

## **Trabajo Biología computacional**

**Juan Pablo Tobón V.**

### **Título**

**“Análisis filogenético e identificación molecular de califóridos “**

### **Introducción**

Cómo nos habla Solano et al. (2013) el uso de insectos asociados a cuerpos cadavéricos para estimar el intervalo post mortem de una forma efectiva es una práctica ampliamente utilizada por entidades gubernamentales y privadas en campos forenses. Los califóridos (Diptera : Calliphoridae) han sido objeto de estudios importantes en trabajos realizados en todo el mundo, gracias a su aparición en cuerpos cadavéricos, donde nos pueden dar una gran pista sobre el tiempo de descomposición[1]. La técnica predominantemente usada para la identificación de estas moscas es por medio de identificación morfológica, la cual presenta una serie de impedimentos que la vuelven poco confiable, como lo es la falta de individuos o encontrar estos estado larval donde su morfología difiere de los individuos en estado maduro y pueden ser confundidas con otras especies de moscas gracias a que esta familia posee más de 1000 especies en todo el mundo y en el neotrópico unas 136, distribuidas principalmente en 5 familias [2]. para evitar estos problemas se está dejando atrás el uso de técnicas tradicionales y se está abriendo camino a realizar esta tarea de identificación mediante el uso de técnicas moleculares para la determinación de especies, lo que hoy en día lleva el nombre de código de barra genético basados en el gen COI, una visión que podría acumular a casi todos los organismos de la tierra en una base genética para su rápida identificación. se utiliza dicho gen ya que es de gran utilidad para hacer diferenciación entre especies animales [3].

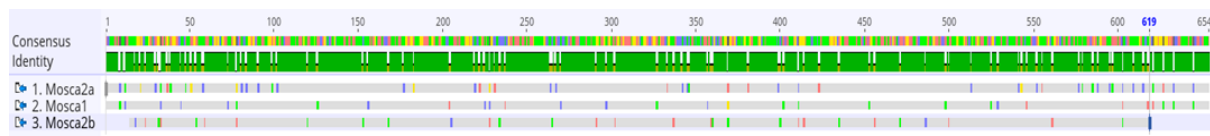
### **Pregunta?**

Se nos entregaron 2 secuencias 1 y dos respectivamente de las cuales 2 posee y B (1 , 2A y 2B) en total 3 de moscas desconocidas encontradas en el cuerpo sin vida de un hombre en la localidad de medellin, las secuencias provienen de larvas por lo cual no fue posible realizar análisis morfológico. con solo esto será posible hacer un análisis filogenético e identificación molecular de estas secuencias para identificar sus especies y así poder conocer donde murió la víctima ?

### **Workflow**

para resolver esta tarea haremos uso de las siguientes plataformas que nos ayudarán con el desarrollo de este problema ( genious, MEGA, y figtree)

iniciamos con un alineamiento de nuestras 3 en la plataforma genius para poder verificar que todas las secuencias son pertenecientes al gen COI



como podemos observar luego de realizar el alineamiento nos damos cuenta que las secuencias 1 y 2A sin lugar a dudas son el gen COI gracias a su altísima similitud tanto en tamaño como en alineamiento , pero en el caso de la secuencia 2B presenta tanto un tamaño diferente y una similitud no tan alta con respecto a las otras 2.

Para resolver esto se hace un blast a esta secuencia revelando que posee un codón de parada justo donde se termina la similitud por lo cual se asume que es un pseudogen del COI.

siguiendo debemos realizar una búsqueda en literatura de los códigos de acceso del genbank para secuencias COI de diversas moscas neotropicales para así dar soporte a nuestro futuro árbol filogenético, para realizar esta sección se utilizaron los artículos de Montoya et al. (2009) y Solano et al. (2013) donde se encuentran los códigos de acceso de diversas especies de moscas neotropicales.

**Tabla 2** Secuencias descargadas de GenBank.

Especie	Subfamilia	Codigo GenBank
<i>Calliphora vicina</i> BRA	Calliphorinae	JQ246672
<i>Calliphora vicina</i> KR	Calliphorinae	EU880189
<i>Chrysomya albiceps</i> BRA	Chrysomyinae	JQ246659
<i>Chrysomya albiceps</i> GER	Chrysomyinae	HE814059
<i>Chrysomya megacephala</i> BRA	Chrysomyinae	JQ246662
<i>Cochliomyia hominivorax</i> BRA	Chrysomyinae	HM185561
<i>Cochliomyia hominivorax</i> JAM	Chrysomyinae	HM185528
<i>Cochliomyia macellaria</i> BRA	Chrysomyinae	JQ246666
<i>Cochliomyia macellaria</i> EEUU	Chrysomyinae	AF295555
<i>Comptosyrops callipes</i> EEUU	Chrysomyinae	AF295549
<i>Comptosyrops fulvicrura</i>	Chrysomyinae	FJ025607
<i>Haematobia irritans</i> (Out group)	Muscoidea	JQ246702
<i>Glossina morsitans</i> (Out group)	Hippoboscoidea	JQ246706
<i>Lucilia eximia</i> BRA	Lucillinae	JQ246678
<i>Lucilia eximia</i> BRA2	Lucillinae	JF928490
<i>Lucilia eximia</i> BRA3	Lucillinae	JF928488
<i>Lucilia eximia</i> BRA4	Lucillinae	DQ453491
<i>Lucilia sericata</i> BEL	Lucillinae	JX295738
<i>Lucilia sericata</i> BRA	Lucillinae	JQ246679
<i>Mesembrinella bellardiana</i> BRA	Mesembrinellinae	JQ246688
<i>Mesembrinella bicolor</i> BRA	Mesembrinellinae	JQ246689
<i>Mesembrinella peregrina</i> BRA	Mesembrinellinae	JQ246690
<i>Musca domestica</i> (Out group)	Muscoidea	JQ246703
<i>Paralucilia paraensis</i> BRA	Chrysomyinae	HM639978

