

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

**GENERACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS MOLECULARES PARA
DÍPTEROS DE LA FAMILIA PHORIDAE REGISTRADOS EN TRES
LOCALIDADES DEL NOROCCIDENTE DE ECUADOR**

AUTOR:

RONALD DANIEL TOAPANTA MOROCHO

TUTORA:

GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIÉRREZ

Quito, enero del 2018

Cesión de derechos de autor

Yo Ronald Daniel Toapanta Morocho, con documento de identificación N° 172204837-6, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Generación de códigos de barras moleculares para dípteros de la familia Phoridae registrados en tres localidades del noroccidente de Ecuador”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Ronald Daniel Toapanta Morocho

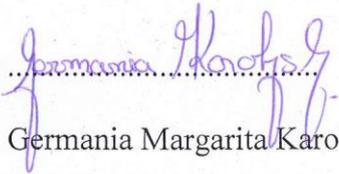
C.I: 172204837-6

Quito, enero de 2018

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Generación de códigos de barras moleculares para dípteros de la familia Phoridae registrados en tres localidades del noroccidente de Ecuador” realizado por Ronald Daniel Toapanta Morocho, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, enero de 2018



Germania Margarita Karolys Gutiérrez

C.I: 170849249-9

Dedicatoria

A Dios,

Por guiar mi vida y ayudarme a superar todas las adversidades que se han presentado durante el transcurso de la carrera.

A mis padres Carlos Toapanta y Rebeca Morocho,

Quienes no solamente se han esforzado dándome una buena educación, sino que además me han sabido infundir valores que me han hecho crecer como persona, y principalmente les dedico este trabajo por ser mi fuente de inspiración a todo momento.

A mis hermanos Stalin, Darío, Samira, Alexandra

Quienes han estado presentes en cada etapa de mi vida brindándome alegrías, consejos, y sobretodo cariño. Por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

A mi querido sobrino Julián,

Quien ocupa una gran parte de mi corazón, y ha compartido conmigo gratos momentos llenos de risas, enojos, y locuras que no los cambiaría por nada del mundo.

A María José,

Por ser mi cómplice, confidente y compañera incondicional durante gran parte de mi carrera universitaria, por siempre alentarme con su amor y creer en mí a todo momento.

Agradecimientos

Un especial y afectivo agradecimiento a Adrián Troya, por permitirme formar parte de su equipo de investigación, por creer en mis capacidades y guiarme con sus consejos y conocimientos durante la consecución de gran parte este trabajo, siendo un excelente profesional y amigo digno de admirar.

A mi tutora, Germania Karolys, por su guía y disposición a todo momento en el desarrollo de este trabajo, y sobre todo por depositar su confianza en mí, abriéndome las puertas al camino de la investigación.

A mis profesores de la Universidad Politécnica Salesiana: María Fernanda Guevara, Janss Beltrán, Nancy Bonifaz, Fabián Bersosa por su colaboración, enseñanzas y sobre todo por guiar gran parte de mi carrera profesional.

Al Instituto de Ciencias Biológicas (ICB-EPN) y Departamento de Metalurgia Extractiva de la Escuela Politécnica Nacional (DEMEX), y al Laboratorio de Biología Molecular del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica, por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipos, además de brindarme una cálida acogida y guía por gran parte de su personal de trabajo.

A todos mis amigos y demás personas que me brindaron su guía y conocimientos, especialmente a Alex Achig, Raquel Vargas, Byron Fuertes, Diego Mallitasig, Jonathan García y Francisco López.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	4
Marco conceptual	4
1.1. Biodiversidad.....	4
1.2. Bosques nublados	4
1.2.1. Bosques nublados de Ecuador.....	5
1.2.2. Amenazas que enfrentan los bosques nublados	8
1.3. Dípteros: Familia Phoridae.....	9
1.3.1. Aspectos generales	9
1.3.2. Características morfológicas	10
1.3.3. Clasificación taxonómica	12
1.3.4. Importancia ecológica.....	14
1.4. Técnicas de análisis de ADN en sistemática molecular.....	15
1.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
1.4.2. Códigos de barras de ADN	17
Capítulo 2	19
Marco metodológico	19
2.1. Especímenes y localización geográfica del estudio.....	19
2.2. Análisis morfológico	20
2.3. Análisis molecular	22
2.3.1. Extracción de ADN	23

