

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Filogenia molecular de especies ecuatorianas del grupo *Drosophila*
mesophragmatica (Diptera, Drosophilidae)**

Tesis previa a la obtención del título de Magister en Biología de la Conservación

MARÍA LUNA FIGUERO BOZA

Quito, 2017

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Certifico que la tesis de Magíster en Biología de la Conservación de la candidata María Luna Figuro ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente

Dra. Violeta Rafael

Directora de la disertación

Quito, Enero 2017

A mi madre y a mi hijo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por permitirme cursar la Maestría en Biología de la Conservación y proporcionarme con una beca parcial.

A la Doctora Violeta Rafael, por toda su enseñanza, por su apoyo y cariño. Por permitirme realizar este trabajo con especies tan importantes y queridas para ella.

A Doris Vela por instruirme en algunas de las técnicas moleculares y aportarme con comentarios y sugerencias valiosas. A Omar Torres y Santiago Ron, por permitirme realizar parte de mi trabajo en el Laboratorio de Biología Molecular del Museo QCAZ, así como darme acceso a los computadores para realizar los análisis estadísticos; además a Omar Torres, por revisar mi trabajo y realizar observaciones y sugerencias imprescindibles.

A todos los tesistas, estudiantes, becarios y voluntarios que han pasado por el laboratorio de Genética Evolutiva. Cada uno de ellos ha sido parte importante de este trabajo.

A Gabriela Castillo, Andrea Manzano y todas las personas que trabajan en el laboratorio de Biología Molecular del Museo QCAZ.

A Ana Troya por su apoyo y amistad incondicional. A Francisca Hervas por su amistad y por ayudarme en los análisis estadísticos. A Marcel Caminer por su enseñanza y paciencia.

A todos mis amigos y amigas, colegas que me han ayudado y aguantado durante este proceso.

A mis hermanas, a mi madre y a mi padre por siempre estar ahí. A mi familia política por su ayuda y apoyo. A Christian Samaniego por su comprensión y gracias sobre todo a mi hijo por aparecer en mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE <i>DROSOPHILA</i>	3
3.2. FILOGENIA Y CONSERVACIÓN	7
3.3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	9
4. METODOLOGÍA	10
4.1. FASE DE CAMPO	10
4.2. FASE DE LABORATORIO.....	11
4.2.1. Reproducción de especies	11
4.2.2. Muestras de ADN.....	11
4.2.1. Amplificación y secuenciamiento	12
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	13
4.3.1. Ensamble, edición, alineamiento y modelos evolutivos	13
4.3.2. Análisis filogenéticos.....	13
5. RESULTADOS.....	16
5.1. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO.....	16
5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	16
6. DISCUSIÓN	19
6.1. FILOGENIAS DE COII Y HB	19
6.2. RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO <i>DROSOPHILA</i>	20

6.2.1. Grupo <i>mesophragmatica</i>	22
6.2.2. Clados A y B	24
6.3. DIVERSIDAD Y TAXONOMÍA DE <i>DROSOPHILA</i>	26
6.4. RECOMENDACIONES.....	27
7. LITERATURA CITADA.....	29
8. FIGURAS.....	41
9. TABLAS	53
10. ANEXOS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a.	Secuencias amplificadas de <i>COII</i> de <i>D. mesophragmatica</i> y <i>D. guayllabambae</i>	42
Figura 1b.	Secuencias amplificadas de <i>COII</i> del resto de especies utilizadas en el estudio.....	42
Figura 1c.	Secuencias amplificadas de <i>Hb</i> de las especies utilizadas en el estudio, a excepción de las poblaciones de <i>D. amaguana</i>	43
Figura 1d.	Secuencias amplificadas de <i>Hb</i> para las poblaciones de <i>D. amaguana</i>	43
Figura 2.	Filograma mostrando las relaciones de las especies ecuatorianas del género <i>Drosophila</i> con el gen mitocondrial <i>COII</i>	44
Figura 3.	Filograma mostrando las relaciones de las especies ecuatorianas del género <i>Drosophila</i> con el gen nuclear <i>Hb</i>	46
Figura 4.	Filograma mostrando las relaciones de las especies ecuatorianas del género <i>Drosophila</i> con dos genes concatenados (<i>COII</i> y <i>Hb</i>)....	48
Figura 5.	Filograma del árbol de máxima credibilidad de los clados mostrando las relaciones de las especies ecuatorianas del género	
Figura 6.	<i>Drosophila</i> con dos genes concatenados (<i>COII</i> y <i>Hb</i>).....	50
	Estructuras de la genitalia interna de machos y hembras de las especies que conforman el clado A.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1a.	Áreas de estudio de la provincia de Pichincha.....	54
Tabla 1b.	Áreas de estudio de la provincia de Napo.....	54
Tabla 2.	Lista de las especies y poblaciones del género <i>Drosophila</i> utilizadas en el estudio.....	55
Tabla 3.	Cebadores que se utilizaron en el estudio.....	56
Tabla 4a.	Condiciones de la PCR para la amplificación de <i>COII</i>	56
Tabla 4b.	Condiciones de la PCR para la amplificación de <i>Hb</i>	56
Tabla 5.	Especies de la familia Drosophilidae incluidas en el análisis.....	57
Tabla 6.	Modelos evolutivos.....	60

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Protocolo de extracción de ADN modificado de Piñol <i>et al.</i> 1998..	62
----------	---	----

1. RESUMEN

La diversidad del género *Drosophila* en Ecuador es aún subestimada; en las últimas dos décadas se han descrito más de 70 especies y existen registradas al menos 150 más. A pesar de la gran diversidad y endemismo existente, son pocos los trabajos que abordan aspectos filogenéticos donde se incluyan a especies ecuatorianas en los análisis. En el presente estudio, se realizó la filogenia de siete especies ecuatorianas del grupo *mesophragmatica* (*D. amaguana*, *D. cashapamba*, *D. chorlavi*, *D. mesophragmatica*, *D. neoamaguana*, *D. rucux*, *D. yanayuyu*) y cuatro especies más de otros grupos (*D. ecuatoriana*, *D. guayllabambae*, *D. papallacta*, *D. paschoensis*). Para ello, se amplificó y secuenció el gen mitocondrial *COII* y el gen nuclear *Hb*. En el análisis se incluyeron 93 secuencias del GeneBank de otras especies de la familia Drosophilidae y se obtuvieron árboles filogenéticos mediante los análisis de máxima verosimilitud y de inferencia bayesiana. Los resultados obtenidos nos mostraron que únicamente *D. chorlavi* pertenece al grupo *mesophragmatica*, mientras que las otras especies forman dos clados (A y B). En general se obtuvieron valores bajos de bootstrap y probabilidades posteriores en las filogenias, principalmente en las ramas basales, por lo que fue imposible establecer las relaciones de los clados A y B con el grupo *mesophragmatica*. Con este trabajo se ha realizado una primera aproximación de las relaciones evolutivas de las especies que hemos descubierto en el país, sin embargo se recomienda realizar más análisis donde se incluyan más marcadores.

Palabras Clave: *COII*, *Drosophila*, filogenia, *Hb*, *mesophragmatica*.

2. ABSTRACT

The diversity of the genus *Drosophila* in Ecuador is still unknown. In the last two decades more than 70 species have been described and there are at least 150 recorded. In spite of the great diversity and endemism, there are few studies that address phylogenetic aspects where ecuadorian species are included. In our study, we present the phylogeny of seven species of the *mesophragmatica* group (*D. amaguana*, *D. cashapamba*, *D. chorlavi*, *D. mesophragmatica*, *D. neoamaguana*, *D. rucux*, *D. yanayuyu*) and four species of other groups (*D. ecuatoriana*, *D. guayllabambae*, *D. papallacta*, *D. paschoensis*). For this, the mitochondrial *COII* gene and the nuclear *Hb* gene were amplified and sequenced. The analysis included 93 GeneBank sequences from other species of the Drosophilidae family. Phylogenetic trees were obtained by maximum verosimilitid and Bayesian inference. The results showed that only *D. chorlavi* belongs to the *mesophragmatica* group, whereas the other species form two clades (A and B). In general, low bootstrap values and posterior probabilities were obtained, mainly in the basal branches, so it was impossible to establish the relationships of clades A and B with the *mesophragmatic* group. This work has made a first approximation of the evolutionary relationships of the species that we have discovered in the country, however it is recommended to carry out more analysis where more species and more markers are included.

Key Words: *COII*, *Drosophila*, *Hb*, *mesophragmatica*, phylogeny.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE *DROSOPHILA*

Desde los trabajos realizados por Throckmorton en 1957 basados en caracteres morfológicos, hasta los estudios donde se utilizan genomas enteros (Seetharam & Stuart, 2013), los esfuerzos para aclarar las relaciones filogenéticas de los miembros de la familia de dípteros más diversa y famosa de la historia son innumerables. Se trata de la familia Drosophilidae, compuesta por alrededor de 73 géneros y más de 3950 especies (Brake & Bächli, 2008) y considerada una familia grande y diversa incluso para los estándares de los dípteros en general (Tatarenkov *et al.* 2001). Los miembros de este grupo de insectos presenta una gran variación a nivel morfológico y están distribuidos en casi todos los rincones del planeta, presentando una amplia gama de nichos, esto ha hecho que Drosophilidae sea especialmente atractiva para los trabajos realizados en sistemática, ecología, taxonomía y filogenética (Remse & O'Grady, 2002).

Los estudios filogenéticos a nivel molecular más generales incluyen a varios géneros de la familia (Tatarenkov *et al.* 2001; Remsen & O'Grady, 2002; Da Lage *et al.* 2007; van der Linde *et al.* 2010; Seetharam & Stuart, 2013), mientras que otros se han concentrado en especies de drosophilidos de una localidad específica (i.e. O'Grady & DeSalle, 2008; Robe *et al.* 2005, 2010a). Sin embargo, la mayoría de estudios que infieren relaciones filogenéticas realizados en la familia se han enfocado en el género más diverso; *Drosophila* (Remse & O'Grady, 2002). Este género presenta ocho subgéneros, de los cuales dos son los más importantes; el subgénero *Sophophora* donde se encuentra *Drosophila melanogaster* y el subgénero *Drosophila*, el más abundante. Según Throckmorton (1975) el subgénero *Drosophila* presenta dos radiaciones importantes; la radiación *immigrans-Hirtodrosophila* y la radiación *virilis-repleta*; ambas de

origen tropical (Morales-Hojas & Vieira, 2012). En el neotrópico se han realizado varios esfuerzos por entender las relaciones filogenéticas de las especies de los grupos del subgénero *Drosophila*; como los realizados en los subgrupos del grupo *repleta* (Durando *et al.* 2000; Tatarenkov & Ayala, 2001; Moran & Fontdevila, 2005; Silva-Bernardi *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2012; Acurio, 2015), un grupo con más de 100 especies descritas y con relaciones filogenéticas complejas. Otro grupo similar en abundancia, pero menos estudiado, ha sido el grupo *tripunctata* (Yotoko *et al.* 2003, Robe *et al.* 2010), que tiene representantes tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo. Por otro lado, la brasileña Lizandra Robe ha liderado y colaborado en varias investigaciones para resolver las relaciones filogenéticas de otros grupos de especies neotropicales menos numerosos dentro del subgénero como el grupo *guarani* (Robe *et al.* 2002), grupo *mesophragmatica* (Mota *et al.* 2008), grupo *cardini* (Cenzi De Ré *et al.* 2010) y grupo *flavopilosa* (Robe *et al.* 2013).

En Ecuador la diversidad del subgénero *Drosophila* es aún subestimada, en las últimas dos décadas se han descrito más de 70 especies (Vela & Rafael, 2001; Rafael & Vela, 2003; Vela & Rafael, 2004; Vela & Rafael, 2005a; Vela & Rafael, 2005b; Figuero & Rafael, 2011; Céspedes & Rafael, 2012a; Céspedes & Rafael, 2012b; Figuero *et al.* 2012a; Figuero *et al.* 2012b; Llangarí, 2012; Acurio *et al.* 2013; Cabezas & Rafael, 2013; Figuero & Rafael, 2013; Cabezas & Rafael, 2015; Cabezas *et al.* 2015; Ramos, 2015; Tamayo & Rafael, 2016) y por el momento se cuenta con aproximadamente 150 especies registradas. A pesar de la gran diversidad y endemismo existente, hay pocos trabajos en los que se abordan aspectos filogenéticos a nivel morfológico y molecular donde se incluyen especies ecuatorianas en los análisis (Morán & Fontdevilla 2005, 2007; Acurio *et al.* 2013; Acurio, 2015). Las especies incluidas en estos trabajos fueron *D. guayllabambae* (subgrupo *hydei*, grupo *repleta*); *D.*

machalilla (grupo *atalaia*) y *D. inca*, *D. yangana*, *D. huancavilcae* (subgrupo *inca*, grupo *repleta*).

El grupo *mesophragmatica* ha incrementado su diversidad en los últimos años, por lo que nos hemos enfocado en la reproducción y recolección de estas especies. Este grupo es exclusivamente neotropical, endémico de América del Sur y la mayoría de las especies se encuentran distribuidas en el Ecuador (Céspedes y Rafael, 2012a; Vela y Rafael, 2004; Mota *et al.* 2008). El grupo fue propuesto por Brncic y Koref Santibañez en 1957 y se componía de seis especies neotropicales. En el 2004, Vela y Rafael describieron por primera vez para Ecuador, tres especies pertenecientes al grupo *D. mesophragmatica* halladas en el Pasochoa (Pichincha); para entonces el grupo ya estaba conformado por un total de 13 especies. En el 2012, Céspedes y Rafael descubren en varias localidades de la sierra (Pichincha e Imbabura) a cuatro especies más, haciendo un total de 17 especies. Por lo tanto, en los últimos años se han descubierto al menos 7 especies nuevas del grupo, todas distribuidas en los bosques andinos y páramos sobre los 2 000 m de altitud, lo que nos indica que el grupo es principalmente andino y que quedan numerosos hábitats que explorar donde posiblemente se pueden encontrar más especies del grupo. Estos datos revelan la gran diversidad del grupo de especies *mesophragmatica* en los bosques ecuatorianos; sin embargo no es suficiente sólo conocer el número de especies, sino también su historia evolutiva y sus relaciones filogenéticas.