Solano et al. (2013)

**Tabla 1.** Frecuencia absoluta y relativa de las especies de Calliphoridae en las tres aéreas de muestreo en el Municipio de La Pintada, Antioquia-Colombia, entre Febrero y Julio de 2007.

Especie	Urbano		Rural		Bosque		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Chrysomya megacephala</i>	751	95,79	25	3,56	9	1,1	785	32,6
<i>Cochliomyia macellaria</i>	553	70	197	27,28	40	5,54	790	32,85
<i>Lucilia eximia</i>	220	58,36	145	39,73	12	3,29	377	15,68
<i>Chrysomya albiceps</i>	247	58,12	121	34	57	16	425	17,67
<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	0	0	5	33,33	10	66,67	15	0,62
<i>Chloroprocta idioidea</i>	0	0	1	25	3	75	4	0,17
<i>Lucilia cuprina</i>	3	100	0	0	0	0	3	0,12
<i>Hemilucilia segmentaria</i>	0	0	0	0	2	100	2	0,08
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	0	0	2	50	2	50	4	0,17
<i>Paralucilia pseudolycea</i>	0	0	0	0	1	100	1	0,04
<b>Total</b>	1774	73,76	496	20,62	136	5,61	2406	100

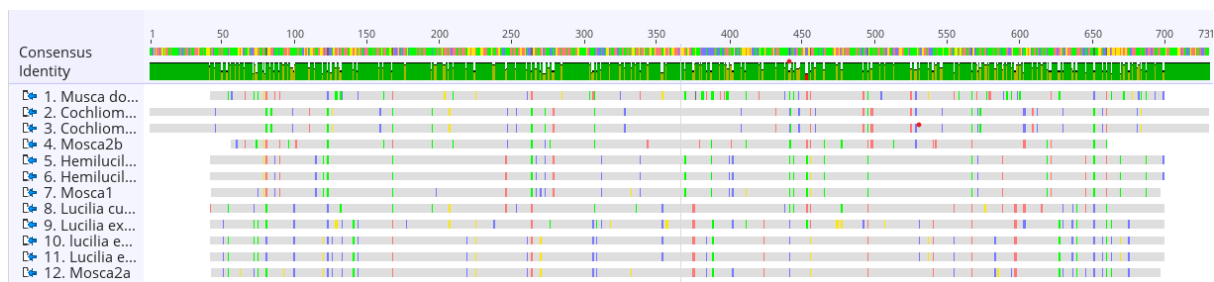
**Tabla 2.** Frecuencia absoluta y relativa de las especies capturadas con cada uno de los atrayentes en las tres aéreas de muestreo del municipio de La Pintada, Antioquia-Colombia, entre Febrero y Julio de 2007.

Especie	Visceras de pollo		Pescado descompuesto		Heces humanas		Cebolla descompuesta		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<i>Chrysomya megacephala</i>	580	73,85	162	20,66	43	5,485	0	0	785
<i>Cochliomyia macellaria</i>	519	65,7	247	31,27	24	3,038	0	0	790
<i>Lucilia eximia</i>	278	73,74	53	14,06	42	11,14	4	1,1	377
<i>Chrysomya albiceps</i>	241	56,71	182	42,82	2	0,471	0	0	425
<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	6	40	6	40	3	20	0	0	15
<i>Chloroprocta idioidea</i>	1	25	3	75	0	0	0	0	4
<i>Lucilia cuprina</i>	3	100	0	0	0	0	0	0	3
<i>Hemilucilia segmentaria</i>	1	50	1	50	0	0	0	0	2
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	1	25	2	50	1	25	0	0	4
<i>Paralucilia pseudolycea</i>	1	100	0	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	1631	67,78	656	27,28	115	4,78	4	0,17	2406

Montoya et al. (2009)

Se utilizaron ambas tablas para tener conocimiento sobre la zona en la que habitan estas especies y poder filtrar a regiones aledañas al área metropolitana, que es nuestra zona de interés.

seguido de esto llevamos todas nuestras secuencias de moscas otra vez a genius donde realizaremos un alignment múltiple por medio de MUSCLE alignment junto a las 3 secuencias iniciales, debemos tener en cuenta que se debe adicionar un grupo externo, en este caso se utilizó musca domestica.



luego de tener nuestro alignment de todas las secuencias podremos proseguir con la reconstrucción filogenética, utilizando la función de genius, pero primero se debe instalar el plugin RAXML (TOOLS-Plugins-Busque el plugin RaxML-Install-OK) y luego (Tools–Tree–RaxML–Nucleotide Model[GTRGAMMA]–Algorithm[Rapid Bootstrapping and searchforbest-scoring MAltree]–Number Bootstrap Replicates[100]-OK)

Tree

Geneious Tree Builder Consensus Tree Builder RAXML (restricted)

☐ Exclude masked sites: ?

