida, 2016).

La familia Drosophilidae está incluida en la superfamilia Ephydroidea y es considerada una de las familias más numerosas dentro de los dípteros, la cual incluye 76 géneros con más de 3800 especies descritas cuya distribución únicamente excluye la región ártica (Mahato y Gupta, 2018), debido a la incapacidad de establecer un grupo hermano para la familia Drosophilidae (Markow y O'Grady, 2006), sus relaciones filogenéticas continúan en controversia (Wiegman et al., 2011). Este problema está relacionado con el poco conocimiento taxonómico en la superfamilia Ephydroidea, además de la falta de estudios detallados en la mayoría de especies que la conforman (Grimaldi y Spriggs, 2012).

Científicos como Throckmorton (1975), Ramsen y DeSalle (1998), Kwiatowski y Ayala (1999), O'Grady y Kidwel (2002), enfocaron sus investigaciones en resolver las relaciones filogenéticas dentro de la familia Drosophilidae. Así pues, Throckmorton (1975) plantea varias radiaciones en base a información morfológica, ecológica y geográfica siendo la radiación *Stangininae* la más basal en la familia Drosophilidae seguida de las radiaciones *Drosophilidae*, *Scaptodrosophila*, *Sophophora* y *Drosophila*, en donde la radiación *Drosophila* incluye la radiación *virilis-repleta*, *immigrans-Hirtodrosophila* y el grupo *funnebris*, de igual manera Ramsen y DeSalle (1998) comparan las relaciones filogenéticas morfológicas y moleculares en la familia Drosophilidae, en donde señalan que la radiación

Sophophora es basal a la radiación *Drosophila*, resultado propuesto inicialmente por Throckmorton (1975).

Las dudas que pretendían resolver los análisis moleculares en la familia Drosophilidae quedaron inconclusos, por lo que la atención se centró en los subgéneros *Drosophila*, *Sophophora*, *Hirtodrosophila*, *Dorsilopha* y *Saprinus*; en donde se propone a *Drosophila* y *Sophophora* como clados hermanos y la monofilia del subgénero *Sophophora* (Kwiatowski y Ayala, 1999), resultado que fue apoyado por O'Grady y Kidwel (2002) en base a un estudio molecular de los genes alcohol deshidrogenasa (*ADH*), citocromo oxidasa II (*COII*) y la subunidad 28s del ribosoma.

Con la generación de nuevas técnicas de secuenciación, el número de genes utilizados para el estudio filogenético en el género *Drosophila* aumentó (Hales, Korey, Larracuenta y Roberts, 2015), generando nuevas aportaciones en las que se discute la monofilia del subgénero *Sophophora* (Robe, 2010), y a su vez se propone una nueva división del género *Drosophila* en siete linajes: el linaje III (subgénero *Sophophora*, el género *Lordiphosa*), IV (subgénero *Dorsilopha* y el género *Styloptera*), VII (subgénero *Drosophila*), VIII (*Drosophila Hawaiian*), IX (*Siphlodora*) y los linajes V-VI los cuales incorporan géneros no relacionados (O'Grady y DeSalle, 2018).

Con el fin de solucionar las dudas con respecto a las relaciones filogenéticas en el género *Drosophila*, los estudios científicos se centran en el subgénero *Drosophila*, debido a que incluye más del 50% de especies del género (O'Grady y DeSalle, 2018). Estudios posteriores han contrastado la división del subgénero *Drosophila* sugerida por Throckmorton (1975), en donde la radiación *virilis-repleta* incluye en su mayoría especies neotropicales pertenecientes a los grupos *repleta*, *canalineae* y *mesophragmatica*, siendo este último uno de los grupos más complejos en la radiación *virilis-repleta* debido a la gran similitud morfológica presente entre las especies, por lo que la dificultad en su descripción, taxonomía y filogenia es mayor en relación al resto de especies de la radiación *virilis-repleta* (Brcic y Santibañez, 1957; Robe, Valente, Budnik y Loreto, 2005).

Sin embargo, el grupo *mesophragmatica* que inicialmente estaba conformado por *D. canescens* (Duda, 1927), *D. mesophragmatica* (Duda, 1927) y *D. gaucha* (Jaeger y Salzano, 1953) incrementó su diversidad a un total de 10 especies, en las que se incluye a *D. camaronensis* (Brncici, 1957), *D. gasici* (Brncici, 1957), *D. altiplánica* (Brncic y Koref, 1957), *D. pavani* (Brncici, 1957), *D. orkui* (Brncic y Koref, 1957), *D. viracochi* (Brncic y Koref, 1957) y *D. brncici* (Hunter y Hunter, 1964). Años más tarde, Vela y Rafael (2004) confirman la presencia de las especies *D. mesophragmatica*, *D. gaucha* y *D. pavani* en Ecuador, incluyendo la descripción de tres especies nuevas pertenecientes al grupo *mesophragmatica*: *D. amaguana*, *D. shyri* y *D. ruminahui*. Por consiguiente, la presencia de la mitad de especies en el Ecuador genera inquietud sobre el grupo *mesophragmatica*, intensificando los estudios en los cuales se describen 6 especies nuevas: *D. cashapamba* (Cepédes y Rafael, 2012), *D. chorlavi* (Cepédes y Rafael, 2012), *D. rucux* (Cepédes y Rafael, 2012), *D. yanayuyu* (Cepédes y Rafael, 2012), *D. neoamaguana* (Guillín y Rafael, 2017) y *D. neoyanyuyu* (Guillín y Rafael, 2017).

De este modo, el grupo *mesophragmatica* está conformado por un total de 19 especies, cuyas relaciones filogenéticas no están claras y se han planteado dos propuestas. Vela y Rafael (2004) proponen la división del grupo *mesophragmatica* en dos subgrupos: el subgrupo *mesophragmatica* con las especies: *D. altiplánica*, *D. amaguana*, *D. brncici*, *D. canescens*, *D. camaronensis*, *D. gasici*, *D. gaucha*, *D. mesophragmatica*, *D. orkui*, *D. pavani*, *D. shyri* y el subgrupo *viracochi* con dos especies *D. rumiñahui* y *D. viracochi*. Mientras que Mota et al., (2008) sugiere la división del grupo *mesophragmatica* en tres subgrupos: el subgrupo *viracochi* con *D. viracochi*; el subgrupo *gaucha* con *D. gaucha* y *D. pavani*, y el subgrupo *mesophragmatica* con *D. mesophragmatica*, *D. brncici* y *D. gasici*.