El primer estudio para clasificar al grupo *mesophragmatica* fue realizado por Brncic y Koref Santibañez en 1957; quienes propusieron una clave dicotómica para la identificación de las especies en base a análisis cromosómico y morfológicos, y dividieron a las seis especies en tres linajes: 1. *D. viracochi* (cerdas escutelares convergentes), 2. *D. mesophragmatica*, *D. orkui* y *D. altiplanica* (cerdas escutelares divergentes); 3. *D. pavani* y *D. gaucha* (claras, cerdas

escutelares divergentes). En 1958, Nacrur propone la división de las seis especies del grupo en sólo dos linajes basándose también en la dirección de las cerdas escutelares; esta separación taxonómica fue ratificada por Vela y Rafael en el 2004 quienes dividen al grupo en el subgrupo *mesophragmatica* (cerdas escutelares divergentes) con 11 especies y el subgrupo *viracochi* (cerdas escutelares convergentes) con *D. viracochi* y *D. ruminahuii*. Otros autores han realizado análisis a nivel citológico (Brncic *et al.* 1971) y de isoenzimas (Nair *et al.* 1971) con el propósito de inferir las relaciones filogenéticas de las especies dentro del grupo, sin embargo, solo en el año 2008 Mota y colaboradores realizan árboles filogenéticos de las relaciones de seis especies del grupo en base al análisis de cinco genes. Mota y colaboradores determinaron que el grupo *mesophragmatica* es monofilético y en los árboles observaron una división en tres subgrupos o clados por lo que confirmaron lo propuesto por Brncic y Kref Santibañez en 1957; sin embargo las especies utilizadas en el análisis son pocas en relación a las que actualmente conforman el grupo (17 especies).

Aunque en varios estudios un poco más amplios se incluye alguna especie del grupo *mesophragmatica* (Durando *et al.* 2000; Tatarenkov & Ayala, 2001; Oliveira *et al.* 2012), en pocos se analizan a varias especies del grupo (Robe *et al.* 2005, 2010a y Mota *et al.* 2008). Los descubrimientos de especies nuevas dentro del grupo *mesophragmatica* han motivado la realización del presente trabajo, donde se intenta esclarecer las relaciones filogenéticas moleculares de las especies nuevas en relación a aquellas utilizadas en otros análisis (Mota *et al.* 2008). También se tomó en cuenta para los análisis a otras especies ecuatorianas que no pertenecen al grupo *mesophragmatica*, estas fueron *D. ecuatoriana* (grupo *guarani*), *D. pasochoensis* (grupo *tripunctata*) y *D. papallacta* (sin agrupar) además de todas las especies

ecuatorianas ya utilizadas en otros estudios y especies de otros grupos neotropicales (Robe *et al.* 2005, 2010a, b).

3.2. FILOGENIA Y CONSERVACIÓN

Los insectos, como las especies del género *Drosophila*, ocupan una posición central en estudios dirigidos a la diversidad de las comunidades y la conservación de los ecosistemas (Cavasini, 2009). El interés por utilizar insectos en los estudios de distribución de la diversidad biológica y sus causas ha aumentado en los últimos años (De Medeiros & Klaczko, 2004), ya que estos desempeñan en los bosques funciones muy diversas e importantes tales como descomponedores, polinizadores, depredadores, parásitos, o vectores de organismos patógenos (Dajoz, 2000). Además se ha encontrado que algunas especies de drosófilas tienen una alta asociación con flores de varias plantas nativas de los bosques andinos (Llangarí, 2012; Figuero *et al.* 2014); hay que recalcar que esclarecer la taxonomía y las relaciones filogenéticas de las especies es una de las bases para la conservación de las mismas y por ende de sus ecosistemas. Para determinar qué ecosistemas deben ser conservados, normalmente se determinaría la riqueza de especies vegetales y animales, sin embargo la riqueza de especies asume que todas las especies tiene el mismo valor como unidades de conservación (Faith, 1992). Pero en realidad la extinción de especies que no están cercanamente relacionadas a ninguna otra especie viva, representaría una pérdida desproporcionada de historia evolutiva y diversidad genética (Rodrigues & Gaston, 2002); en comparación a la extinción de una especie con muchas especies altamente relacionadas o similares genéticamente por lo que determinar su filogenia (Vásquez & Gittleman, 1998) y posteriormente su diversidad filogenética (Winter *et al.* 2013) es primordial en el momento de tomar decisiones sobre conservación.

Dentro del género *Drosophila*, las especies del grupo *mesophragmatica* tienen especial importancia para la conservación por su distribución andina y por vivir en hábitats extremos como los páramos. Por ejemplo *D. papallacta* es bastante particular, ya que es una especie que se encuentra hasta los 4 200 m de altura (Figuro & Rafael, 2013). Futuros estudios sobre cambio climático y vulnerabilidad de los insectos en ecosistemas como los páramos podrían tomar a esta especie como modelo en estudios de cambio climático, ya que además de ser una especie rara, posiblemente sea una especie con alta adaptabilidad a los cambios en las temperaturas. Un ejemplo de esto son los estudios realizados por Kellermann y colaboradores (2009, 2012a, 2012b, 2013) donde las especies del género *Drosophila* y sus relaciones filogenéticas se correlacionan con tolerancias térmicas para intentar determinar si las especies podrían adaptarse a futuros cambios climáticos, o su historia evolutiva (filogenia) no se lo permitiría. Los resultados obtenidos por Kellermann y colaboradores (2013) sugieren que los caracteres de resistencia al estrés (frío, calor, desecación) son moldeados por la selección natural, más que por limitaciones genéticas. Es decir que incluso cuando se producen interacciones genéticas, estas pueden romperse mediante selección. Sin embargo, existen estudios menos recientes, que no llegan a la misma conclusión, ya que han demostrado que la genética de las especies podría limitar o retardar futuras respuestas evolutivas (Etterson & Shaw, 2001).

En dichos estudios, se han incluido especies que se conoce viven en hábitats extremos, tales como son las especies del grupo *repleta* con tolerancias a la desecación y a temperaturas extremas, sin embargo especies tan particulares como las andinas, que resisten cambios bruscos de temperatura, desecación y humedad, no se incluyen. Esperamos que en adelante, con este y futuros estudios se las pueda incluir en estos análisis tan interesantes e importantes.

3.3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los estudios filogenéticos con especies ecuatorianas del subgénero *Drosophila* son escasos, por lo tanto se decidió realizar la filogenia con las especies del grupo *mesophragmatica* debido al aumento considerable de especies nuevas del grupo en el país. Por otro lado, este grupo presenta una distribución principalmente andina, por lo que determinar sus relaciones filogenéticas serían el inicio de una serie de trabajos que podrían contribuir a la conservación de estos ecosistemas andinos, por ejemplo impulsando el uso de especies de este grupo como modelos en investigaciones relacionadas al cambio climático.

El objetivo principal del presente estudio fue realizar la filogenia molecular de las especies ecuatorianas del grupo *D. mesophragmatica* con la finalidad de: (1) inferir el origen y diversificación del grupo en el país; (2) probar la monofilia del grupo *D. mesophragmatica*; (3) determinar las relaciones de las especies ecuatorianas dentro del grupo *D. mesophragmatica*; (4) ubicar al grupo en comparación a grupos externos y por último (5) poner a prueba la ubicación de *D. papallacta* y *D. paschoensis* dentro del grupo *D. mesophragmatica* y a *D. ecuatoriana* como una especie del grupo *D. guarani*. Para ello se construyeron árboles filogenéticos con secuencias de un gen mitocondrial, un gen nuclear y de ambos genes concatenados de 84 especies de la familia Drosophilidae, esto mediante métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana.

4. METODOLOGÍA

4.1. FASE DE CAMPO

Durante los últimos años se han recolectado especies del género *Drosophila* en diversos bosques andinos de la provincia de Pichincha y Napo (Tablas 1a y 1b), donde se han descubierto varias especies nuevas del grupo *D. mesophragmatica*. Algunas de estas especies han tenido éxito en su reproducción *ex situ* y se han mantenido por años en laboratorio, sin embargo otras especies tienen requerimientos diferentes y ha sido más difícil su manutención y reproducción. Por lo tanto se realizaron varias salidas de campo con el objetivo de recolectar aquellas especies del grupo que no se han podido mantener en laboratorio con el objetivo de reproducirlas. Estas especies fueron: *D. mesophragmatica*, *D. amaguana*, *D. neoamaguana*, *D. rucux*, *D. yanayuyu*, *D. paschoensis* y *D. papallacta*.

Para la captura de las moscas se utilizaron trampas que fueron elaboradas reciclando botellas plásticas de 250 y 500 ml. Las trampas tenían una abertura para colocar el cebo y varios pequeños orificios laterales para la entrada de las moscas. Como cebo se utilizó plátano con solución de levadura. Las trampas se colgaron en arbustos o árboles por varios días (15 a 21 días) dependiendo del lugar. Las moscas recolectadas fueron trasladadas al laboratorio en tubos con medio de cultivo gelatina-banano. Terminado el período de recolección todas las trampas fueron retiradas de las áreas de estudio.

4.2. FASES DE LABORATORIO

4.2.1. Reproducción de especies

Se intentó reproducir al mayor número de especies del grupo *mesophragmatica* en condiciones de laboratorio, para lo cual se fundaron isólinas que nos permitieron obtener material biológico para el análisis molecular. Las isólinas se mantuvieron en un cuarto frío a una temperatura promedio de 17°C, en medio de cultivo de gelatina-banano. En algunos casos se añadió uvilla esterilizada a los medios de cultivo o leche en polvo. *D. papallacta* es una especie difícil de reproducir por lo que en ese caso, se identificaron a los individuos traídos del campo y se los colocó en frascos con medio de cultivo de plátano y uvilla esterilizada, formando así una población de esta especie.

4.2.2. Muestras de ADN

La extracción de ADN se realizó de individuos enteros de las especies de interés mediante el protocolo de Piñol *et al.* 1988 (Anexo 1). Se extrajo ADN de al menos cinco individuos de cada especie y/o población (Tabla 2). Se cuantificó el ADN con un espectrofotómetro Nanodrop2000 marca Thermo Scientific colocando de 1 a 2 µl de muestra en el Nanodrop. Posteriormente se realizaron diluciones del ADN obtenido de cada especie con agua destilada y autoclavada, a una concentración estándar de 20 ng/µl.

4.2.3. Amplificación y secuenciamiento

Se intentó amplificar parte de las secuencias de cuatro genes nucleares: Alcohol deshidrogenasa (*Adh*); α -metildopa (*Amd*); dopa-decarboxilasa (*ddc*) y Hunchback (*Hb*) y un gen mitocondrial: subunidad II de la citocromo oxidasa (*COII*). De los cinco genes, únicamente se logró amplificar secuencias de dos de ellos, estas fueron *COII* (786 pb: parte de tLeu, 684 pb del gen *COII* completo y parte de tLys) y *Hb* (~820 pb, parte del tercer exón). Los cebadores utilizados se sintetizaron en base a estudios anteriores (Tabla 3) con Invitrogen, Carlsbad, CA. Las amplificaciones se realizaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) que se estandarizó para cada uno de los genes (Tablas 4a y 4b). Cada reacción de PCR se realizó con una solución total de 25 μ l aproximadamente conteniendo 1 \times PCR Buffer (-Mg), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 0.2 μ M de cada cebador, 0.1 U/ μ l de Platinum[®]Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1 μ l de ADN para amplificar *COII* y 3 μ l de ADN para amplificar *Hb*. Los productos de la PCR se verificaron mediante electroforesis horizontal con gel de agarosa al 1%, y se tiñeron con SYBER[®] Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA) para ser visualizados en un sistema de imagen molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+ (Bio Rad, Hercules, CA). Posteriormente los productos fueron purificados con ExoSAP-IT (Affymetrix, Cleveland, OH) y fueron enviados al laboratorio comercial Macrogen Inc. (Seoul, Corea) para su secuenciamiento en ambas direcciones. Macrogen utiliza el secuenciamiento normal automático en productos de PCR como templado, con los mismos cebadores utilizados para las reacciones de PCR.

Las secuencias de las otras especies incluidas en el presente trabajo se obtuvieron del GenBank (Tabla 5).

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

4.3.1. Ensamble, edición, alineamiento y modelos evolutivos

Para determinar la identidad de las secuencias se utilizó la herramienta de alineamiento de secuencias nucleotídicas Blast del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas, editadas y alineadas con el programa Geneious Pro v.10.0.2 (Drummond *et al.* 2016), mediante los parámetros predeterminados del complemento MAFFT (Kato & Standley, 2013). Finalmente las secuencias se importaron a Mesquite v3.04 (Maddison & Maddison, 2015) para editar manualmente errores de alineación. Las secuencias de ambos genes fueron traducidas a amino ácidos para la confirmación del alineamiento. Se obtuvo la mejor estrategia de partición para el set de datos de nucleótidos y el mejor modelo de sustitución para cada partición mediante el programa PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear *et al.* 2012), utilizando como criterio de optimalidad al Criterio de Información Bayesiano (BIC). Se realizaron análisis por separado para las siguientes estrategias de partición (1) primera, segunda y tercera posición de los codones de *COII*, (2) primera, segunda y tercera posición de los codones de *Hb*.

4.3.2. Análisis Filogenéticos

Se estimaron árboles filogenéticos por cada gen y en conjunto para determinar las relaciones de las especies dentro del grupo. Las filogenias fueron inferidas bajo los criterios de máxima verosimilitud (MV) con el programa Garli v.2.0 (Zwickl, 2006) y mediante inferencias bayesianas con el programa MrBayes v.3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012).

La mejor estrategia de partición y los modelos de sustitución fueron los seleccionados en PartitionFinder v1.1.1. Los análisis se realizaron individualmente para las secuencias del gen mitocondrial y del gen nuclear y para los dos genes combinados.

En el análisis de MV, se corrieron 10 réplicas independientes de la búsqueda del mejor árbol a partir de árboles aleatorios (*random*) y 10 réplicas independientes de la búsqueda a partir de árboles paso a paso (*stepwise*). Para evaluar el soporte de cada nodo se realizó un bootstrap no paramétrico con 200 pseudo-réplicas; todos los análisis se realizaron mediante los parámetros predeterminados del programa Garli v2.0 (Zwickl, 2006). El árbol consenso se generó a partir de los árboles de bootstrap con la regla mayoritaria del 50% (clados presentes en más del 50% de los árboles de bootstrap) en Mesquite v3.04 (Maddison & Maddison, 2015).

Para los análisis bayesianos se realizaron cuatro corridas independientes, cada una con 4 cadenas del algoritmo Markov Monte-Carlo (MCMC) por 2×10^7 generaciones, muestreadas cada 1000 generaciones. Para verificar la convergencia y el tamaño efectivo de muestra (ESS ≥ 200) se utilizó el programa Tracer v1.4 (Rambaut and Drummond, 2007). Se descartó o quemó (*burn-in*) al 50% de los árboles; el resto de árboles fueron combinados para obtener los valores de probabilidades posteriores de los nodos y para obtener un árbol consenso mediante la regla mayoritaria del 50%. Finalmente se obtuvo un árbol de máxima credibilidad de los clados (MCC), combinando los cuatro análisis independientes con el programa LogCombiner v1.8.0 disponible con el programa BEAST v1.8.0 (Drummond *et al.* 2012). Los datos combinados se corrieron en el programa TreeAnnotator v1.8.0, también disponible con BEAST v1.8.0 (Drummond *et al.* 2012), y se descartó (*burn-in*) el 50% de los árboles de cada corrida.