2.3.2. Amplificación	24
2.3.3. Obtención de secuencias y análisis	25
Capítulo 3	28
Resultados y Discusión	28
3.1. Análisis morfológico de géneros y morfoespecies de Phoridae	28
3.2. Análisis molecular de morfoespecies de Phoridae	43
3.2.1. Extracción de ADN	43
3.2.2. Amplificación de CO1	44
3.2.3. Análisis y características de las secuencias	46
Conclusiones	59
Recomendaciones	60
Referencias	61
Anexos	76

Índice de tablas

Tabla 1. Sitios específicos en donde se hizo la recolección de especímenes.....	20
Tabla 2. Caracteres morfológicos de individuos de Phoridae medidos en micrómetros (µm)	22
Tabla 3. Cebadores universales utilizados para la amplificación de una región del gen <i>COI</i>	24
Tabla 4. Número de especies e individuos de géneros de la familia Phoridae en Ecuador.	30
Tabla 5. Distancias genéticas dentro de grupos de Phoridae identificados en el presente estudio.	48

Índice de figuras

Figura 1. Caracteres diagnósticos de la familia Phoridae	11
Figura 2. Diferencias entre macho y hembra en los segmentos terminales	12
Figura 3. Clasificación taxonómica de la familia Phoridae	13
Figura 4. Lugares de muestreo en el Noroccidente de Ecuador	19
Figura 5. Número de morfoespecies por géneroC.....	29
Figura 6. Número de individuos por morfoespecie	30
Figura 7. Geles de electroforesis de CO1 amplificados con LCO1490 y HCO2198.....	45
Figura 8. Gel de electroforesis de CO1 amplificados con C1-J-1632 y C1-N-2191.....	46
Figura 9. Histograma de distancias interespecíficas vs distancias intraespecíficas.....	49
Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de Metopininae y Phorinae	53
Figura 11. Árbol filogenético por el método bayesiano de la Subfamilia Metopininae	56
Figura 12. Árbol filogenético por el método bayesiano de la Subfamilia Phorinae.....	58

Índice de anexos

Anexo 1. Lista de caracteres morfológicos de la familia Phoridae, revisados en el presente estudio	76
Anexo 2. Ubicación de los caracteres morfológicos tomados en cuenta para su medición.....	79
Anexo 3. Lista de morfoespecies, códigos y localidades de la familia Phoridae empleadas para la identificación molecular	81
Anexo 4. Protocolo de extracción de ADN de los especímenes de Phoridae analizados en el presente estudio	84
Anexo 5. Cantidades y concentraciones de cada reactivo empleado para la preparación del Master mix	84
Anexo 6. Secuencias de CO1 de especies de Phoridae descargadas de Bold System y del Genbank.....	85
Anexo 7. Medidas en μm de caracteres morfológicos tomados en cuenta para la identificación de morfoespecies de cada género de Phoridae en estudio	87
Anexo 8. Fotografías de vista lateral (VL) y frontal (VF) de las morfoespecies de cada género de Phoridae identificados en el presente estudio.....	88
Anexo 9. Medidas de cuantificación, e índices de calidad y pureza de las muestras de ADN obtenidas en el presente estudio	100
Anexo 10. Lista de secuencias consenso, códigos, calidad, tamaño, porcentaje de GC, y resultados del BLASTn, de morfoespecies de la familia Phoridae.....	103
Anexo 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la familia de Phoridae.. ..	106
Anexo 12. Lista de especímenes de Phoridae propuestos como códigos de barras moleculares.....	108