La descripción de nuevas especies y la falta de estudios moleculares no permiten establecer un modelo idóneo que agrupe correctamente a las especies del grupo *mesophragmatica*, por lo tanto, el objetivo de este estudio fue obtener la filogenia molecular del grupo *mesophragmatica*, en base a los genes alcohol deshidrogenasa (*ADH*), alfa metil dopa-resistente (*amd*) y el gen mitocondrial citocromo oxidasa II (*COII*), en la cual se incluyeron datos de siete especies

descritas recientemente y se compararon estos resultados con la clasificación existente basada en datos morfológicos.

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar la filogenia molecular de las especies del grupo *mesophragmatica*, a la cual se sumarán siete especies descritas en el Ecuador.

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer las relaciones filogenéticas de las especies del grupo *mesophragmatica* en base a dos genes nucleares (ADH y amd) y un gen mitocondrial (COII)

Verificar con datos moleculares, que siete especies de *Drosophila* recientemente descritas en Ecuador pertenecen al grupo *mesophragmatica*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ESPECIES INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS

Se utilizó las secuencias codificantes (cds) de los genes *ADH*, *amd* y *COII* en 13 especies agrupadas en dos grupos: el primer grupo conformado por las especies *D. gaucha*, *D. viracochi*, *D.gasici*, *D. brncici*, *D. pavani* y *D. hydei* cuyas secuencias fueron obtenidas de la base de datos NCBI. La especie *D. hydei* muestra una estrecha relación con el grupo *mesophragmatica* (Mota et al., 2008), razón por la cual los cds de los tres genes de *D. hydei* fueron utilizados como molde para la extracción de los cds en las especies de interés. El segundo grupo conformado por la especies *D. mesophragmatica*, *D. amaguana*, *D. cashapamba*, *D. rucux*, *D. neoamaguana*, *D.charlovi* y *D. yanayuyu*, cuyas secuencias fueron extraídas a partir de los genomas secuenciados y ensamblados previamente (Anexo 1).

4.2. EXTRACCIÓN DE SECUENCIAS A PARTIR DEL GENOMA COMPLETO

La extracción de secuencias se realizó usando línea de comandos en el terminal Ubuntu LTS 18.04, en donde se creó una base de datos en NCBI en la cual se incorporó los genomas de *D. mesophragmatica*, *D. amaguana*, *D. cashapamba*, *D. rucux*, *D. neoamaguana*, *D.charlovi* y *D. yanayuyu*. Posteriormente se realizó un blastn (NCBI, 2008) entre los cds de los tres genes de *D. hydei* con el fin de identificar los contigs que contengan la secuencia más similar en los genomas de las 7 especies, cada contig fue extraído en base al E-value más cercano a cero (Anexo 2).

A continuación, se utilizó el programa Dotter 4.44.1 (Sonnhammer y Durbin, 1996) para generar una matriz comparativa entre las secuencias codificantes de los 3 genes de *D. hydei* y las secuencias contig extraídas, donde se obtuvo información sobre las regiones conservadas entre ambas secuencias, dirección de la secuencia, presencia de intrones y exones (Anexo 2), permitiéndonos obtener los puntos en

los cuales se encontraban los cds en cada contig. Con estos valores, se utilizó el programa Artemis 17.0.1 (Rutherford, Parkhill, Crook, Horsnell y Rice, 2000) para delimitar y editar la secuencia de interés, generando un archivo FASTA individual para cada secuencia codificante de los 3 genes en las 7 especies de interés.

4.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias nucleotídicas codificantes de los genes *ADH*, *amd* y *COII* de las 13 especies, fueron concatenadas en 4 archivos FASTA, en donde 3 archivos corresponden a las secuencias individuales de cada gen y un archivo que incluye la combinación de las secuencias de los tres genes para cada especie. Los 4 archivos fueron sometidos a un alineamiento múltiple usando el programa MUSCLE v3.8.1551 (Edgar, 2004), posteriormente cada archivo alineado fue tratado en Gblocks 0.91 (Castresana, 2000) generando 4 archivos correspondientes a los alineamientos curados, en ambos programas se usaron los parámetros predefinidos por el sistema.

Se estimaron cuatro árboles correspondientes a los tres genes individuales y combinados, para determinar las relaciones existentes en el grupo. Las filogenias fueron estimadas bajo el criterio de máxima verosimilitud del programa iqtree (Nguyen, Schmidt, Haeseler y Minh, 2014) cuyo algoritmo genera una reconstrucción filogenética con valores menos sesgados y en menor tiempo (Minh, Anh, Nguyen y Haeseler, 2013), el mejor modelo de tasas de sustitución de bases para cada árbol fue generado por el mismo programa usando ModelFinder (Kalyaanamoorthy, Minh, Wong, Haeseler y Jermini, 2017). Para determinar el valor de cada nodo en la filogenia, se realizó un bootstrap ultrarápido con 1000 pseudoréplicas (Mota et al., 2008). Los soportes de las filogenias fueron definidos por valores bootstrap bajos (<75) y altos (>75).

Como se mencionó anteriormente *D. hydei* está relacionado con el grupo *mesophragmatica* (Mota et al., 2008; L. J. Robe et al., 2005), por lo que fue utilizada como grupo externo para el análisis. Cada árbol fue editado en el programa FigTree.

5. RESULTADOS

5.1. EXTRACCIÓN DE SECUENCIAS

Se obtuvo un total de 21 secuencias correspondientes a los genes *ADH*, *amd* y *COII* pertenecientes a las especies *D. mesophragmatica*, *D. amaguana*, *D. cashapamba*, *D. rucux*, *D. neoamaguana*, *D.charlovi* y *D. yanayuyu* (Anexo 2). Las secuencias del gen *ADH* en las 7 especies presentan una longitud aproximada de 756 pares de bases mientras que para el gen *amd* la longitud de las secuencias es de ~1033 pares de bases, con respecto al gen mitocondrial *COII*, *D. cashapamba* presenta una secuencia de 427 pb mientras que la longitud del resto de especies es de alrededor de 600 pb.

5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los análisis de máxima verosimilitud para los genes nucleares y para el gen mitocondrial, presentan una topología con cambios leves en la ubicación de tres especies *D. chorlavi*, *D. rucux* y *D. viracochi*, sin embargo, se evidencian 3 subgrupos (A, B, C) cuyas relaciones son similares en todos los filogramas obtenidos.

El mejor árbol para el gen *ADH* se encontró mediante el modelo K2P+G4 con una probabilidad logarítmica de -1729.657 (Figura 1). Para *amd* el mejor árbol se encontró con el modelo TNe+G4 con una probabilidad logarítmica de -3569.124 (Figura 2). Para *COII* el mejor árbol se encontró con el modelo TIM2+F+I+G4 con una probabilidad logarítmica de -1336.925 (Figura 3) y el mejor árbol concatenado se obtuvo mediante el modelo SYM+G4 con una probabilidad logarítmica de -6834.350 (Figura 4), todos los modelos incluyen tasas de sitios distribuidos en 4 categorías gamma (G4) y con *COII* se incluye frecuencias contadas desde la alineación (F) y una proporción de sitios invariables (I). Las propiedades de los análisis para cada gen se muestran en la Tabla 1.