Se utilizó como grupo externo al género *Scaptodrosophila*, de origen africano, según se ha determinado en otros estudios (Kwiatowski & Ayala, 1999; Tatarenkov *et al.* 2001; Remse & O'Grady, 2002; Robe *et al.* 2005; Mota *et al.* 2008). Todos los árboles fueron editados en Fig Tree v1.4.3 (Rambaut & Drummond, 2007) y en Adobe Illustrator CC.

5. RESULTADOS

5.1. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO

De los cinco genes que se intentaron amplificar, sólo se consiguió obtener secuencias de dos de ellos. Estos fueron el gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad II (*COII*) y el gen nuclear Hunchback (*Hb*). Los fragmentos obtenidos fueron mayores a 700 pb para ambos genes (Figuras 1a, 1b, 1c y 1d).

Se obtuvieron 14 secuencias consensus del gen *COII* de aproximadamente 700 pares de bases y 14 secuencias consensus del gen *Hb* de 407 pares de bases.

Los modelos evolutivos que se obtuvieron con el programa PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear *et al.* 2012) para cada una de las particiones, y que se utilizaron para los análisis filogenéticos se detallan en la Tabla 6.

5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las topologías de los mejores árboles obtenidos con los análisis de MV y las topologías de los árboles obtenidos mediante métodos bayesianos fueron ligeramente diferentes, sin embargo los linajes donde se encuentran las especies de interés se ubican de forma similar en ambas topologías, por lo que sólo se presentan los mejores árboles obtenidos con MV con valores de bootstrap sobre la rama y de probabilidades posteriores bajo la rama.

El mejor árbol para *COII* se encontró mediante la búsqueda de árboles paso a paso con valores similares a la búsqueda del mejor árbol aleatorio (valores de verosimilitud $\log = -11953.2140$) (Figura 2). Para *Hb*, el mejor árbol también se encontró mediante la búsqueda de árboles paso a paso con valores similares a la búsqueda del mejor árbol aleatorio (valor de verosimilitud $\log =$

-3700.0602) (Figura 3). El mejor árbol concatenado de ambos genes se obtuvo mediante la búsqueda aleatoria con un valor de verosimilitud log menor (-16130.9238) que el valor de verosimilitud log del mejor árbol encontrado mediante la búsqueda paso por paso (-16131.3499) (Figura 4). Por último se presenta un árbol de máxima credibilidad de los clados (MCC) para ambos genes concatenados (Figura 5).

En general se observa que el género *Drosophila* es un grupo parafilético, con poca resolución y bajos valores de bootstrap y probabilidades posteriores en todos los árboles.

Los grupos pertenecientes a la radiación *virilis-repleta* no conforman un clado, mientras que los de la radiación *immigrans-tripunctata* sí. Las divergencias más recientes presentan valores más altos en todos los grupos.

El grupo *mesophragmatica* es un grupo monofilético con valores de bootstrap y de probabilidades posteriores altos en el árbol de *COII* (74 bootstrap, 0.99 pp) y en el concatenado (81 bootstrap, 1 pp). Para el árbol con *Hb* solo se obtuvieron valores altos de probabilidades posteriores con el análisis bayesiano (0.98 pp); en el árbol MCC se obtuvo un valor de pp=1 para este clado. *D. chorlavi* está ubicada dentro del grupo *mesophragmatica*; las relaciones de esta especie con las especies dentro del grupo no están claras aunque se observa que *D. chorlavi* es una especie hermana de *D. viracochi* en casi todos los árboles con bajo soporte (0.51-0.71 pp)

Las especies *D. amaguana*, *D. neoamaguana* y *D. cashapamaba* no son parte del grupo *D. mesophragmatica* y se agrupan en el clado (A) con valores de probabilidades posteriores altos en todos los árboles (0.82 - 0.99 pp) pero con valores de bootstrap <50. Las relaciones del clado A con el resto de clados no son claras, así como las relaciones de las tres especies dentro del clado, ya que obtuvimos valores de bootstrap y probabilidades posteriores bajos.

D. rucux y *D. paschoensis* se agrupan en el clado B con *D. papallacta* en todos los árboles menos el realizado con *COII*, pero con valores de bootstrap y probabilidades posteriores bajos. Claramente ninguna de las tres especies pertenece al grupo *D. mesophragmatica*, pero se observa una clara relación de *D. rucux* y *D. paschoensis* en todos los árboles (bootstrap entre 56 y 87; 0.98 - 0.99 pp) por lo que podrían considerarse especies hermanas. Además se obtuvo valores de pp intermedios (0.65 - 0.75 pp) entre el clado formado por *D. rucux* y *D. paschoensis* y *D. incompta*. *D. incompta* es una especie del grupo *flavopilosa* que también se encuentra dentro del clado B junto con *D. cestri*, *D. annulimana* y *D. yanayuyu* para el árbol realizado con *COII*.

D. yanayuyu no pertenece al grupo *D. mesophragmatica* ni a ninguno de los clados obtenidos con este estudio, únicamente se ubica dentro del clado B con los árboles del gen *COII* pero con bajos valores de probabilidades posteriores y bootstrap. La ubicación de esta especie dentro de la filogenia es indeterminada ya que los valores que se obtuvieron fueron bajos en todos los árboles.

D. ecuatoriana se encuentra dentro de la radiación *immigrans-tripunctata*, relacionada con las especies del grupo *guarani*, subgrupo *guaramunu* (*D. griseolineata* y *D. maculifrons*) y especies del grupo *tripunctata* (*D. paramediostriata*, *D. mediodiffusa* y *D. mediopictoides*) en todos los árboles, menos en el de *COII*, con valores de probabilidades posteriores altos (0.94 - 0.99 pp).

6. DISCUSIÓN

6.1. FILOGENIAS DE *COII* Y *Hb*

En este trabajo se analizaron las secuencias de dos genes, el gen mitocondrial *COII* y el gen nuclear *Hb* con el objetivo de inferir las relaciones evolutivas de las especies ecuatorianas del grupo *mesophragmatica*. Estos genes han sido analizados en otros estudios (Yotoko *et al.* 2003, Mota *et al.* 2008; Hatadani *et al.* 2009; Robe *et al.* 2010b; Lang *et al.* 2014) probando que son informativos. Los filogramas obtenidos con los genes individuales son ligeramente diferentes entre sí, principalmente en las relaciones de *D. papallacta* y *D. yanayuyu* dentro de los clados A y B. Sin embargo, los valores de las relaciones de estas dos especies en ambos árboles son bajos. En trabajos anteriores se ha reportado conflicto entre los set de datos de genes mitocondriales y nucleares (Robe *et al.* 2005; Brisson *et al.* 2006), específicamente entre el gen mitocondrial *COII* y el gen nuclear *Hb* (Cenzi De Ré *et al.* 2010; Robe *et al.* 2010b) donde en el análisis de homogeneidad de las particiones (PHT por sus siglas en inglés) se obtuvieron valores de $p < 0.001$ entre las secuencias de estos dos genes. Sin embargo, se decidió obtener el filograma y los valores de bootstrap y probabilidades posteriores de los dos genes concatenados para determinar las relaciones de las especies ecuatorianas del género *Drosophila*, ya que en otros estudios se ha concluido que se pueden obtener datos interesantes al analizar secuencias simultáneamente, aunque estas sean heterogéneas entre sí (Remsen & DeSalle, 1998; Remsen & O'Grady, 2002; Robe *et al.* 2005; Mota *et al.* 2008; Robe *et al.* 2010b)

El filograma obtenido con el gen nuclear *Hb* es diferente a aquellos obtenidos con este gen en otros estudios (Mota *et al.* 2008; Robe *et al.* 2010b), esto debido principalmente a la dificultad de alinear el gen. En el estudio de Mota y colaboradores (2008) de las 820 pb secuenciadas,

logran alinear y utilizar en su estudio a 687 pb, mientras que Robe y colaboradores (2010) logran alinear 556. En el presente estudio únicamente se logró alinear 407 pb, por lo que esta información faltante podría provocar ligeros cambios en las topologías y la estadística de los árboles. En cuanto al filograma obtenido con *COII*, concuerda con aquellos obtenidos en otros estudios con este gen (Mota *et al.* 2008; Robe *et al.* 2010b) donde se utilizaron secuencias de 672 pb aproximadamente, algo similar al tamaño de las secuencias de este estudio (~700 pb).

6.2. RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *DROSOPHILA*

Los resultados obtenidos confirman que el género *Drosophila* es un grupo parafilético en relación a otros géneros de la familia Drosophilidae, como ha sido demostrado en otros estudios (Kwiatowski & Ayala, 1999; Da Lage *et al.* 2007; van der Linde & Houle, 2008; Robe *et al.* 2010a), donde los géneros *Hirtodrosophila*, *Liodrosophila*, *Samoaia*, *Scaptomyza* y *Zaprionus* se encuentran dentro del clado del género *Drosophila*. Esto también ocurre a nivel de subgénero, con los subgéneros *Sophophora* y *Dorsilopa* pero con bajo soporte en todas las ramas basales, en discordancia con otros estudios, donde se ha comprobado que ambos subgéneros aparecen como clados basales en relación a las especies del subgénero *Drosophila* (Russo *et al.* 1995; Kwiatowski *et al.* 1997; Remsen & DeSalle, 1998; Kwiatowski & Ayala 1999; Tatarenkov *et al.* 1999, 2001; Remsen & O'Grady, 2002; Robe *et al.* 2005; Da Lage *et al.* 2007; O'Grady & DeSalle, 2008, van der Linde & Houle, 2008; Robe *et al.* 2010a).

En nuestros resultados se obtuvieron bajos valores de bootstrap y de probabilidades posteriores en general, principalmente en las ramas basales. Únicamente en el filograma del gen *Hb* se obtienen valores significativos para la radiación *immigrans-tripunctata* demostrando que es un grupo monofilético. Esto ya ha sido demostrado con otros estudios como el de van der Linde y

colaboradores (2010) utilizando super matrices de datos, donde también se comprueba la monofilía de la radiación *virilis-repleta*, algo que no fue posible con nuestros datos. Sin embargo, tanto en el estudio de van der Linde, cómo en este y otros (Kwiatowski & Ayala 1999; Tatarenkov *et al.* 1999; Robe *et al.* 2005; Da Lage *et al.* 2007) no se pueden determinar las relaciones de ambas radiaciones, esto a pesar de usar para las filogenias set de datos grandes (ie. promedio de 4333 pb) lo que indica que no siempre utilizar más genes (de 5 a 13 genes) es la solución para resolver los problemas de las relaciones evolutivas del género *Drosophila*.

Dentro de la radiación *immigrans-tripunctata* se encuentran las especies de los grupos *tripunctata* y *guarani*, grupos que, aunque no están detallados en los filogramas, aparecen como parafiléticos en nuestro estudio. Esto es evidente, por ejemplo, con *D. ecuatoriana* como parte de un clado donde se encuentran especies de ambos grupos. *D. ecuatoriana* actualmente se encuentra descrita como una especie del grupo *guarani* (Vela & Rafael, 2004). La parafilia de estos grupos ha sido ampliamente comprobada por otros estudios (Frota-Pessoa, 1954; Throckmorton, 1975; Carrasco *et al.* 2003; Yotoko *et al.* 2003; Robe *et al.* 2005; Da Lage *et al.* 2007; Hatadani *et al.* 2009; van der Linde & Houle, 2008; van der Linde *et al.* 2010; Robe *et al.* 2010b), por lo que ya no se deberían distinguir como grupos. Según el estudio de Robe y colaboradores (2010), *D. ecuatoriana* se encontraría dentro del linaje *mediostriata*.

Los linajes pertenecientes a la radiación *virilis-repleta* presentan baja resolución y bajo soporte entre sí, además encontramos que el grupo *repleta* no es un grupo monofilético, esto concuerda con estudios anteriores (Durando *et al.* 2000 que utiliza cuatro genes y Moran & Fontdevila, 2005 que utilizan un gen de más de 2000pb) pero se contradice con los resultados obtenidos por Oliveira y colaboradores en el 2012 donde comprueban por primera vez, que *repleta* es un grupo monofilético. La causa de esta discordancia puede ser que en nuestro estudio no se

incluyen a todas las especies del grupo y a la cantidad de genes utilizados (Oliveira utiliza cuatro marcadores mitocondriales y seis nucleares). Cabe recalcar que en el 2012 aún no se encontraban disponibles las secuencias para las especies ecuatorianas del subgrupo *inca* (*D. inca*, *D. huancavilcae* y *D. yangana*) pertenecientes al grupo *repleta*, por lo que en el estudio de Oliveira no se incluyen. En este estudio si se analizaron a estas especies y se observa que las especies del subgrupo *inca* no pertenecen al grupo *repleta*, sin embargo a nivel taxonómico tienen características morfológicas típicas del grupo *repleta*, como es el tórax atigrado. Además son especies cactófilas como las especies del grupo *repleta* y existen estudios a nivel citológico que las ubican como de este grupo (Mafla, 2005, 2008; Betancourt, 2010) por lo tanto se deben realizar más estudios para resolver las relaciones de este subgrupo con el resto del grupo *repleta*. Existe una fuerte evidencia que indica al grupo *repleta* como el grupo hermano de *mesophragmatica* (Tatarenkov & Ayala, 2001; Remsen & O'Grady 2002; Robe *et al.* 2005), esto no está del todo claro con nuestro estudio debido a que los clados A y B forman una politomía con el grupo *mesophragmatica*. Las especies que forman los clados A y B nunca han sido analizadas filogenéticamente, estos “nuevos clados” podrían cambiar las relaciones antes establecidas de los grupos *repleta* y *mesophragmatica*.