Resumen

Los fóridos, también conocidos como moscas jorobadas, representan posiblemente una de las familias de dípteros más diversas alrededor del mundo, además de presentar una amplia variedad de hábitos comportamentales, lo que les confiere un importante papel en la dinámica ecológica de los ecosistemas. Aun así, este grupo ha sido poco estudiado y nulamente tomado en cuenta en inventarios de biodiversidad debido principalmente a la dificultad en la determinación de sus diminutas especies. En este sentido, los códigos de barras de ADN han probado ser de especial utilidad en la discriminación de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) en ausencia de claves para especies. Es por ello que en el presente trabajo, se proponen códigos de barras moleculares para la identificación taxonómica de morfoespecies de Phoridae previamente clasificadas en base a su morfología, de tal manera que se pueda contribuir al conocimiento de la fauna de estos dípteros en los bosques nublados del Noroccidente de Ecuador, debido a la relevancia que estos hábitats presentan en el ámbito de la conservación, puesto que están reconocidos entre los “hots-spots” más importantes del mundo. En total se proponen 52 secuencias como códigos de barras moleculares, distribuidos en 8 géneros y 36 morfoespecies, cuyos vouchers se encuentran depositados en la colección del Museo de la Escuela Politécnica Nacional (MEPN). Los análisis genéticos, en particular las divergencias nucleotídicas entre secuencias, mostraron una distancia genética superior al 2 %, concluyendo así que el gen mitocondrial *COI* resulta de gran utilidad para la identificación de especies de la familia Phoridae.

Palabras clave: Phoridae, morfoespecie, código de barras de ADN, gen citocromo oxidasa 1, distancia genética.

Abstract

The phorids, also known as humpback flies, represent possibly one of the most diverse families of diptera around the world, in addition to presenting a wide variety of behavioral habits, which gives them an important role in the ecological dynamics of ecosystems. Even so, this group has been little studied and is not considered in biodiversity inventories due mainly to the difficulty in determining its tiny species. In this sense, DNA barcodes have proven to be especially useful in the discrimination of operational taxonomic units (OTUs) in the absence of keys for species. That is why in the present work, molecular bar codes are proposed for the taxonomic identification of morphospecies of Phoridae previously classified based on their morphology, in such a way that it can contribute to the knowledge of the fauna of these diptera in the cloud forests of the Northwest of Ecuador, due to the relevance that these habitats present in the conservation field, since they are recognized among the most important hotspots in the world. In total, 52 sequences are proposed as molecular barcodes, distributed in 8 genera and 36 morphospecies, whose vouchers are deposited in the collection of the Museum of the National Polytechnic School (MEPN). The genetic analyzes, in particular the nucleotide divergences between sequences, showed a genetic distance of more than 2%, thus concluding that the mitochondrial gene *COI* is very useful for the identification of species of the family Phoridae.

Key words: Phoridae, morphospecies, DNA barcode, cytochrome oxidase 1, genetic distance.

Introducción

En Ecuador existe una gran variedad de ecosistemas que albergan a una alta diversidad biológica, tanto de plantas como animales, razón por la cual es considerado como un país megadiverso. Esta riqueza biológica se debe en parte a que Ecuador posee varios tipos de bosques en una de las regiones biogeográficas más biodiversas del mundo, la Región Neotropical (Cisneros-Heredia, 2006). Sin embargo, factores como el avance de la frontera agrícola, la explotación indiscriminada de los recursos naturales como el petróleo, las fuentes de agua, los minerales, entre otros, han ocasionado la pérdida progresiva de la cobertura vegetal, especialmente en los trópicos (Arima, *et al.*, 2014; Morales-Barquero, *et al.*, 2015) y por consiguiente la pérdida de gran parte de la diversidad desarrollada en estos hábitats; es por ello que los bosques nublados del Noroccidente de Ecuador constituyen uno de los últimos refugios para el albergue de una amplia diversidad de organismos.