De los filogramas obtenidos, el que presenta un soporte más bajo es *COII*, en donde la mayoría de valores bootstrap son menores a 75. La topología de este árbol es la que presenta más diferencias en relación al resto, principalmente en la ubicación de las especies *D. rucux*, *D. chorlavi* y *D. viracochi* ubicadas en los grupos 1 y 2; incluso es el único árbol que incluye a *D. chorlavi* y *D. viracochi* como especies hermanas y a *D. rucux* como primera especie en ramificarse del grupo *mesophragmatica* (Figura 3). Para los genes nucleares *ADH* y *amd* se obtuvieron topologías ligeramente distintas, en primer lugar, la ubicación de *D. yanayuyu* genera la división del grupo *mesophragmatica* en tres grupos para *ADH* y en dos grupos para *amd* (Figura 1, 2), siendo el árbol con *amd* el que muestra una mejor resolución en la filogenia. Con respecto al árbol concatenado, es el que presenta un mejor soporte con valores bootstrap > 75, con excepción en la rama que ubica a *D. chorlavi* en el grupo 2 (Figura 4).

En forma global, en los 4 filogramas se observan 3 subgrupos (A, B y C) cuyas especies mantienen las mismas relaciones en cada subgrupo, el subgrupo A está conformado por las especies *D. amaguana*, *D. cashapamba* y *D. neoamaguana*, el subgrupo B incluye a *D. gaucha* y *D. pavani* y el subgrupo C está conformado por *D. mesophragmatica*, *D. brncici* y *D. gasici*, todos los subgrupos se ubican en el grupo 1 para *amd*, *COII*, y el árbol concatenado, y en el grupo 2 para *ADH*. Cabe destacar que las relaciones entre los subgrupos B y C son similares en los árboles con *ADH*, *amd* y el árbol concatenado, a su vez, en los 4 filogramas se ubica a *D. yanayuyu* cercanamente relacionada a las especies *D. amaguana*, *D. cashapamba* y *D. neoamaguana* independientemente del grupo en el que se encuentren ubicadas para cada filograma.

6. DISCUSIÓN

6.1. FILOGENIA DE LOS GENES *ADH*, *amd* y *COII*

Los genes nucleares (*ADH* y *amd*) y el gen mitocondrial (*COII*) analizados en este trabajo son genes conservados en las especies de la familia *Drosophilidae* cuya información obtenida a partir de los mismos es considerada útil para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas (Robe et al., 2005; Katoh, Izumitani, Yamashita y Watada, 2016; Chen et al., 2019). A pesar de que los resultados generados entre genes nucleares y mitocondriales pueden ser diferentes, la información resultante al combinar ambos análisis puede mejorar la resolución en la filogenia (Grady y Kidwell, 2002), por lo tanto se obtuvieron los filogramas de los genes individuales y concatenados con sus correspondientes valores bootstrap, con el fin de obtener una perspectiva más acertada con respecto a las relaciones filogenéticas del grupo *mesophragmatica*.

Los filogramas obtenidos presentan un soporte distinto, el cual puede estar relacionado con los pares de bases analizados (Tabla 1), en donde un número menor de pares de bases es un factor limitante en los análisis (Zwiebel et al., 1982); razón por la cual el árbol con *amd* muestra un soporte más alto en comparación con los árboles con *ADH* y *COII*. Este resultado contrasta con lo encontrado en el análisis de Li y colaboradores (2012), en donde las relaciones filogenéticas obtenidas para genes mitocondriales presentan un soporte menor en comparación con los genes nucleares. Estas variaciones pueden ser explicadas por la evolución molecular de genes nucleares y mitocondriales, en donde los genes mitocondriales en *Drosophila* presentan una evolución aproximadamente del doble en comparación con los genes nucleares (Moriyama y Powell, 1997), esto debido a que están sujetos a una selección de purificación más fuerte (Havird y Sloan, 2016).

6.2. RELACIONES ENTRE LAS ESPECIES DEL GRUPO *MESOPHRAGMATICA*

Como se mencionó, este estudio demuestra que existen tres subgrupos cuyas relaciones internas se mantienen en todos los filogramas, el subgrupo A integrado por las especies *D. neoamaguana*, *D. cashapamba* y *D. amaguana*; el subgrupo B integrado por *D. gaucha* y *D. pavani* y el subgrupo C que agrupa a las especies *D. brncici*, *D. gasici* y *D. mesophragmatica*.

En primer lugar, en el subgrupo A las tres especies que lo conforman se encuentran cercanamente relacionadas con valores de soporte alto para *ADH*, *amd* y el árbol concatenado, y bajo para *COII*. Los filogramas muestran a *D. neoamaguana* y *D. cashapamba* como especies hermanas, con un valor de soporte bootstrap alto únicamente en el árbol concatenado, mientras que en los árboles individuales los valores de soporte bootstrap son bajos pero mayores a 50, de hecho esta relación es consistente de acuerdo con similitudes morfológicas compartidas entre ambas especies en la genitalia de machos y hembras, en donde los machos presentan la cabeza del edeago recta y sin un proceso dorsal, y las hembras presentan una espermateca irregular (Céspedes y Rafael, 2012; Guillín y Rafael, 2017), por ende morfológicamente estas especies se encuentran cercanamente relacionadas. A su vez, las características mencionadas anteriormente son las que separan a estas dos especies de *D. amaguana* (Vela y Rafael, 2004), contrastando los resultados del presente estudio.

Con respecto a los dos subgrupos B y C, los filogramas obtenidos con los genes nucleares y concatenado son similares a otros estudios (Robe et al., 2005; Mota et al., 2008; Robe, Loreto y Valente, 2010; Morales y Vieira, 2012), en donde las especies *D. gaucha* y *D. pavani*, esta cercanamente relacionadas a las especies *D. brncici*, *D. gasici* y *D. mesophragmatica*, sin embargo el resultado obtenido con *COII*, en donde *D. brncici*, *D. gasici* y *D. mesophragmatica* se encuentran más relacionadas con *D. chorlavi* y *D. viracochi*, también es consistente con lo obtenido por Mota y colaboradores (2008), aunque es necesario aclarar que ambos análisis

presentan valores de soporte bajos, por ende la relación obtenida para este gen puede ser errónea.