6.2.1. Grupo *mesophragmatica*

En cuanto al grupo *mesophragmatica*, se observa que es monofilético, en coherencia con lo determinado por Mota y colaboradores en el 2008. Con los resultados obtenidos en nuestro trabajo se reafirma lo propuesto por Brncic y Koref Santibañez (1957), Brncic *et al.* (1971), Nair *et al.* (1971) y Mota *et al.* (2008) donde se subdivide al grupo en tres subgrupos: subgrupo *gaucha*, con las especies *D. gaucha* y *D. pavani*; subgrupo *viracochi* con *D. viracochi* y

subgrupo *mesophragmatica*, con al menos *D. mesophragmatica*, *D. brncici*, y *D. gasici*. Aunque las relaciones de *D. chorlavi* con las especies dentro del grupo tienen baja resolución, nuestros resultados sugieren que *D. chorlavi* podría ser una especie hermana de *D. viracochi*, ya que presentan valores intermedios de probabilidades posteriores en casi todos los árboles. Morfológicamente, *D. viracochi* y *D. chorlavi* presentan cerdas escutelares convergentes; la dirección de las cerdas escutelares fue determinante cuando en 1957 Brncic y Koref Santibañez propusieron una clave para el grupo *mesophragmatica*. Este carácter morfológico ha sido ampliamente utilizado por los taxónomos y sistemáticos para entender la biología de los dípteros en general. Las bases genéticas del desarrollo de las cerdas en *Drosophila* están bien comprendidas por lo que se considera un carácter importante al momento de describir especies y separar grupos de dípteros (DeSalle, 2005). Sin embargo, *D. chorlavi* presenta el tórax atigrado (Céspedes & Rafael, 2012a), esta característica morfológica la diferencia de las demás especies del grupo *mesophragmatica*. Este carácter también se observa en algunas especies del grupo *repleta* pero relacionar este carácter con la filogenia no fue posible, ya que las relaciones de *repleta* y *mesophragmatica* no están claras. La pigmentación y producción de melanina en *Drosophila* son caracteres bien estudiados que presentan una base genética simple (DeSalle, 2005) y al igual que las cerdas, se emplean para la diferenciación de especies y de grupos. Por otro lado, al contrario de lo propuesto por Mota *et al.* (2008), donde *D. viracochi* (subgrupo *viracochi*) es el taxón hermano del resto de especies del grupo *mesophragmatica*, ocupando una posición basal, se observa que *D. chorlavi* y *D. viracochi* serían el taxón hermano de *D. mesophragmatica*, *D. gasici* y *D. brncici*; mientras que el clado formado por *D. pavani* y *D. gaucha* ocuparían una posición más ancestral dentro del grupo. Cabe recalcar que los análisis realizados por Mota *et al.* (2008) no presentan soporte suficiente para concluir la posición basal

de *D. viracochi* dentro del grupo *D. mesophragmatica*. Análisis donde se incluyan más marcadores, tanto mitocondriales como nucleares, podrían ayudar a determinar con mejor resolución las relaciones de las especies dentro del grupo. Existen dos especies ecuatorianas descritas como parte del grupo que no pudieron ser colectadas y por lo tanto no se incluyeron en los análisis, estas son *D. ruminahuii* y *D. shyri*. Queda pendiente resolver las relaciones de estas dos especies como miembros del grupo *mesophragmatica*, así como *D. altiplánica*, *D. camaronensis*, *D. canescens* y *D. orkui*, también pertenecientes a este grupo neotropical-andino.

6.2.2. Clados A y B

El clado A conformado por *D. amaguana*, *D. neoamaguana* y *D. cashapamba* presenta caracteres morfológicos a nivel de la genitalia que apoyan su agrupación filogenética. Por ejemplo el surestilo de los machos tiene dientes secundarios, mientras que las hembras presentan espermatecas transparentes y pequeñas en las tres especies (Figura 6), estos caracteres no se encuentran presentes en ninguna de las especies del grupo *mesophragmatica*, por lo que podrían ser utilizados para la identificación y descripción de nuevas especies. Las especies de este grupo viven entre los 1000 y 3400 m de altitud desde los bosques amazónicos hasta los bosques andinos. *D. cashapamba* presenta los rangos de distribución más bajos y se ha encontrado en simpatría con *D. neoamaguana* (Cordillera de los Guacamayos); mientras que *D. amaguana* se distribuye a mayor altitud (Céspedes & Rafael, 2012a; Ramos, 2015). Esto es consistente con la filogenia obtenida, donde *D. cashapamba* y *D. neoamaguana* están más relacionadas que *D. amaguana*.

D. paschoensis es una especie perteneciente al grupo *tripunctata* (Vela & Rafael, 2001), sin embargo, con este análisis queda claro que no pertenece a ese grupo; ni siquiera se encuentra dentro de la radiación donde se ubican las especies del grupo *tripunctata*. En el presente trabajo *D. paschoensis* forma el clado B junto a *D. rucux*, *D. papallacta* y a dos especies del grupo *flavopilosa* (*D. incompta* y *D. cestri*). Las relaciones de *D. rucux* y *D. paschoensis* son fuertes con valores de probabilidades posteriores altos y de bootstrap intermedios, ninguna de las especies pertenece al grupo *mesophragmatica*, grupo en donde se ubicó a *D. rucux* originalmente (Céspedes y Rafael 2010a). El grupo *flavopilosa* es un grupo restringido de especies monófagas asociadas a flores del género *Cestrum* (Solanaceae) y morfológicamente, tanto la genitalia del macho como de la hembra, tiene características particulares que las diferencian de otros grupos (Wheeler *et al.* 1962). En estudios anteriores, donde se analizan cuatro de las 17 especies descritas, se observa que este es un grupo monofilético (Robe *et al.* 2013), contrario a lo que se observa en este trabajo. Sin embargo los valores bajos de probabilidades posteriores y las características morfológicas particulares del grupo *flavopilosa*, que no se observan en ninguna de las tres especies ecuatorianas del clado B, hacen pensar que la ubicación filogenética de estas junto a especies del grupo *flavopilosa* es inexacta. Es necesario realizar análisis con más marcadores tanto nucleares como mitocondriales, así como con más especies de los grupos dentro de la radiación *virilis-repleta* para poder determinar las relaciones evolutivas de *D. papallacta*, *D. rucux* y *D. paschoensis*. Por el momento sólo podemos concluir que *D. papallacta*, *D. rucux* y *D. paschoensis* forman un clado y que pertenecen a la radiación *virilis-repleta* ya que no se encuentran dentro del clado de la radiación *immigrans-tripunctata*. Además, que *D. rucux* y *D. paschoensis* son especies hermanas, aunque no existe evidencia morfológica para tal.

Por último, *D. yanayuyu* aparece dentro del clado B para la filogenia de *COII*, mientras que con la filogenia de *Hb* aparece como un clado hermano de la radiación *immigrans-tripunctata*. Es decir que los filogramas obtenidos individualmente, no concuerdan en la ubicación de esta especie, además en ambas reconstrucciones los valores de probabilidades posteriores y bootstrap son bajos, por lo que no podemos concluir nada acerca de las relaciones filogenéticas de esta especie. Como en el caso de las especies del clado B, análisis más completos serán necesarios para inferir acerca de las relaciones evolutivas de *D. yanayuyu*.

6.3. DIVERSIDAD Y TAXONOMIA DE DROSOPHILA

La diversidad del género *Drosophila* en los neotrópicos es abundante (Val et al. 1981) con numerosas especies por describirse. Esto se debe principalmente a que es un insecto con alta distribución (se encuentra en todos los rincones del planeta), alta capacidad de adaptación y que ocupa una gran variedad de nichos (flores, hongos, material en descomposición, frutos) (Remse & O'Grady, 2002). Es casi imposible determinar cuántas especies de drosófilas hay o quedan por descubrir en Ecuador, aún más imposible en el mundo. Sin embargo, un trabajo realizado por de Medeiros y Klaczko (2004) en São Paulo-Brasil intenta estimar cuantas especies quedan por describir en esta región y concluyen que sus datos subestiman las especies desconocidas, debido principalmente a que existen muchas especies de *Drosophila* que no son atraídas por los cebos de banana que comúnmente utilizamos, por lo que grupos taxonómicos como los de flores son poco conocidos. Con este trabajo ocurre algo similar pero a nivel de grupos de especies, porque demuestra que posiblemente dentro de la radiación *virilis-repleta* haya más linajes y por ende más diversidad filogenética en general. Se observa que las especies de *Drosophila* andinas analizadas no son parte de un solo linaje como se pensaba, sino que al menos forman tres

linajes. Esto implica que con la desaparición de los ecosistemas andinos, no sólo se pondría en peligro la desaparición de un linaje de especies de *Drosophila*, sino varios linajes con historias evolutivas y nichos diferentes.

Cabe recalcar que todas las especies que se analizaron en el estudio son claramente linajes independientes, salvo en el caso de *D. brncici* y *D. gasici* donde las filogenias de este y otros trabajos muestran que podrían ser la misma especie (Mota *et al.* 2008). La diversidad crípica en la morfología externa del género *Drosophila* es común (i.e. Brncic & Koref Santibañez, 1957) e incluso existen grupos de especies como *cardini* donde existen polimorfismos (Brisson *et al.* 2006), sin embargo un carácter morfológico que nos ayuda y es casi irrefutable a la hora de distinguir especies es la genitalia del macho. Este carácter de la morfología interna de *Drosophila*, especialmente el falo, es el más importante y el más utilizado por taxónomos para identificar, describir y sinonimizar especies (Vilela & Bächli, 1990). Sin embargo al utilizar la genitalia y otros caracteres morfológicos para agrupar a las especies en grupos, nos hemos encontrado con dificultades. Los términos grupo y subgrupo no han sido reconocidos oficialmente por los taxónomos, sin embargo los drosofilistas los hemos usado por más de 50 años (Hsu, 1949; Ashburner *et al.* 2005), esto ha creado conflictos al momento de relacionar la taxonomía tradicional con las filogenias de las especies de *Drosophila*, además ha provocado que los estudios filogenéticos se realicen en base a estas clasificaciones no convencionales, por lo que se utilizan sets de especies relativamente pequeños y con pocos grupos externos. Este problema ya ha sido discutido por van der Linde en sus trabajos (van der Linde & Houle, 2008; van der Linde *et al.* 2010) sin embargo continúan publicándose trabajos en los que se realizan filogenias de grupos de especies con pocos grupos externos (i.e. Cenzi De Ré *et al.* 2010; Robe *et al.* 2013). Seguir utilizando términos de nomenclatura no convencionales y describiendo

especies únicamente basándonos es su morfología, provoca que la investigación a varios niveles (evolutivo, ecológico, molecular) pueda ser errada por el hecho de escoger un grupo de especies “artificial” formado por especies al azar.

6.4. RECOMENDACIONES

El presente estudio presenta la filogenia de algunas de las especies ecuatorianas de *Drosophila*, por lo que la primera recomendación es utilizar más especies en lo futuros análisis. Entre ellas especies de los géneros que se encuentran dentro de *Drosophila* como el género *Hirtodrosophila*, ya que al ser supuestamente otro género, son especies que no se incluyen en las filogenias; además incluir especies de grupos taxonómicos menos conocidos como los grupos de flores (*bromeliae*, *flavopilosa* y *onychophora*). Debido a que el género *Drosophila* es tan diverso, hemos observado que presenta retos en cuanto a relacionar la clasificación taxonómica con la filogenia, se recomienda realizar análisis de las dos grandes radiaciones por separado (*virilis-repleta* e *immigrans-tripunctata*) ya que estas son agrupaciones grandes, lo que podría facilitar el trabajo que aún nos queda por delante. En futuros análisis se debe utilizar siempre más de un grupo externo e incluir todas las especies de las que se hayan obtenido secuencias, ya que al restringir los análisis a especies que nosotros consideramos de un grupo en particular podemos estar perdiendo información.

Como se observa en nuestro estudio, los valores de bootstrap y probabilidades posteriores son bajos, por lo que la segunda recomendación es utilizar más genes. En cuanto a lo observado en otros estudios, se recomienda no utilizar únicamente genes nucleares en las filogenias, debido a que la información que nos proporcionan es diferente a la de los genes mitocondriales. Las filogenias con sets de genes tanto nucleares y mitocondriales nos dan resultados más fidedignos

sobre la evolución de los organismos ya que los genes mitocondriales como *COI* y *NADH* presentan tasas de mutaciones mayores que proporcionan más información sobre las relaciones evolutivas de las especies. Los genes o marcadores utilizados en las filogenias del género *Drosophila* son muy variables, dependiendo del grupo de especies o el autor (ver van der Linde & Houle, 2008), por lo que estandarizar los sets de genes que se van a analizar en futuros estudios proporcionaría información más accesible para otros autores.

Por último, se recomienda utilizar la nomenclatura convencional y no utilizar la no convencional sin antes haber determinado las relaciones evolutivas de las especies en descripción dentro del género *Drosophila*, esto para evitar confusiones y rectificaciones. Además se recomienda que las descripciones de especies no se basen únicamente en la morfología de la especie, sino que se utilicen otras herramientas como son los análisis citológicos, morfométricos y moleculares.

7. LITERATURA CITADA

- Acurio, A. 2015. Chapter 2: Evidence of a South American origin for the *Drosophila repleta* lineage. In: Coevolutionary analysis of the transposon Galileo in the genus *Drosophila*. Tesis de Doctorado en Genética. Facultat de Biociències. Barcelona-**España**.
- Acurio, A.; Rafael, V.; Céspedes, D, y Ruiz, A. 2013. Description of a New Spotted-Thorax *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) Species and its Evolutionary Relationships Inferred by a Cladistic Analysis of Morphological Traits. *Annals of the Entomological Society of America* 106(6): 695–705.
- Ashburner, M., Golic, K.G., Hawley, R.S., 2005. *Drosophila: A Laboratory Handbook*, Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Betancourt, K. 2010. Cromosomas politénicos de *Drosophila yangana* (grupo *repleta*, subgrupo *inca*, Díptera, Drosophilidae). Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. PUCE. Quito-Ecuador.
- Brake, I. & Bächli, G. 2008. World catalogue of insects. Volume 9. Drosophilidae (Diptera). Apollo Books. Stenstrup, Denmark.
- Brisson, J.A.; Wilder, J. & Hollocher, H. 2006. Phylogenetic analysis of the *cardini* group of *Drosophila* with respect to changes in pigmentation. *Evolution*, 60(6), 1228-1241.
- Brcic, D. & Koref-Santibañez, S. 1957. The mesophragmatica group of species of *Drosophila*. *Evolution* 11: 300–310.
- Brcic, D.; Nair, P.S. & Wheeler, M.R. 1971. I. Cytotaxonomic Relationships Within the *mesophragmatica* Species Group of *Drosophila*. *Studies in Genetics* VI, 1–16.