Genetic Distance Model: Tamura-Nei

Tree Build Method: Neighbor-Joining

Outgroup: No Outgroup

Pairwise distances will be obtained from the multiple sequence alignment. This may reduce accuracy slightly but will produce results faster.

Consensus Tree Options

☐ Resample tree

Resampling Method: Bootstrap

Random Seed: 122,490

Number of Replicates: 100

☒ Create Consensus Tree

☐ Sort Topologies

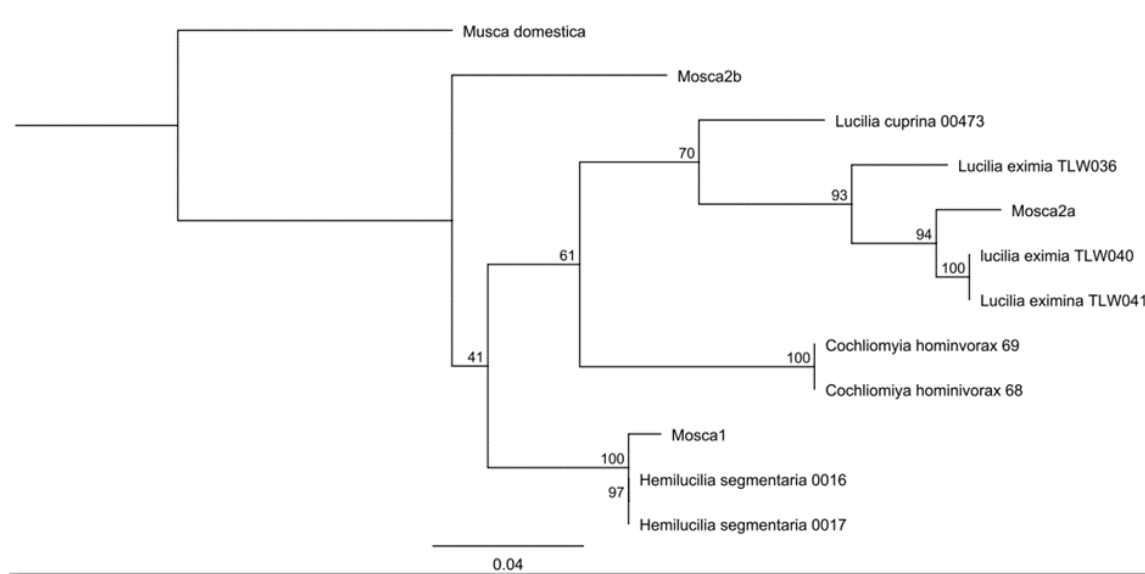
Support Threshold %: 50

Topology Threshold %: 0

☐ Save raw trees

OK Cancel

esto nos entrega dos archivos en los cuales encontraremos nuestro árbol filogenético con los valores de bootstrap



## Resultados & discusión

En la figura 1 tenemos el árbol de reconstrucción filogenética donde podemos observar las especies que corresponden a las dos secuencias entregadas por el CTI que son : *Hemilucilia segmentaria* para la mosca 1 y *Lucilia eximia* para la mosca 2A ambos basados en unos valores altos de bootstrap lo que nos daría a entender que son relaciones con un soporte sólido para cada especie demostrando así que son monofiléticos, en cuanto a la secuencia 2 B no dio como resultado ninguna similitud aparente esto puede ser debido a que como fue explicado previamente no sea del todo un coi sino un pseudo gen por lo cual no será óptimo para un análisis filogenético.

Gracias a esta información sabemos que *Lucilia eximia* es una especie que se distribuye en zonas urbanas entre los 0 y 2600 msnm [2] o cual nos da un indicio de que la víctima estuvo en área urbana, por el contrario *Hemilucilia segmentaria* es una especie de hábito únicamente boscoso con una distribución de 300 a 1900 msnm [2] por lo que se logra concluir que sería imposible que la víctima solo estuviera en medellín entre los días lunes y miércoles, que abarcan su periodo de desaparición.

## Conclusiones

El uso de mapeo genético es una técnica confiable para poder hacer identificación molecular cuando no sea posible hacer esta de forma morfológica

## **Referencias**

- [1] Solano JJ, Wolff M, Castro LR. 2013. Identificación molecular de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (2):281-290.
- [2] Montoya AL, Sánchez JD, Wolff M. 2009. Sinantropía de Calliphoridae (Diptera) del Municipio La Pintada, Antioquia – Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 35 (1): 73-82