Por otro lado, las especies *D. yanayuyu* y *D. rucux* presentan una morfología diferente al resto de especies del grupo *mesophragmatica*, *D. yanayuyu* tiene el tórax atigrado, característica compartida con especies del grupo *repleta*, y *D. rucux* presenta pelos acrosticales heterogéneos (Céspedes y Rafael, 2012). Sin embargo, estudios citológicos confirman a *D. rucux* dentro del grupo *mesophragmatica*, debido a que comparte el mismo número cromosómico ($2n=10$) del resto de especies (Mafla, 2012), dato inexistente para *D. yanayuyu*. A pesar de las diferencias morfológicas y citológicas entre estas dos especies, en nuestro trabajo se obtuvo que *D. yanayuyu* está cercanamente relacionada a las especies *D. neoamaguana*, *D. cashapamba* y *D. amaguana* en todos los árboles, con valores bootstrap altos para *amd* y el árbol concatenado y bajos para *ADH* y *COII*, no obstante, la longitud de la rama en la mayoría de los filogramas indican que *D. yanayuyu* presenta una diferenciación mucho mayor con el resto de especies, por lo tanto, sus relaciones dentro del grupo todavía son inconsistentes. Por otra parte, *D. rucux* se encuentra relacionada a las especies *D. viracochi*, *D. chortalvi*, *D. gaucha*, *D. pavani*, *D. mesophragmatica*, *D. brncici* y *D. gasici* en casi todos los árboles, con valores de soporte bootstrap de 56 para *ADH*, 91 para *amd* y 96 para el árbol concatenado, sin embargo, el alargamiento del cromosoma 5 en esta especie sugiere una relación más estrecha con las especies *D. mesophragmatica*, *D. brncici* y *D. gasici* (Mafla, 2012), al contrario de los resultados obtenidos en este estudio.

D. chortalvi y *D. viracochi* presentan una estrecha relación en todos los filogramas del estudio, aunque solo en *COII* se las agrupa como especies hermanas con un soporte bootstrap bajo. La morfología del edeago, las cerdas escutelares anteriores convergentes y el número cromosómico ($2n=10$), ha permitido agrupar a *D. chortalvi* dentro del grupo *mesophragmatica* y además corroborar su estrecha relación con *D. viracochi* (Céspedes y Rafael, 2012; Mafla, 2012), contrastando con los resultados de esta investigación.

Según los resultados del presente estudio, en el árbol filogenético cuyo soporte es el más alto, las relaciones obtenidas son consistentes con la información morfológica y citológica previa (Nacrur, 1958; Vela y Rafael, 2004; Céspedes y Rafael, 2012; Mafla, 2012; Guillín y Rafael, 2017); no obstante, los resultados obtenidos no comparten las divisiones sugeridas por Vela y Rafael (2004), y Mota y colaboradores (2008), esto se debe a que en el análisis realizado se utilizaron un mayor número de especies cuya información molecular era desconocida, por ende este trabajo necesita ser complementado añadiendo las 7 especies restantes del grupo *mesophragmatica* además de incorporar especies del grupo *repleta* y *tripunctata* debido a que las relaciones de *D. yanayuyu* no son claras.

7. CONCLUSIONES

El análisis filogenético basado en dos genes nucleares (*ADH* y *amd*) y un gen mitocondrial (*COII*) confirman la clasificación de las especies *D. amaguana*, *D. cashapamba*, *D. neoamaguana*, *D. rucux*, *D. chorlavi* y *D. mesophragmatica* dentro del grupo *mesophragmatica*.

Los árboles filogenéticos obtenidos al analizar las 12 especies muestran tres agrupaciones (subgrupos A, B y C) los cuales coinciden con los datos morfológicos y citológicos de estudios previos tomados en cuenta para esta investigación.

La especie *D. yanayuyu* no presenta evidencia suficiente que respalde su agrupación dentro del grupo *mesophragmatica*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, D. y Badovinic, S. (2016). Influence of ovarian muscle contraction and oocyte growth on egg chamber elongation in *Drosophila*. *Development*. 143, 1375-1387. doi: 10.1242/dev.131276
- Brncic, D. y Koref-Santibañez, S. 1957. The mesophragmatica group of species of *Drosophila*. *Evolution*. 11. 300–310
- Brncic. (1957). *Drosophila camaronensis* Brncic, 1957.
- Castresana, J. (2000). Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *European Molecular Biology Laboratory*. 17. 540–552
- Céspedes, D. y Rafael, V. (2012). Cuatro especies nuevas del grupo de especies *Drosophila mesophragmatica* (Diptera, Drosophilidae) de los Andes ecuatorianos. *Iheringia*, 102, 71-79. doi: 10.1590/S0073-47212012000100010
- Chen, A., Chen, C., Katoh, T., Katoh, T., Watada, M., Toda, M., Ritchie, M., Wen, S. (2019). Evolution and diversity of the courtship repertoire in the *Drosophila montium* species group (Diptera: Drosophilidae). *Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1111/jeb.13515>
- Duda O. (1927). Die Südamerikanischen Drosophilidae unter Berücksichtigung auch der anderen Neotropischen sowie Nearktischen Arten. *Naturgesch.*
- Edgar, R. C. (2004). *MUSCLE : a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity*. 19, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Guillín, E. y Rafael, V. (2017). Cinco especies nuevas del género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en la provincia de Napo, Ecuador. *Iheringia*. 107. 1-12. doi: 10.1590/1678-4766e2017022

- Grimaldi, D., Spriggs, A. 2012. Fossil Curtonotidae (Diptera: Schizophora: Ephydroidea). *American Museum Novitates*. 3760. 1-16. doi: 10.1206/3760.2
- Hales, K., Korey, Ch., Larracuente, A., Roberts, D. (2015). Genetics on the fly: A primer on the *Drosophila* model system. *Genetics*. 201 (3). 815-842
- Havird, C., Sloan, B. (2016). The Roles of Mutation, Selection, and Expression in Determining Relative Rates of Evolution in Mitochondrial versus Nuclear Genomes. *Molecular biology and evolution*, 33(12), 3042–3053. doi.org/10.1093/molbev/msw185
- Jaeger, C. Salzano F. (1953). *Drosophila gaucha*, a new species from Brazil. Brazil. *Biol.*
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Haeseler, A. Von, & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder : fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 1–5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Katoh, T., Izumitani, H. F., Yamashita, S., Watada, M. (2016). Multiple origins of Hawaiian drosophilids : Phylogeography of *Scaptomyza* Hardy (Diptera : Drosophilidae). *Entomological Science*. 20 (1). doi.org/10.1111/ens.12222
- Kwiatowski, J. y Ayala, F. (1999). Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 13(2): 319-328
- Li, Y., Wen, S., Kawai, K., Gao, J., Hu, Y., Segawa, R., & Toda, M. J. (2012). DNA Barcoding and Molecular Phylogeny of *Drosophila lini* and Its Sibling Species. *International Journal of Evolutionary Biology*. 2012. doi.org/10.1155/2012/329434
- Mafla, A. (2012). Cariología beta de tres especies pertenecientes al grupo de especies *Drosophila mesophragmatica*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. XXXIII(1), 38–45