- Cabezas, M.B. & Rafael, V. 2013. Una nueva especie del grupo *Drosophila annulimana* (Diptera, Drosophilidae) y un nuevo registro en las Provincias de Pichincha y Napo, Ecuador. *Iheringia, Série Zoologia* 103(4):357-360.
- Cabezas, M.B. & Rafael, V. 2015. Redescrición de *Drosophila ogradi* y descripcón de una especie nueva del grupo *Drosophila morelia* (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre*, 105(2):157-163.
- Cabezas, M.B.; Llangarí, L. M. & Rafael, V. 2015. Descripcón de cuatro especies nuevas del subgrupo *Drosophila fasciola*, grupo *repleta* (Diptera, Drosophilidae) en dos bosques nublados del Ecuador. *Iheringia, Série Zoologia* 105(4):383-392.
- Carrasco, S.F.; Prado, L.T. & Godoy-Herrera, R. 2003. Molecular phylogeny of the *mesophragmatica* species group inferred from cytochrome oxidase II sequence. *Drosophila Information Service* 86: 72-75.
- Cavasini, R. 2009. Aspectos Ecológicos e Genéticos no Gênero *Drosophila* Relacionados à Fragmentação da Floresta de Araucária. Tesis de Maestría en Biología Evolutiva. Universidade Estadual do Centro-Oeste en asociacón con Universidade Estadual de Ponta Grossa. Guarapuava-Brasil.
- Cenzi De Ré, F.; Loreto, E. L. & Robe, L. J. 2010. Gene and species trees reveal mitochondrial and nuclear discordance in the *Drosophila cardini* group (Diptera: Drosophilidae). *Invertebrate biology* 129(4), 353-367.
- Céspedes, D. & Rafael, V. 2012a. Cuatro especies nuevas del grupo *Drosophila mesophragmatica* (Diptera, Drosophilidae) de los Andes ecuatorianos. *Iheringia, Série Zoologica* 102(1): 71–79.
- Céspedes, D. & Rafael, V. 2012b. Descripcón de una nueva especie del grupo *Drosophila*

- tripunctata* (Diptera: Drosophilidae) en Cruz Loma, Pichincha, Ecuador. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 33(1 y 2): 124-128.
- Dajoz, R. 2000. Entomología Forestal: Los insectos y el bosque. Papel y diversidad de los insectos en el medio forestal. Mundi-Prensa Libros. Madrid. pp: 560.
- Da Lage, J.L.; Kergoat, G.J.; Maczkowiak, F.; Silvain, J.F.; Cariou, M.L. & Lachaise, D. 2007. A phylogeny of Drosophilidae using the Amyrel gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 45: 47–63. doi:10.1111/j.1439-0469.2006.00389.x
- De Medeiros, H.F. & Klaczko, L.B. 2004. How Many Species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) remain to be described in the forest of São Paulo, Brazil? Species List of Three Forest Remnants. Biota Neotropica 4(1): 1–12.
- DeSalle, R. 2005. Evolutionary Developmental Biology of the Diptera: The “Model Clade” Approach. In: Yeates, D.K. & Wiegmann, B.M. (Ed.) The Evolutionary Biology of Flies. Columbia University Press. United States of America-New York.
- Durando, C.M.; Baker, R.H.; Etges, W.J.; Heed, W.B.; Wasserman, M. & DeSalle, R. 2000. Phylogenetic analysis of the *repleta* species group of the genus *Drosophila* using multiple sources of characters. Molecular Phylogenetics and Evolution 16: 296–307.
- Drummond, A.J.; Ashton, B.; Buxton, S.; Cheung, M.; Cooper, A.; Heled, J.; Kearse, M.; Moir, R.; Stones-Havas, S.; Sturrock, S.; Thierer, T. & Wilson, A. 2016. Geneious v10.0.2
- Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution 29: 1969-1973.
- Etterson, J.R. & Shaw, R.G. 2001. Constraint to adaptive evolution in response to global warming. Science 294: 151–154.

- Faith, D.P. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61, 1–10.
- Figüero, M.L.; León, R. & Rafael, V. 2014. El género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae), asociado a flores de *Verbesina sodiroi* Hieron. y *Pappobolus imbaburensis* (Hieron.) Panero (Asteraceae) en Pichincha, Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 35: 83–92.
- Figüero, M.L. & Rafael, V. 2011. Dos nuevas especies del grupo *Drosophila onychophora* (Diptera, Drosophilidae) en los bosques de Polylepis de Papallacta, Pichincha, Ecuador. *Iheringia, Série Zoologia* 101(4):342-349.
- Figüero, M.L.; León, R.; Rafael, V. & Céspedes, D. 2012a. Cuatro nuevas especies del grupo *Drosophila onychophora* (Diptera, Drosophilidae) en el Parque Arqueológico Rumipamba, Pichincha, Ecuador. *Iheringia, Série Zoologia* 102(2):212-220.
- Figüero, M.L.; Rafael, V. & Céspedes, D. 2012b. Grupo *Drosophila asiri* (Diptera, Drosophilidae), un nuevo grupo de especies andinas con la descripción de dos nuevas especies y la redescrición de *Drosophila asiri*. *Iheringia, Série Zoologia* 102(1):33-42.
- Figüero, M.L. & Rafael, V. 2013. Descripción de tres especies nuevas del género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en el Ecuador. *Iheringia, Série Zoologica* 103(3): 246–254.
- Frota-Pessoa, O. 1954. Revision of the tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species (Drosophilidae, Diptera). *Arquivos do Museu Paranaense* 10(6): 253-330.
- Hatadani, L. M., McInerney, J. O., de Medeiros, H. F., Junqueira, A. C. M., de Azeredo-Espin,

- A.M., & Klaczko, L. B. 2009. Molecular phylogeny of the *Drosophila tripunctata* and closely related species groups (Diptera: Drosophilidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 51(3), 595-600.
- Hsu, T.C. 1949. The external genital apparatus of male Drosophilidae in relation to systematics. University of Texas Publication 4920: 80-142.
- Katoh, K. & Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.
- Kellermann, V.; van Heerwaarden, B.; Sgro, C.M. & Hoffmann, A.A. 2009. Fundamental evolutionary limits in ecological traits drive *Drosophila* species distributions. *Science* 325:1244–1246.
- Kellermann, V.; Overgaard, J.; Hoffmann, A.A.; Fløjgaard, C.; Svenning, J.C. & Svenning, J.C. 2012a. Upper thermal limits of *Drosophila* are linked to species distributions and strongly constrained phylogenetically. *PNAS* 109(40): 16228–16233.
- Kellermann, V.; Loeschcke, V.; Hoffmann, A.A.; Kristensen, T.N.; Fløjgaard, C.; David, J.R.; Svenning, J.C. & Overgaard, J. 2012b. Phylogenetic constraints in key functional traits behind species' climate niches: patterns of desiccation and cold resistance across 95 *Drosophila* species. *Evolution* 66(11): 3377-3389.
- Kellermann, V.; Overgaard, J.; Loeschcke, V.; Kristensen, T.N. & Hoffmann, A.A. 2013. Trait Associations across Evolutionary Time within a *Drosophila* Phylogeny: Correlated Selection or Genetic Constraint?. *PloS One* 8(8), e72072.
- Kwiatowski, J.; Krawczyk, M.; Jaworski, M.; Skarecky, D. & Ayala, F.J. 1997. Erratic

- evolution of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila*, *Chymomyza*, and *Ceratitis*. *Journal of Molecular Evolution* 44: 9–22.
- Kwiatowski, J. & Ayala, F.J. 1999. Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13(2): 319-328.
- Lanfear, R.; Calcott, B.; Ho, S.Y.W. & Guindon, S. 2012. Partition-Finder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695- 1701.
- Lang, M.; Richmond, M.P.; Acurio, A.E.; Markow, T.A. & Orgogozo, V. 2014. Radiation of the *Drosophila nanoptera* species group in Mexico. *Journal of Evolutionary Biology* doi: 10.1111/jeb.12325.
- Llangarí, L.M. 2012. Diversidad del género *Drosophila* (Diptera Drosophilidae), asociadas a flores de los géneros *Anthurium* y *Xanthosoma* (Araceae), en la Estación Científica Río Guajalito, Santo Domingo de los Tsachilas. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. PUCE. Quito-Ecuador.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. 2015. Mesquite: a modular system or evolutionary analysis. Version 3. 04. <http://mesquiteproject.org>.
- Mafla, A.B. 2005. Cariotipos Metafásicos de *Drosophila inca* y *Drosophila yangana*, subgrupo *inca*, grupo *repleta*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* XXVII (1 y 2): 21-25.
- Mafla, A.B. 2008. *Drosophila huancavilcae*: Ciclo biológico y cariotipo Metafásico. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* XIX (1 y 2): 35-39

- Morales-Hojas, R. & Vieira, J. 2012. Phylogenetic Patterns of Geographical and Ecological Diversification in the Subgenus *Drosophila*. Plos One 7(11): 1–15.
- Moran, T. & Fontdevila, A. 2005. Phylogeny and molecular evolution of the *Drosophila hydei* subgroup (*Drosophila repleta* group) inferred from the *Xanthine dehydrogenase* gene. Molecular Phylogenetics and Evolution 36: 695–705.
- Morán, T. & Fontdevila, A. 2007. On the phylogeny of the *Drosophila hydei* subgroup: New insights from combined analyses of nuclear and mitochondrial data. Molecular Phylogenetics and Evolution 43(3): 1198-1205.
- Mota, N.R.; Robe, L.J.; Valente, V.L.S.; Budnik, M. & Loreto E. L. S. 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* del grupo *mesophragmatica*. Revista Brasileira de Biologia 18, 243–249.
- Nair, P.S.; Brncic, D. & Kojima, K. 1971. II. Isozyme variations and evolutionary relationships in the *mesophragmatica* species group of *Drosophila*. Studies in Genetics VI: 17 – 28.
- O’Grady, P.M. & Kidwell, M.G. 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.
- O’Grady, P. & DeSalle, R. 2008. Out of Hawaii: the origin and biogeography of the genus *Scaptomyza* (Diptera: Drosophilidae). Biology Letters 4: 195 – 199.
- O’Grady, P.M.; Lapoint, R.T.; Bonacum, T.; Lasola, J.; Owen, E.; Wu, Y. & DeSalle, R. 2011. Phylogenetic and ecological relationships of the Hawaiian *Drosophila* inferred by mitochondrial DNA analysis. Molecular Phylogenetics and Evolution 58(2):244-256.

- Oliveira, D.C.S.G.; Almeida, F.C.; O'Grady, P.M.; Armella, M. A.; DeSalle, R. & Etges, W. J. 2012. Monophyly, divergence times, and evolution of host plant use inferred from a revised phylogeny of the *Drosophila repleta* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64:533–544.
- Perlam, S.J.; Spicer, G.S.; Shoemaker, D.D. & Jaenike, J. 2003. Associations between mycophagous *Drosophila* and their *Howardula* nematode parasites: a worldwide phylogenetic shuffle. *Molecular Ecology* 12 (1):237–249.
- Piñol, J.; Francino, O.; Fontdevila, A. & Cabré, O. 1988. Rapid isolation of *Drosophila* high molecular weight DNA to obtain genomic libraries. *Nucleic Acid Research* 16(6).
- Rafael, V. & Vela, D. 2003. *Drosophila yangana* sp. nov. un nuevo miembro del grupo *repleta*, subgrupo *inca* (Diptera: Drosophilidae). *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* 71: 129-139.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. 2007. Tracer. Version 14.2. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ramos, E. 2015. Diversidad del género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en tres pisos altitudinales en la Provincia de Napo, Ecuador. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. PUCE. Quito-Ecuador.
- 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.
- Remsen, J. & O'Grady, P. 2002. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24: 249–264.

- Robe, L.J.; da Silva L.B. & Loreto, E.L.S. 2002. Phylogenetic relationships among four species of the *guarani* group of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) as inferred by molecular and morphological analyses. *Revista Brasileira de Entomologia* 46(4): 515–519.
- Robe, L.J.; Valente, V.L.S.; Budnik, M. & Loreto, E.L.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.
- Robe, L.J.; Loreto, E.L.S. & Valente, V.L.S. 2010a. Radiation of the “*Drosophila*” subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 48(4): 310–321.
- Robe, L.J.; Valente, V.L.S. & Loreto, E.L.S. 2010b. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* “radiation” (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* 138:725–735.
- Robe, L.J.; Cenzi De Ré F.; Ludwig, A. & Loreto E.L.S. 2013. The *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera, Drosophilidae) An array of exciting questions. *Fly* 7(2): 59 – 69.
- Rodrigues, A.S.L. & Gaston, K.J. 2002. Maximising phylogenetic diversity in the selection of networks of conservation areas. *Biological Conservation* 105: 103–111.
- Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D.L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogentic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.

- Russo, C.A.; Takezaki, N. & Nei, M. 1995. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. *Molecular Biology and Evolution* 12(3): 391-404.
- Seetharam A.S. & Stuart G.W. 2013. Whole genome phylogeny for 21 *Drosophila* species using predicted 2b-RAD fragments. *PeerJ* 1:e226
- Silva-Bernardi, E.C.C.; Morales, A.C.; Sene, F.M. & Manfrin, M. H. 2006. Phylogenetic relationships in the *Drosophila fasciola* species subgroup (Diptera, Drosophilidae) inferred from partial sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene. *Genetics and Molecular Biology* 29(3): 566-571.
- Spicer, G.S. 1995. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. *J. Mol. Evol.* 41 (6), 749–759.
- Spicer, G.S. & Jaenike, J. 1996. Phylogenetic analysis of breeding site use and amanitin tolerance within the *Drosophila quinaria* species group. *Evolution* 50, 2328–2337.
- Tamayo, M.I. & Rafael, V. 2016. Two new species of the genus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae), in Yanacocha protected forest, Pichincha, Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 37(1): 11–18.
- Tatarenkov, A.; Sáez, A. G. & Ayala, F. J. 1999. A compact gene cluster in *Drosophila*: the unrelated *Cs* gene is compressed between duplicated *amd* and *Ddc*. *Gene* 231: 111–120.
- Tatarenkov, A. & Ayala, F. J. 2001. Phylogenetic relationships among species groups of the *virilis-repleta* radiation of *Drosophila*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21(2): 327–331.

- Tatarenkov, A.; Žurovcová, M. & Ayala, F. J. 2001. *Ddc* and *amd* Sequences Resolve Phylogenetic Relationships of *Drosophila*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20(2): 321–325.
- Throckmorton, L. H. 1975. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. *Handbook of genetics* 3: 421-469.
- Val, F.C.; Vilela, C.R. & Marques, M.D. 1981. *Drosophilidae* of the Neotropical region. *The genetics and biology of Drosophila* 3: 123-168.
- van der Linde, K. & Houle, D. 2008. A supertree analysis and literature review of the genus *Drosophila* and closely related genera (Diptera, Drosophilidae). *Insect Systematics & Evolution* 39(3): 241-267.
- van der Linde, K.; Houle, D.; Spicer, G.S. & Stepan, S.J. 2010. A supermatrix-based molecular phylogeny of the family Drosophilidae. *Genetics Research* 92: 25–38.
- Vázquez, D.P. & Gittleman, J.L. 1998. Biodiversity conservation: Does phylogeny matter?. *Current Biology* 8(11), R379-R381.
- Vela, D. & Rafael, V. 2001. Ocho nuevas especies del grupo *tripunctata*, genero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae), y el registro de *Drosophila paraguayensis* en el Bosque Protector Pasochoa, Pichincha– Ecuador. *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* 66: 92-120.
- Vela, D. & Rafael, V. 2004. Three new andean species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) of the *mesophragmatica* group. *Iheringia, Série Zoológica* 94(3): 295–299.