- Mahato, S. y Gupta, K. (2018). Species diversity status of family Drosophilidae at Hazaribag , Jharkhand , India. *International Journal of Zoology Studies*. 3. 103-106
- Markow, A., O'Grady, M. (2006). Reproductive ecology of *Drosophila*. *Functional ecology*. 22. 747-759. doi. 10.1111/j.1365-2435.2008.01457.x
- Minh, B. Q., Anh, M., Nguyen, T., & Haeseler, A. Von. (2013). *Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap*. 30(5). 1188–1195. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
- Mishra, K., Sachan, N., Matsuddi, M. y Mukherjee, A. (2014). TRAF6 is a novel regulator of Notch signaling in *Drosophila melanogaster*. *Cellular Signalling*. 26 (12). 3016-3026. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.09.016
- Morales-hojas, R., Vieira, J. (2012). Phylogenetic Patterns of Geographical and Ecological Diversification in the Subgenus *Drosophila*. *Plos One*. 7 (11). 1-15. doi.org/10.1371/journal.pone.0049552
- Moriyama, E., Powell, J. (1997). Synonymous Substitution Rates in *Drosophila*: Mitochondrial Versus Nuclear Genes. *Journal of Molecular evolution*. 45 (4). 378-391
- Mota, N., Robe, L., Valente, V., Budnik, M. y Loreto, E. (2008). Phylogeny of the *Drosophila mesophragmatica* Group (Diptera, Drosophilidae): An Example of Andean Evolution. *Zoological Science*. 25 (5):526–532
- Nacur, J. 1958. Genitalia masculina de *Drosophila* do grupo mesophragmatica (Diptera). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 18(3):243-249
- National Center for Biotechnology Information. 2008. *Command Line Applications User Manual*. United States. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279690/>

- Nguyen, L., Schmidt, H. A., Haeseler, A., & Minh, B. (2014). *IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies*. *32*(1), 268–274.
- O’Grady, M. y DeSalle, R. (2018). Phylogeny of the genus *Drosophila*. *Genetics*. *209*. 1-25. doi: 10.1534/genetics.117.300583
- O’Grady, M. y Kidwell, M. (2002). Phylogeny of the subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. *22*(3): 443–453
- Palmieri, N., Nolte, V., Chen, J. y Schlotterer, C. (2015). Genome assembly and annotation of a *Drosophila simulans* strain from Madagascar. *Molecular Ecology Resources*. *15* (2). 372-381. doi: 10.1111/1755-0998.12297
- Remsen, J. & DeSalle, R. (1998). Character congruence of multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. *9*(2): 225-235.
- Robe, J., Valente, S., Budnik, M., y Loreto, S. (2005). Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. *36*. 623-640. doi: 10.1016/j.ympev.2005.05.005
- Robe, L., Loreto, S., y Valente, S. (2010). Radiation of the “*Drosophila*” subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. *48* (4). 310–321
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P. (2000). *Artemis: sequence visualization and annotation*. 944–945
- Sonnhammer, L., Durbin, R. (1996). *A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis*. 1–10

- Sturtevant, H. (1921). *The North American Species of Drosophila*. Primera edición. Washington: Carnegie Institution of Washington.
- Throckmorton, L. H. (1975). *The phylogeny, ecology, and geography of Drosophila*. New York. Handbook of genetics
- Tidon, R. y De Almeida, M. (2016). Family drosophilidae. *Zootaxa*. 4122 (1). 719-751. doi: 10.11646/zootaxa.4122.1.63
- Vela, D., & Rafael, V. (2004). Tres nuevas especies del grupo guarani, género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en el Bosque Pasochoa, Provincia de Pichincha. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*, 26(1), 14–21
- Wiegmann, B., Trautwein, M., Winkler, I., Barr, N., Kim, J., Lambkin, C., Bertone, A., Cassel, K., Bayless, M., Heimberg, M., Wheeler, M., Peterson, J., Pape, T., Sinclair, J., Skevington, H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, E., Thompson F., Grimaldi, A., Beckenbach, A., Courtney, W., Friedrich, M., Meier, R., Yates, D. (2011). Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108 (14). 5690-5695
- Zwiebel, J., Cohn, H., Wright, R., Moore, P. (1982). Evolution of Single-Copy DNA and the *ADH* Gene in Seven Drosophilids. *Journal of Molecular Evolution*. 19. 62-71