- Vela, D. & Rafael, V. 2005. Nuevas especies de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en el bosque Pasochoa, Pichincha-Ecuador. *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* 75: 69-80.
- Vela, D. & Rafael, V. 2005. Catorce nuevas especies del género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en el bosque húmedo montano del Volcán Pasochoa, Pichincha, Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 27: 27-41.
- Vilela, C.R. & Bächli, G. 1990. Taxonomic studies on neotropical species of seven genera of Drosophilidae (Diptera). *Bulletin of the Entomological Society of America, Supplement* 63.
- Wheeler M.R.; Takada H. & Brncic D. 1962. The *flavopilosa* species group of *Drosophila*. *Studies in Genetic II. Univ Texas Publ* 6(205):396-412.
- Winter, M.; Devictor, V. & Schweiger, O. 2013. Phylogenetic diversity and nature conservation: where are we? *Trends in Ecology & Evolution* 28(4): 199-204.
- Wilder, J.A. & Hollocher, H. 2003. Recent radiation of endemic Caribbean *Drosophila* of the *dunni* subgroup inferred from multilocus DNA sequence variation. *Evolution* 57(11):2566-2579.
- Yang, Y.; Hou, Z.C.; Qian, Y.H.; Kang, H. & Zeng, Q.T. 2012. Increasing the data size to accurately reconstruct the phylogenetic relationships between nine subgroups of the *Drosophila melanogaster* species group (Drosophilidae, Diptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62(1):214-223.
- Yotoko, K. S. C.; Medeiros, H. F.; Solferini, V. N. & Klaczko, L. B. 2003. A molecular study of the systematics of the *Drosophila tripunctata* group and the *tripunctata* radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 614–619.

Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation. The University of Texas. Austin-USA.

8. FIGURAS

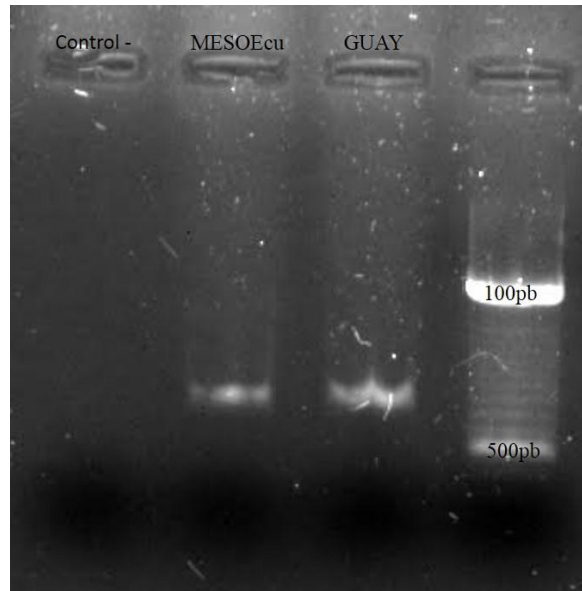


Figura 1a. Secuencias amplificadas de *COII* de *D. mesophragmatica* y *D. guayllabambae*.

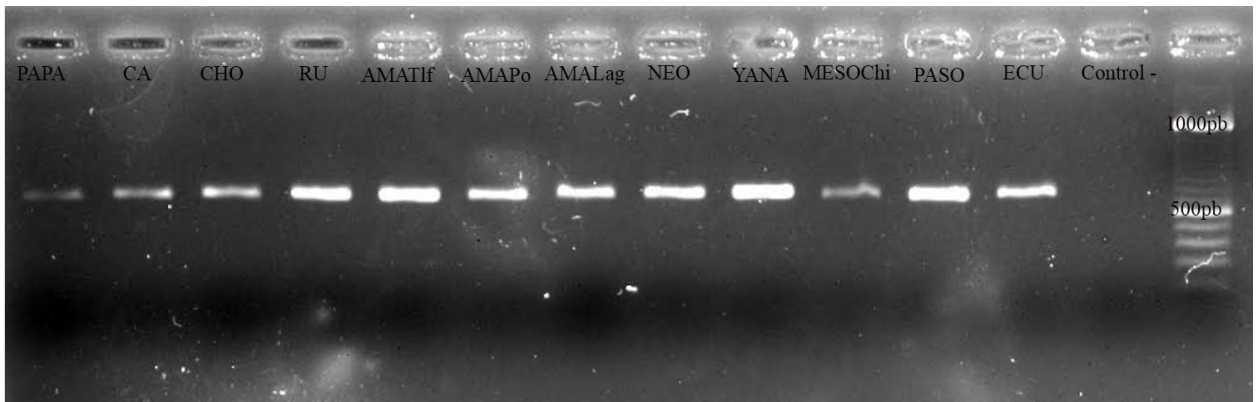


Figura 1b. Secuencias amplificadas de *COII* del resto de especies utilizadas en el estudio.

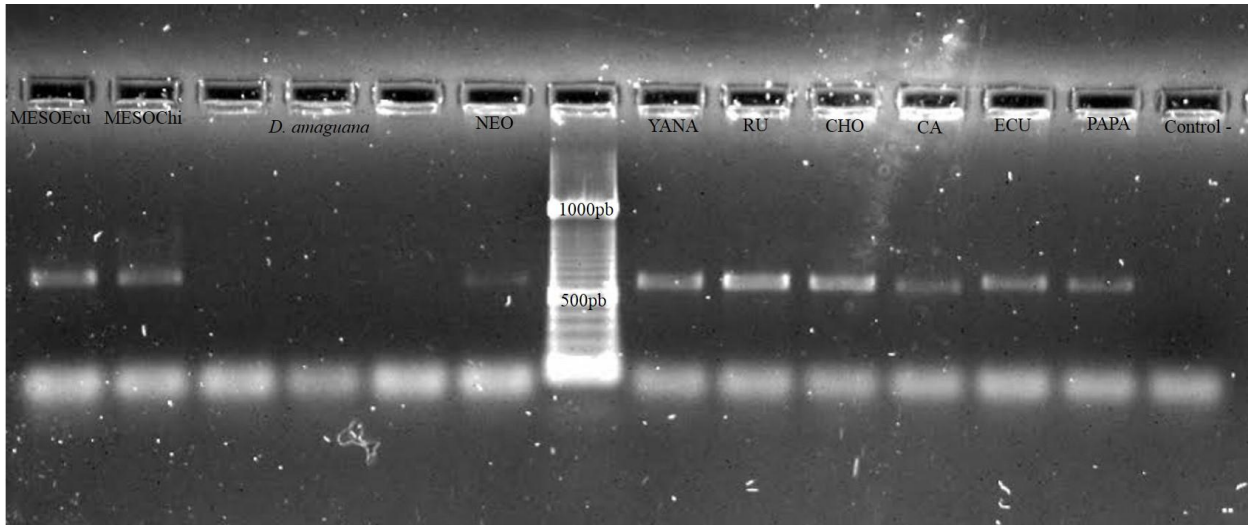


Figura 1c. Secuencias amplificadas de *Hb* de las especies utilizadas en el estudio, a excepción de las poblaciones de *D. amaguana* que no amplificaron y *D. chorlavi* con *D. cashapamba* que se utilizaron para estandarizar el protocolo.

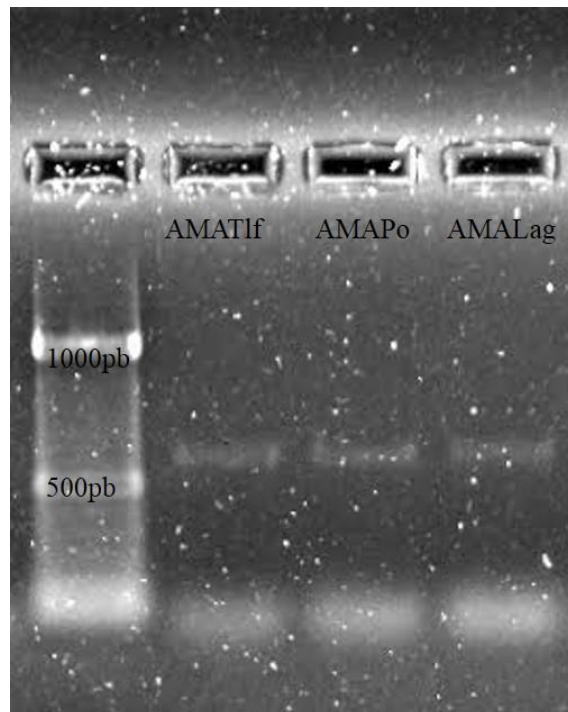
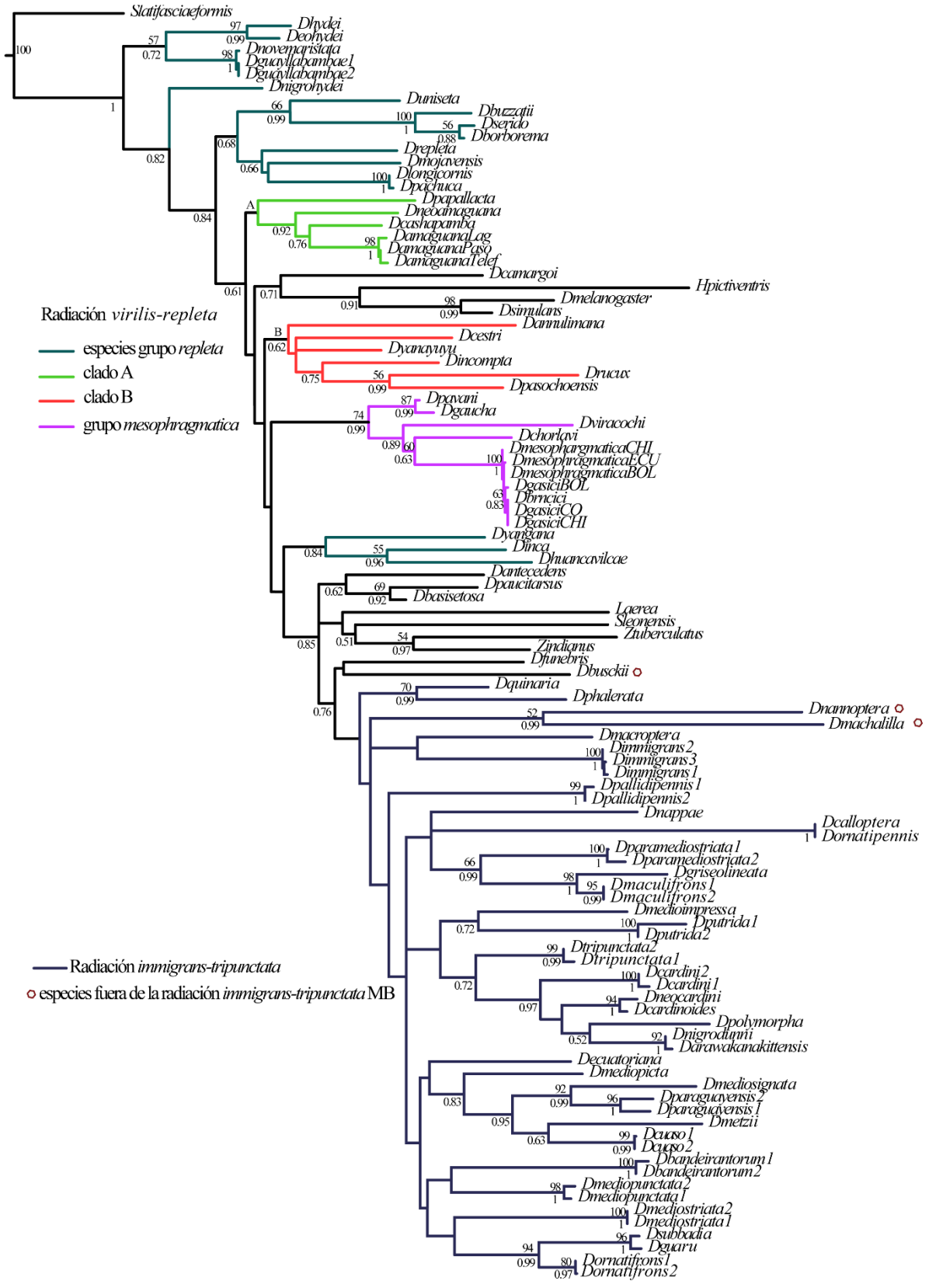


Figura 1d. Secuencias amplificadas de *Hb* para las poblaciones de *D. amaguana*.

Figura 2. Filograma mostrando las relaciones de las especies ecuatorianas del género *Drosophila* con el gen mitocondrial *COII*. Mejor árbol obtenido con Máxima Verosimilitud. Los colores representan los diferentes clados de interés obtenidos en este estudio. Los valores de bootstrap se muestran sobre las ramas y las probabilidades posteriores se muestran bajo las ramas; los valores faltantes indican valores por debajo de 50 (bootstrap) o 0.5 (probabilidades posteriores). Las abreviaturas son: **Lag** Laguna de Papallacta, **Paso** Pasochoa, **Telef** Teleférico-Cruz Loma, **CHI** Chile, **ECU** Ecuador, **BOL** Bolivia, **CO** Colombia.



0.2

Figura 3. Filograma mostrando las relaciones de las especies ecuatorianas del género *Drosophila* con el gen nuclear *Hb*. Mejor árbol obtenido con Máxima Verosimilitud. Los colores representan los diferentes clados de interés obtenidos en este estudio. Los valores de bootstrap se muestran sobre las ramas y las probabilidades posteriores se muestran bajo las ramas; los valores faltantes indican valores por debajo de 50 (bootstrap) o 0.5 (probabilidades posteriores). Las abreviaturas son: **Lag** Laguna de Papallacta, **Paso** Pasochoa, **Telef** Teleférico-Cruz Loma, **CHI** Chile, **ECU** Ecuador, **BOL** Bolivia, **CO** Colombia.