9. FIGURAS

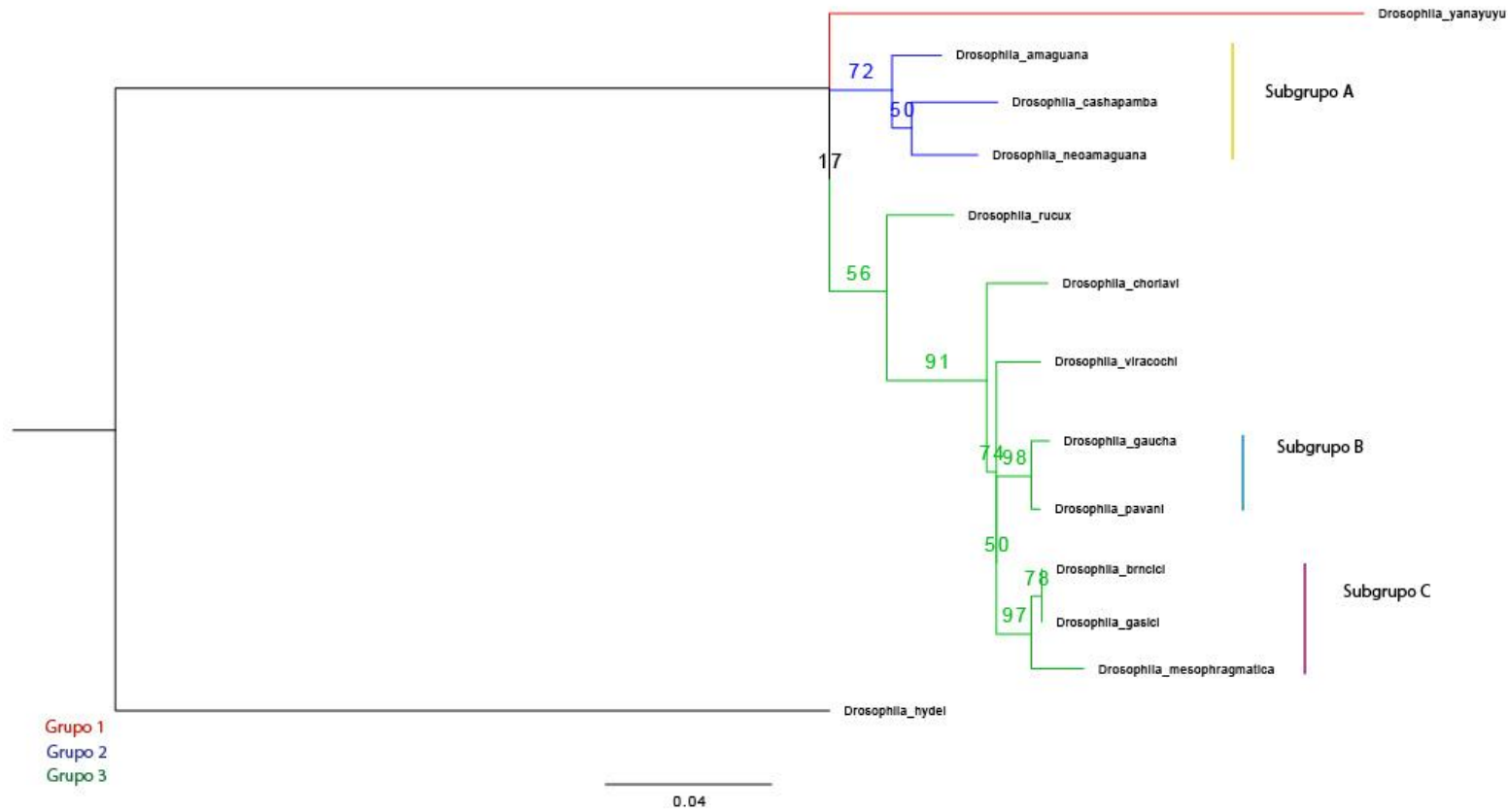


Figura 1. Filograma del grupo *mesophragmatica* con el gen nuclear *ADH*. Los colores de las ramas representan los diferentes grupos obtenidos en el estudio. Sobre cada rama se encuentra el valor de soporte bootstrap.

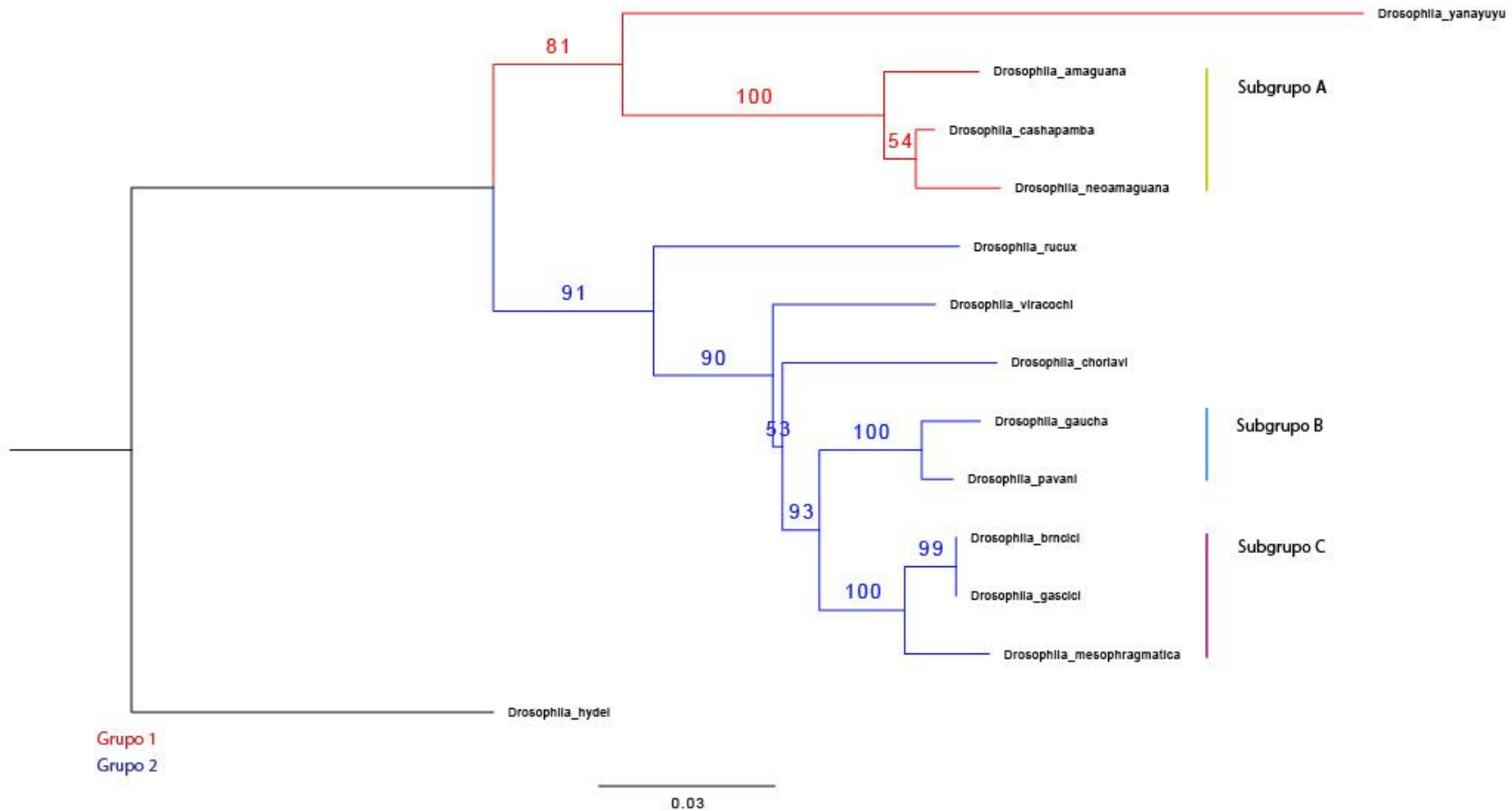


Figura 2. Filograma del grupo *mesophragmatica* con el gen nuclear *amd*. Los colores de las ramas representan los diferentes grupos obtenidos en el estudio. Sobre cada rama se encuentra el valor de soporte bootstrap.