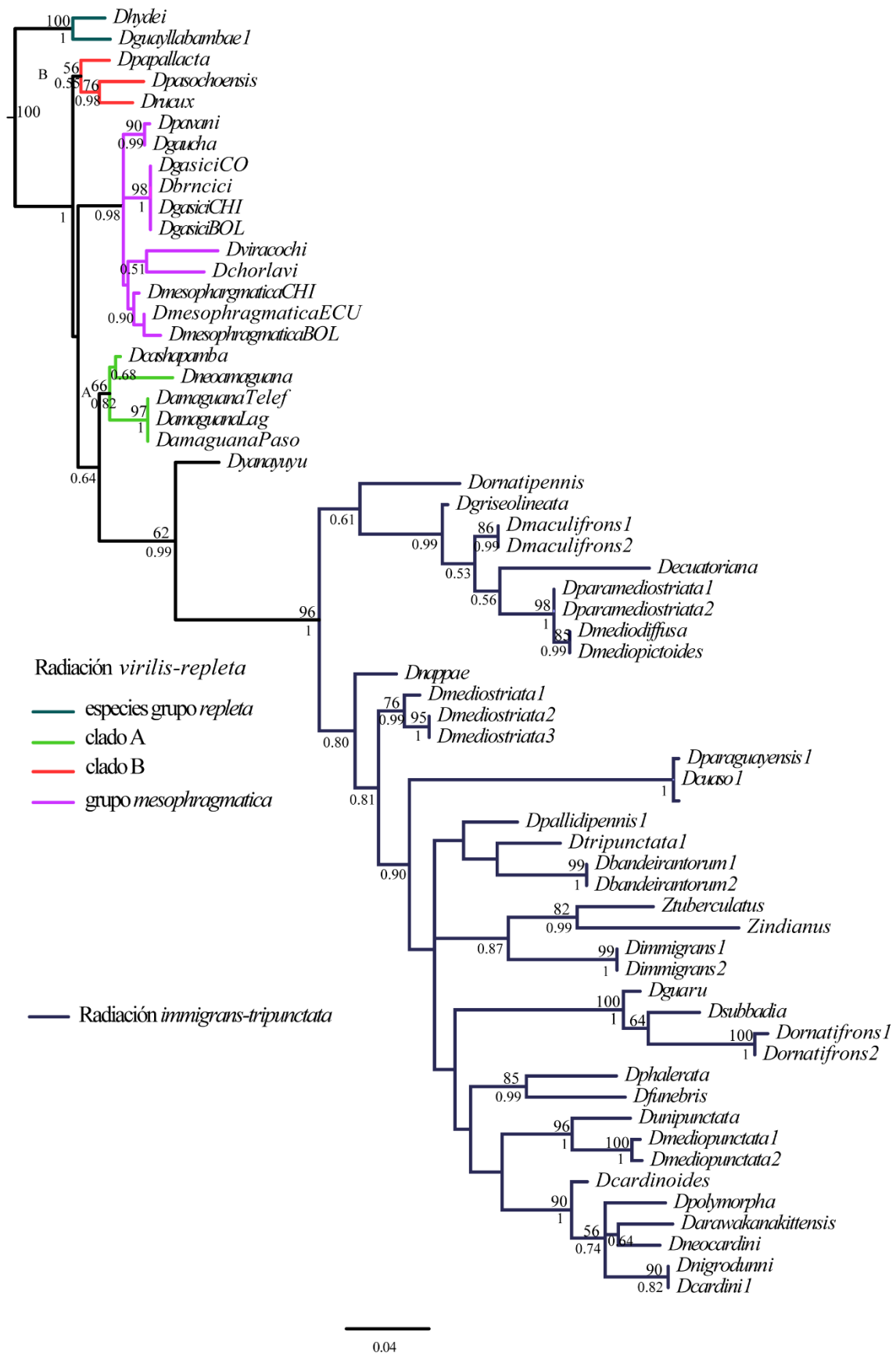


Figura 4. Filograma mostrando las relaciones de las especies ecuatorianas del género *Drosophila* con dos genes concatenados (*COII* y *Hb*). Mejor árbol obtenido con Máxima Verosimilitud. Los colores representan los diferentes clados de interés obtenidos en este estudio. Los valores de bootstrap se muestran sobre las ramas y las probabilidades posteriores se muestran bajo las ramas; los valores faltantes indican valores por debajo de 50 (bootstrap) o 0.5 (probabilidades posteriores). Las abreviaturas son: **Lag** Laguna de Papallacta, **Paso** Pasochoa, **Telef** Teleférico-Cruz Loma, **CHI** Chile, **ECU** Ecuador, **BOL** Bolivia, **CO** Colombia. Las especies escritas en letras grises solo tienen secuencia de *COII*.

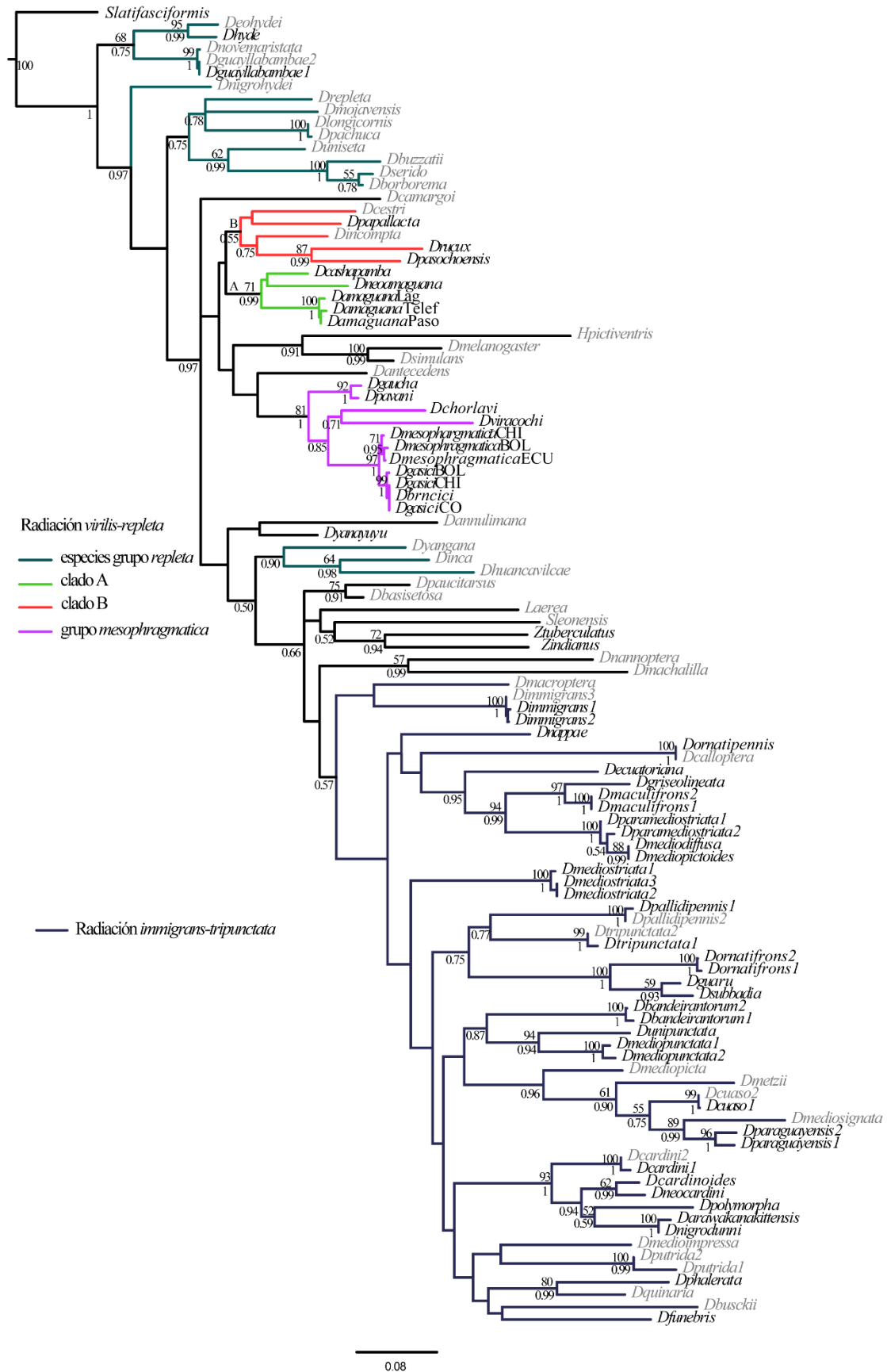
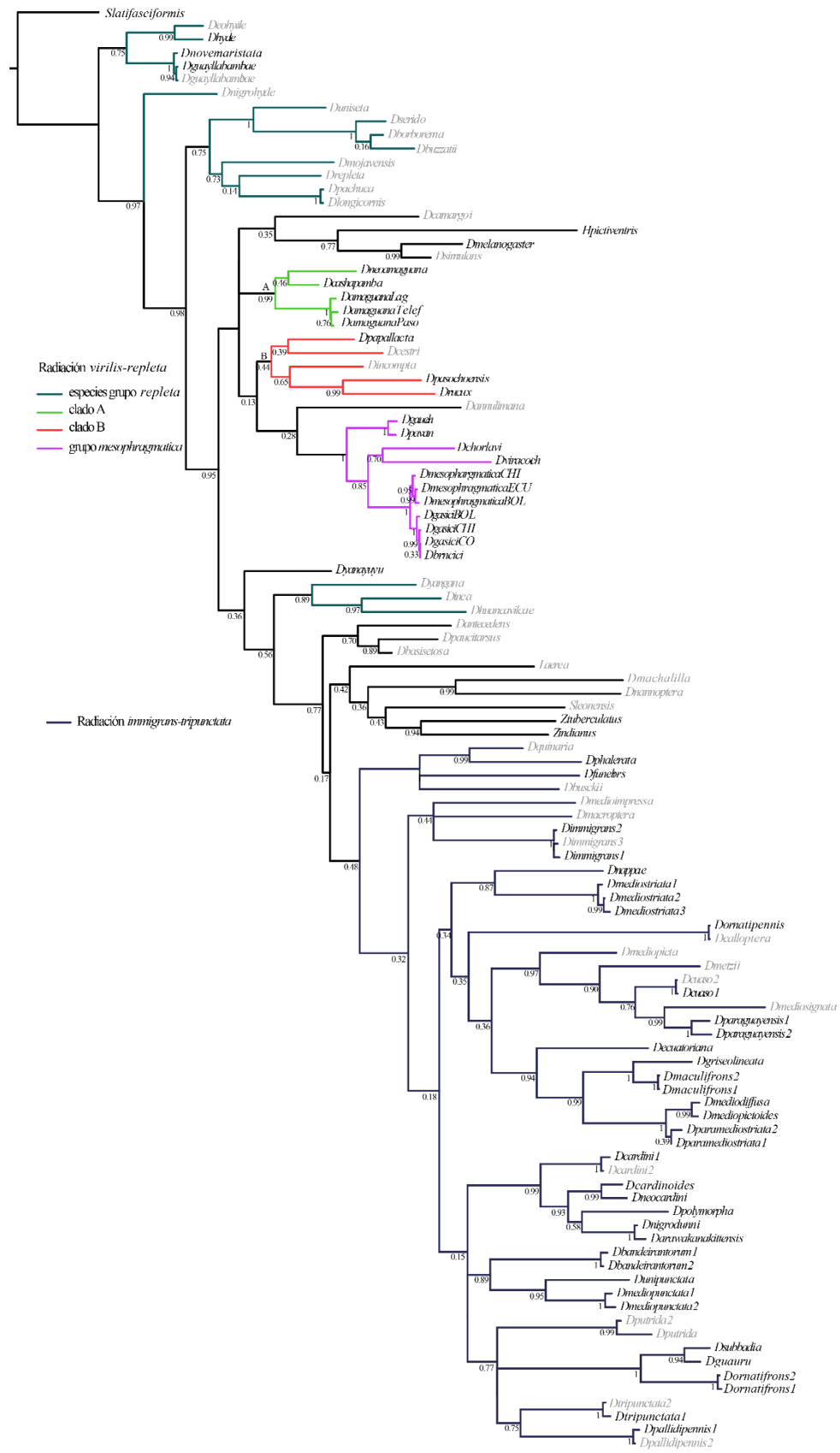






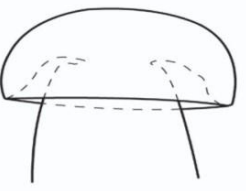
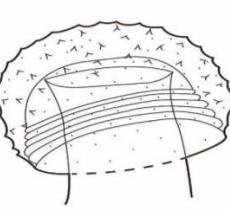



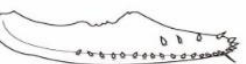


Figura 5. Filograma del árbol de máxima credibilidad de los clados mostrando las relaciones de las especies ecuatorianas del género *Drosophila* con dos genes concatenados (*COII* y *Hb*). Los colores representan los diferentes clados de interés obtenidos en este estudio. Los valores de las probabilidades posteriores se muestran bajo las ramas. Las abreviaturas son: **Lag** Laguna de Papallacta, **Paso** Pasochoa, **Telef** Teleférico-Cruz Loma, **CHI** Chile, **ECU** Ecuador, **BOL** Bolivia, **CO** Colombia. Las especies escritas en letras grises solo tienen secuencia de *COII*.



0.1

Estructura	<i>D. cashapamba</i>	<i>D. neoamaguana</i>	<i>D. amaguana</i>
falo			
surestilo			
espermateca			
ovipositor			

*Figuras obtenidas de: Vela & Rafael, 2004 (surestilo de *D. amaguana*) Céspedes & Rafael, 2012 (*D. cashapamba*); Ramos, 2015 (*D. neoamaguana* y demás estructuras de *D. amaguana*)

Figura 6. Estructuras de la genitalia interna de machos y hembras de las especies que conforman el clado A, *D. cashapamba*, *D. neoamagana* y *D. amaguana*.

9. TABLAS

Tabla 1a. Áreas de estudio de la provincia de Pichincha y las especies del grupo *D. mesophragmatica* que se podrían encontrar en cada una de las localidades.

Localidades Pichincha	Bosque	Coordenadas		Altitud	Especies del género <i>Drosophila</i> de interés
Quito, Teleférico (Cruz Loma)	Andino	0°11'22.5" S	78°31'17.2" W	3100- 3300 m	<i>D. mesophragmatica</i> , <i>D. amaguana</i> , <i>D. rucux</i> , <i>D. yanayuyu</i> y <i>D. paschoensis</i>
Paschocha	Andino	0°28' S	78° 29' W	2780- 3150 m	<i>D. mesophragmatica</i> , <i>D. amaguana</i> , <i>D. ruminahuii</i> , <i>D. shyri</i> y <i>D. paschoensis</i>
Peñas Blancas	Altoandino	0°17'56.1" S	78°14'37.5" W	3628 m	<i>D. mesophragmatica</i> , <i>D. amaguana</i> , <i>D. rucux</i>

Tabla 1b. Áreas de estudio de la provincia de Napo y las especies del grupo *D. mesophragmatica* que se podrían encontrar en cada una de las localidades.

Localidades Napo	Bosque	Coordenadas		Altitud	Especies del género <i>Drosophila</i> de interés
Páramo de Papallacta	Altoandino (páramo)	00°20'09.4" S	78°12'32.1" W	4014 m	<i>D. papallacta</i>
Laguna de Papallacta	Andino	0°22'52,6''S	78°09'44,4''W	3362 m	<i>D. amaguana</i> , <i>D. shyri</i>
Cordillera Guacamayos	Nublado (estribaciones andinas)	0°37'8,7" S	77°50'21,2" W	2200 m	<i>D. cashapamba</i> , <i>D. neoamaguana</i>

Tabla 2. Lista de las especies y poblaciones del género *Drosophila* utilizadas en el estudio, con sus lugares de colección y códigos utilizados en la extracción de ADN.

Grupo de especies	especies	Localidad	Código
<i>mesophragmatica</i>		Laguna de Papallacta, Napó	AMALag
	<i>D. amaguana</i>	Pasochoa, Pichincha	AMAPo
		Cruz Loma, Pichincha	AMATif
	<i>D. cashapamba</i>	Cordillera de los Guacamayos, Napó	CA
	<i>D. chorlavi</i>	Ibarra, Imbabura	CHO
		Cruz Loma, Pichincha	MESOEcu
	<i>D. mesophragmatica</i>	Chile	MESOChi
	<i>D. neoamaguana</i>	Cordillera de los Guacamayos, Napó	NEO
	<i>D. rucux</i>	Peñas Blancas, Pichincha	RU
	<i>D. yanayuyu</i>	Yanacocha , Pichincha	YANA
<i>guarani</i>	<i>D. ecuatoriana</i>	Páramo de Papallacta, Pichincha	ECU
<i>repleta</i>	<i>D. guayllabambae</i>	Guayllabamba, Pichincha	GUAY
<i>tripunctata</i>	<i>D. pasochoensis</i>	Cruz Loma, Pichincha	PASO
Sin agrupar	<i>D. papallacta</i>	Páramo de Papallacta, Pichincha	PAPA

Tabla 3. Cebadores que se utilizaron en el estudio para la amplificación de las secuencias parciales de los genes.

Locus	Primers	Secuencia	Referencia
<i>COII</i>	TL2-J-3037	5' ATG GCA GAT TAG TGC AAT GG 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994
	TK-N-3785	5' GTT TAA GAG ACC AGT ACT TG 3'	
<i>Hb</i>	Hb106F	5' TCG CAY GGM AAG ATG AAG AAC TAC AA 3'	Mota <i>et al.</i> , 2008
	Hb903R	5' TCC AGT ASG GGA ARA AGG CCA TG 3'	

Tabla 4a. Condiciones de la PCR para la amplificación de *COII*.

	Proceso	Temperatura	Tiempo
x 30 ciclos	Desnaturalización inicial	94°C	5 min.
	Desnaturalización	94°C	30 seg.
	Alineamiento	52°C	30 seg.
	Elongación	72°C	45 seg.
	Elongación final	72°C	10 min.

Tabla 4b. Condiciones de la PCR para la amplificación de *Hb*.

	Proceso	Temperatura	Tiempo
x 38 ciclos	Desnaturalización inicial	94°C	5 min.
	Desnaturalización	94°C	30 seg.
	Alineamiento	58°C (*41°C)	30 seg.
	Elongación	72°C	45 seg.
	Elongación final	72°C	7 min.

*Temperatura de alineamiento de los cebadores para *D. amaguana*

Tabla 5. Especies de la familia Drosophilidae incluidas en el análisis con sus números de acceso para la secuencia de *COII* y *Hb* del GeneBank

Género	Subgénero	Radiación	Grupo	Especie	Accesos del GeneBank	
					COII	Hb
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>	<i>immigrans-tripunctata</i>	<i>guaraní</i>	<i>D. ecuatoriana</i>	*	*
				<i>D. ornatifrons</i> 1	AY162977 a	EU447330 s
				<i>D. ornatifrons</i> 2	AY162978 a	EU450643 s
				<i>D. subbadia</i>	AY847772 b	EU447341 s
			<i>guaramunu</i>	<i>D. guaru</i>	AY847763 b	EU447315 s
				<i>D. griseolineata</i>	AF478426 c	EU447314 s
				<i>D. maculifrons</i> 2	AY162979 a	EU447318 s
				<i>D. maculifrons</i> 3	AY162980 a	EU447319 s
			<i>tripunctata</i>	<i>D. mediosignata</i>	AY162985 a	-
				<i>D. nappae</i>	AY162983 a	EU447327 s
				<i>D. paraguayensis</i> 1	AY162986 a	EU447333 s
				<i>D. paraguayensis</i> 2	AY162987 a	EU447334 s
				<i>D. cuaso</i> 1	AY170441 a	EU447311s
				<i>D. cuaso</i> 2	AY162984 a	-
				<i>D. mesiodiffusa</i>	-	EU447320 s
				<i>D. medioimpressa</i>	AY162994 a	-
				<i>D. mediopicta</i>	AY847768 b	-
				<i>D. mediopictoides</i>	-	EU447323 s
				<i>D. mediopunctata</i> 1	AY162988 a	EU447321 s
				<i>D. mediopunctata</i> 2	AY162989 a	EU447322 s
		<i>D. mediotriata</i> 1		AY847767 b	EU447310 s	
		<i>D. mediotriata</i> 2		AY847759 b	EU447324 s	
		<i>D. mediotriata</i> 3		-	EU447325 s	
		<i>D. metzii</i>		AY162992 a	-	
		<i>D. paschoensis</i>	*	*		
		<i>D. paramediotriata</i> 1	AY162995 a	EU447335 s		
		<i>D. paramediotriata</i> 2	AY162996 a	EU447336 s		
		<i>D. bandeirantorum</i> 1	AY162990 a	EU447306 s		
		<i>D. bandeirantorum</i> 2	AY162991 a	EU447307 s		
		<i>D. tripunctata</i> 1	AF478432 c	EU447342 s		
		<i>D. tripunctata</i> 2	AF519343 d	-		
		<i>D. unipunctata</i>	-	EU447343 s		
		<i>cardini</i>	<i>D. arawakana kittensis</i>	AY173165 j	EU447305 s	
			<i>D. cardini</i> 1	AY162974 a	EU447308 s	
			<i>D. cardini</i> 2	AF519319 d	-	
			<i>D. cardinoides</i>	AY162975 a	EU447309 s	
			<i>D. neocardini</i>	AY847770 b	EU447328 s	
			<i>D. nigrodunni</i>	AY173201 j	EU447329 s	

Tabla 5. (Continuación)

Género	Subgénero	Radiación	Grupo	especie	Accesos del GeneBank	
					COII	Hb
			<i>pallidipennis</i>	<i>D. pallidipennis</i> 1	AY162981 a	EU447332 s
				<i>D. pallidipennis</i> 2	AY162982 a	-
			<i>calloptera</i>	<i>D. calloptera</i>	AF478419 c	-
				<i>D. ornatipennis</i>	EU493704 k	EU447331 s
			<i>testacea</i>	<i>D. putrida</i> 1	AF478431 c	-
				<i>D. putrida</i> 2	AF519335 d	-
			<i>quinaria</i>	<i>D. quinaria</i>	AF478428 c	-
				<i>D. phalerata</i>	AF147115 e	EU447337 s
			<i>macroptera</i>	<i>D. macroptera</i>	EU493727 k	-
			<i>immigrans</i>	<i>D. immigrans</i> 1	AF478424 c	EU447316 s
				<i>D. immigrans</i> 2	AF519324 a	EU447317 s
				<i>D. immigrans</i> 3	AY162993 d	-
			<i>funnebris</i>	<i>D. funnebris</i>	AF478422 c	EU447312 s
			<i>virilis-</i> <i>repleta</i>	<i>atalaia</i>	KF632599 l	-
			<i>mesophragmatica</i>	<i>D. gasici</i> BOL	AY847761 b	EF559358 t
				<i>D. gasici</i> CHI	AY847760 b	EF559357 t
				<i>D. gasici</i> CO	AY847762 b	EF559359 t
				<i>D. brncici</i>	AY847757 b	EF559356 t
				<i>D. mesophragmatica</i> BOL	AY847769 b	EF559362 t
				<i>D. mesophragmatica</i> ECU	*	*
				<i>D. mesophragmatica</i> CHI	*	*
				<i>D. gaucha</i>	AF478423 c	EF559360 t
				<i>D. pavani</i>	AY847771 b	EF559363 t
				<i>D. viracochi</i>	AY847773 b	EF559364 t
				<i>D. amaguana</i> Lag	*	*
				<i>D. amaguana</i> Paso	*	*
				<i>D. amaguana</i> Telef	*	*
				<i>D. cashapamba</i>	*	*
				<i>D. chorlavi</i>	*	*
				<i>D. neoamaguana</i>	*	*
				<i>D. rucux</i>	*	*
				<i>D. yanayuyu</i>	*	*
			<i>repleta</i>	<i>D. hydei</i>	AF478429 c	EF559361 t
				<i>D. eohydei</i>	AF145889 d	-
				<i>D. borborema</i>	AF146171 f	-
				<i>D. buzzatii</i>	AF146169 f	-

Tabla 5. (Continuación)

Género	Subgénero	Radiación	Grupo	especie	Accesos del GeneBank	
					COII	Hb
				<i>D. mojavensis</i>	EU493738 k	-
				<i>D. nigrohedei</i>	AF145890 g	-
				<i>D. novemaristata</i>	DQ437710 n	-
				<i>D. pachuca</i>	DQ202037 m	-
				<i>D. repleta</i>	JF736105 o	-
				<i>D. serido</i>	AF146173 f	-
				<i>D. uniseta</i>	JF736111 o	-
				<i>D. guayllabambae</i> 1	*	*
				<i>D. guayllabambae</i> 2	DQ437709 n	-
				<i>D. huancavilcae</i>	KC011824 p	-
				<i>D. inca</i>	KC011826 p	-
				<i>D. yangana</i>	KC011828 p	-
			<i>dreyfusi</i>	<i>D. camargoi</i>	AF478421 c	-
			<i>flavopilosa</i>	<i>D. cestri</i>	AY847758 b	-
				<i>D. incompta</i>	AY847764 b	-
			<i>annulimana</i>	<i>D. annulimana</i>	AY847756 b	-
			<i>nannoptera</i>	<i>D. nannoptera</i>	AF478425 c	-
			sin agrupar	<i>D. papallacta</i>	*	*
	<i>Sophophora</i>		<i>melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i>	GQ376046 r	HQ631766 u
				<i>D. simulans</i>	AF474082 h	-
	<i>Dorsilopha</i>			<i>D. busckii</i>	AF519347 d	-
Idiomyia		Hawaiian	modified mouthparts	<i>D. antecedens</i>	HQ170634 q	-
		<i>Drosophila</i>	modified tarsus	<i>D. basisetosa</i>	HQ170640 q	-
			modified tarsus	<i>D. paucitarsus</i>	HQ170677 q	-
<i>Hirtodrosophila</i>				<i>H. pictiventris</i>	AF478434 c	-
<i>Liodrosophila</i>				<i>L. aerea</i>	AF478435 c	-
<i>Samoaia</i>				<i>S. leonensis</i>	AF478438 c	-
<i>Zaprionus</i>				<i>Z. indianus</i>	AY847774 b	-
				<i>Z. tuberculatus</i>	AF478440 c	-
<i>Scaptodrosophila</i>				<i>S. latifasciaeformis</i>	AY847765 b	-

* Secuencias obtenidas en el presente estudio. a. Secuencias de *COII*. Yotoko *et al.* 2003. b. Secuencias de *COII*. Robe *et al.* 2005. c. Secuencias de *COII*. Remsen & O'Grady, 2002. d. Secuencias de *COII*. Perlman *et al.* 2003. e. Secuencias de *COII*. Spicer & Jaenike, 1996. f. Secuencias de *COII*. Spicer, 1995. g. Secuencias de *COII*. Spicer & Pitnick, 1996. h. Secuencias de *COII*. O'Grady & Kidwell, 2002. j. Secuencias de *COII*. Wilder *et al.* 2003. k. Secuencias de *COII*. O'Grady & DeSalle, 2008. l. Secuencias de *COII*. Lang *et al.* 2004. m. Secuencias de *COII*. Oliveira *et al.* 2005. n. Secuencias de *COII*. Moran & Fontdevila, 2007. o. Secuencias de *COII*. Oliveira *et al.* unpublished. p. Secuencias de *COII*. Acurio *et al.* unpublished. q. Secuencias de *COII*. O'Grady *et al.* 2011. r. Secuencias de *COII*. Kellerman *et al.* 2009. s. Secuencias de *Hb*. Robe *et al.* 2010b. t. Secuencias de *Hb*. Mota *et al.* 2008. u. Secuencias de *Hb*. Yang *et al.* 2012.

Tabla 6. Modelos evolutivos utilizados para cada una de las particiones y para cada análisis.

	Modelos evolutivos para Garli (rxaml)	Modelos evolutivos para Mr Bayes (mrbayes)
Posición del codón	<i>COII</i>	
1	GTR+G	GTR+G
2	GTR+I+G	GTR+I+G
3	GTR+I+G	HKY+I+G
Posición del codón	<i>Hb</i>	
1	GTR+I+G	K80+I
2	GTR+G	GTR+G
3	GTR+G	GTR+G

10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN modificado de Piñol *et al.* 1998. Protocolo de extracción de ADN total a partir de un individuo adulto (*Drosophila*).

1. Pasar una mosca (dormida con CO₂, cloroformo, éter o si está congelada guardarla con hielo) a un tubo eppendorf.
(Encender baño a 65°C y centrifuga a 4°C)
2. Agregar 160 ul de Solución 1 (nevera) y homogenizar suavemente con varilla de vidrio estéril o punta azul.
3. Agregar 200 ul de Solución 2, agitar por inversión varias veces e incubar a 65°C durante 30 min.
4. Agregar 60 ul de Solución 3, agitar por inversión varias veces y congelar a -20°C durante 20 min.
5. Centrifugar 15 min. en micrófuga, recuperar el sobrenadante transfiriéndolo a un nuevo tubo eppendorf.
6. Volver a centrifugar el sobrenadante 10 min. para eliminar el SDS de la Solución 2, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.
7. Precipitar el sobrenadante agregando el mismo volumen de isopropanol frío, agitar por inversión e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
8. Centrifugar 10 min. en la micrófuga, descartar el sobrenadante por decantación y dejar el tubo hacia abajo en papel absorbente (aproximadamente 2 min.)
9. Lavar el precipitado con 500 ul de etanol al 70% frío (no desprender el pellet).
10. Centrifugar 5 min. en la micrófuga, descartar el sobrenadante por decantación.
11. Secar al vacío durante 10-15 min. o dejar toda la noche. Resuspender en 100 ul de H₂O (si hay poco ADN en 20 ul de H₂O).

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, María Luna Figuero Boza, C.C. 1726559089 autor del trabajo de graduación titulado: “Filogenia molecular de especies ecuatorianas del grupo *Drosophila mesophragmatica* (Diptera, Drosophilidae)”, previa a la obtención del grado académico de MAGISTER EN BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

- 1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
- 2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 25 de enero del 2017

Srta. María Luna Figuero Boza

C.C. 1726559089