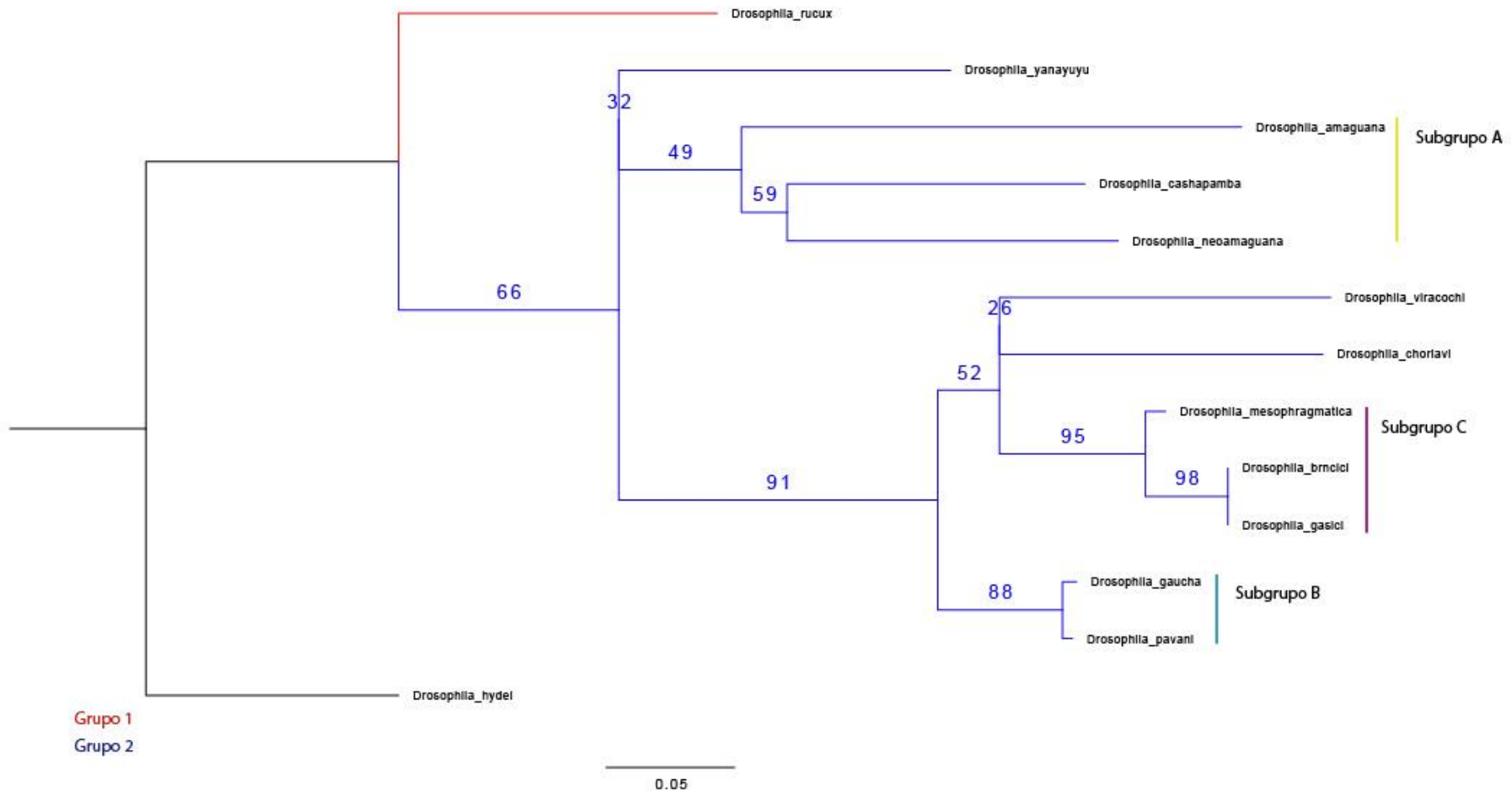


Figura 3. Filograma del grupo *mesophragmatica* con el gen mitocondrial *COII*. Los colores de las ramas representan los diferentes grupos obtenidos en el estudio. Sobre cada rama se encuentra el valor de soporte bootstrap.

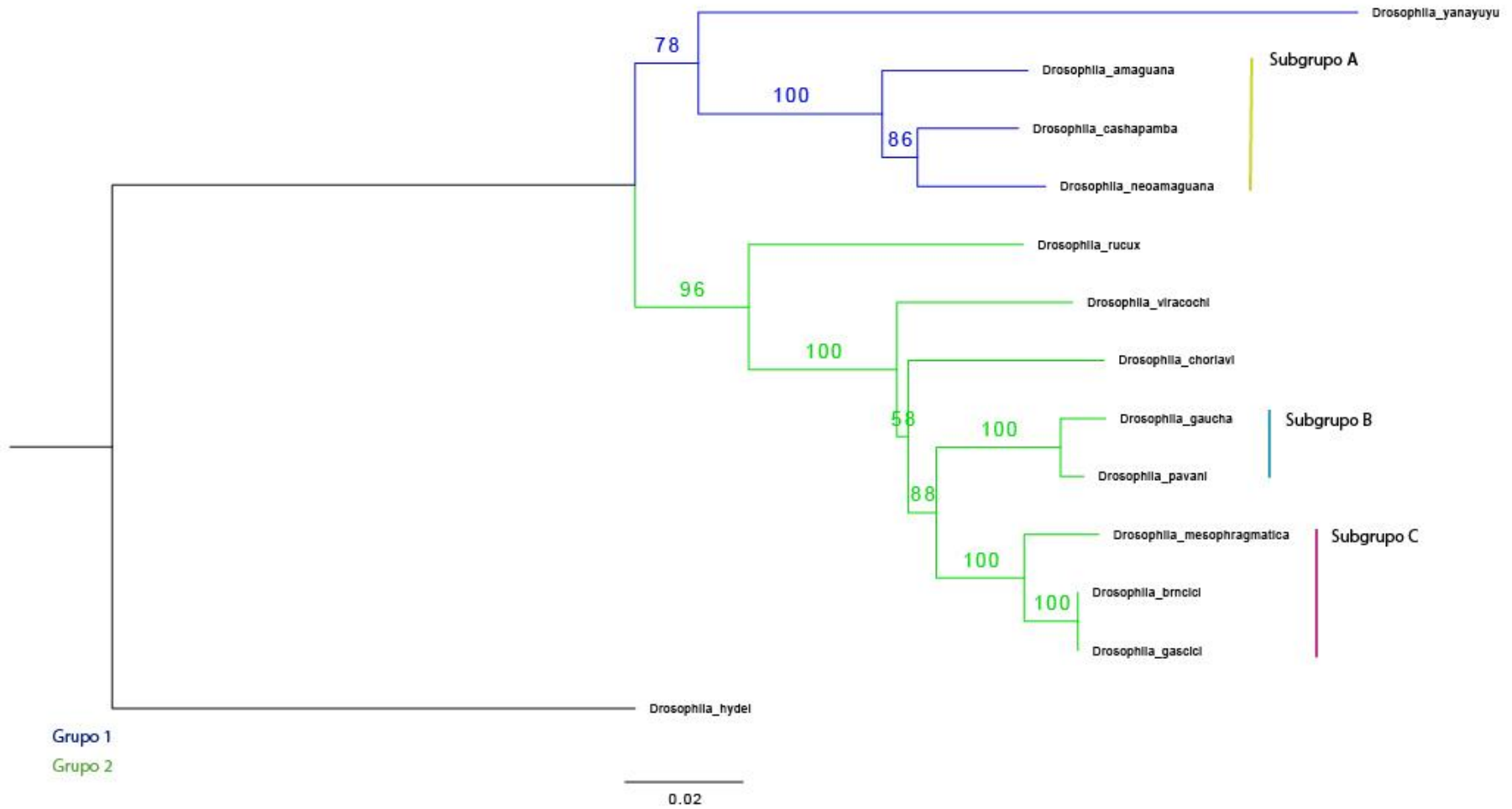


Figura 4. Filograma del grupo *mesophragmatica* con genes concatenados. Los colores de las ramas representan los diferentes grupos obtenidos en el estudio. Sobre cada rama se encuentra el valor de soporte bootstrap.

10. TABLAS

Tabla 1. Características de las secuencias analizadas de los genes *ADH*, *amd* y *COII*

| | <i>ADH</i> | <i>Amd</i> | <i>COII</i> |
|---|------------|------------|-------------|
| Pares de bases analizadas | 492 | 941 | 340 |
| Número de sitios informativos de parsimonia | 52 | 153 | 68 |
| Frecuencia de nucleótidos | | | |
| A | 25 | 25 | 33.7 |
| C | 25 | 25 | 12 |
| G | 25 | 25 | 12 |
| T | 25 | 25 | 42.4 |
| Parámetro Gamma | 0.335 | 0.289 | 0.484 |
| Tasa de la matriz | | | |
| A-C | 1.00000 | 1.00000 | 5.88387 |
| A-G | 3.20186 | 3.36648 | 11.89134 |
| A-T | 1.00000 | 1.00000 | 5.88387 |
| C-G | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 |
| C-T | 3.20186 | 5.16054 | 100.000 |
| G-T | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 |

11. ANEXO

Anexo 1. Especies utilizadas en el estudio y número de acceso GenBank

| GRUPO | ESPECIE | ADH ACCESO | amd ACCESO | COII ACCESO |
|-------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | <i>D. brncici</i> | EF560573.1 | EF560566.1 | AY847757.1 |
| | <i>D. gaucha</i> | EF560579.1 | AF324955.1 | AF478423.1 |
| | <i>D. gasici</i> | EF560576.1 | EF560568.1 | AY847762.1 |
| | <i>D. hydei</i> | XM_023321692.2 | AF293712.1 | GQ244454.1 |
| | <i>D. pavani</i> | EF560580.1 | EF560570.1 | AY847771.1 |
| | <i>D. viracochi</i> | EF560578.1 | EF560571.1 | AY847773.1 |
| 2 | <i>D. amaguana</i> | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado |
| | <i>D. cashapamba</i> | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado |
| | <i>D. chorlavi</i> | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado |
| | <i>D. mesophragmatica</i> | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado |
| | <i>D. neoamaguana</i> | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado |
| | <i>D. rucux</i> | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado |
| | <i>D. yanayuyu</i> | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado | Genoma secuenciado |

Anexo 2. Información de los contigs extraídos

| GEN CORRESPONDIENTE | ESPECIE | CONTIG | E-VALUE | SENTIDO DE LA SECUENCIA | INTRONES | EXONES |
|---------------------|---------------------------|------------------|-----------|-------------------------|----------|--------|
| ADH | <i>D. amaguana</i> | jcf7180002884595 | 2.00E-78 | 3'-5' | 2 | 3 |
| ADH | <i>D. cashapamba</i> | jcf7180002225261 | 6.00E-82 | 3'-5' | 2 | 3 |
| ADH | <i>D. chorlavi</i> | jcf7180001063200 | 5.00E-81 | 5'-3' | 2 | 3 |
| ADH | <i>D. mesophragmatica</i> | jcf7180001816055 | 6.00E-88 | 5'-3' | 2 | 3 |
| ADH | <i>D. neoamaguana</i> | jcf7180001512138 | 4.00E-76 | 5'-3' | 2 | 3 |
| ADH | <i>D. rucux</i> | jcf7180001658517 | 2.00E-85 | 5'-3' | 2 | 3 |
| ADH | <i>D. yanayuyu</i> | jcf7180002358001 | 5.00E-70 | 3'-5' | 2 | 3 |
| amd | <i>D. amaguana</i> | jcf7180002879235 | 0 | 3'-5' | 1 | 2 |
| amd | <i>D. cashapamba</i> | jcf7180002219335 | 0 | 3'-5' | 1 | 2 |
| amd | <i>D. chorlavi</i> | jcf7180001061809 | 0 | 5'-3' | 1 | 2 |
| amd | <i>D. mesophragmatica</i> | jcf7180001779083 | 0 | 3'-5' | 1 | 2 |
| amd | <i>D. neoamaguana</i> | jcf7180001522179 | 0 | 5'-3' | 1 | 2 |
| amd | <i>D. rucux</i> | jcf7180001652418 | 0 | 3'-5' | 1 | 2 |
| amd | <i>D. yanayuyu</i> | jcf718002355117 | 0 | 5'-3' | 1 | 2 |
| COII | <i>D. amaguana</i> | jcf7180002862497 | 0 | 3'-5' | 0 | 1 |
| COII | <i>D. cashapamba</i> | jcf7180002142981 | 8.00E-161 | 3'-5' | 0 | 1 |
| COII | <i>D. chorlavi</i> | jcf7180001062558 | 0 | 5'-3' | 0 | 1 |
| COII | <i>D. mesophragmatica</i> | jcf7180001776031 | 0 | 3'-5' | 0 | 1 |
| COII | <i>D. neoamaguana</i> | jcf7180001507313 | 0 | 3'-5' | 0 | 1 |
| COII | <i>D. rucux</i> | jcf7180001569763 | 0 | 5'-3' | 0 | 1 |
| COII | <i>D. yanayuyu</i> | jcf7180002289021 | 0 | 5'-3' | 0 | 1 |