Los bosques nublados del Noroccidente de Ecuador presentan ecosistemas dominados por una rica vegetación constituida principalmente por epífitas como orquídeas, helechos y bromelias (Valencia, *et al.*, 1999); y en cuanto a su fauna, ésta se encuentra conformada por un alto grado de endemismo tanto de pequeños vertebrados, como de invertebrados (Villamarín & Mena, 2009). No obstante el conocimiento de la biología, ecología e historia natural de estos animales, es prácticamente nulo, lo cual se refleja en el escaso número de investigaciones relacionadas, en particular, a la fauna de insectos cuya importancia en el equilibrio ecológico del medio natural es evidente, proporcionando roles claves en los ecosistemas, como la polinización, descomposición de materia muerta, fertilidad y aireación del suelo, regulación de poblaciones, entre otros (De la Cruz, 2005). Una significativa proporción de individuos, dentro de los

insectos, que habitan en estos bosques nublados está conformada por moscas (Díptera) (Roy B. & Troya A., com. pers., 2016). Debido a la gran abundancia y distribución que los dípteros presentan alrededor del mundo, son vitales las investigaciones referentes a este grupo de insectos, en estudios de diversidad, relaciones entre especies, comportamiento y relación con el medio ambiente (Carles-Tolrá, 2015).

Recientes estudios biológicos y desarrollo de inventarios de moscas en varias localidades de bosques nublados del Noroccidente de Ecuador reportan que los Phoridae o moscas jorobadas, representan una de las familias de dípteros más abundantes en estos ecosistemas (Roy B. & Troya A., com. pers., 2016). Disney (1994) menciona que los Phoridae poseen una amplia variedad de hábitos comportamentales, lo cual incrementa su importancia en varias líneas de investigación ecológicas. Varios autores afirman, a través de sus estudios, que la importancia ecológica de los Phoridae comprende los siguientes beneficios: consumen materia orgánica en descomposición (Disney, 1994), son polinizadores (Albores-Ortiz & Sosa, 2006; Borba & Semir, 2001), son utilizados en programas de control biológico (Uribe, 2013), entre otros, sumándose a ellos ciertos prejuicios que también se los atribuye, como ser causantes de daños a sistemas agrícolas (García-Morrás, *et al.*, 2000), y ocasionar enfermedades parasitarias (Brown B. V., 2010). Por lo tanto, estudios dirigidos a la identificación de especímenes de esta familia, resultan de vital importancia no solo para promover la conservación de la riqueza biológica del sector, sino también para comprender el papel que cumplen estos individuos en la dinámica ecológica del ecosistema.

En Ecuador, los estudios relacionados a este grupo de dípteros son prácticamente nulos (Web of Science, palabras clave: Phoridae, Ecuador, taxonomy), debido

principalmente a la dificultad en la determinación taxonómica de gran parte de sus especies, por lo que su importancia ecológica ha sido subestimada (Disney, 1994). Es así que el uso de herramientas moleculares, particularmente los barcodes o códigos de barras moleculares basados en amplificaciones de subunidades I y II del citocromo oxidasa (Harvey, Dadour, & Gaudieri, 2003; Zehner, *et al.*, 2004), constituyen en la actualidad una alternativa que facilitará la identificación de especies y contribuirá a revitalizar las colecciones biológicas, así como también acelerar inventarios de la biodiversidad (Gregory, 2005; Hebert & Gregory, 2005; Schindel & Miller, 2005).

El objetivo de la presente investigación, es generar códigos de barras moleculares, mediante la amplificación de una región del gen Citocromo Oxidasa 1 (*COI*), para dípteros de la familia Phoridae, de tal manera que se pueda contribuir junto con los análisis morfológicos, a una correcta identificación taxonómica de estos organismos que por métodos tradicionales resultan difíciles de determinar. Para ello se identificaron morfológicamente un total de 200 individuos depositados en la Colección del Museo de la Escuela Politécnica Nacional (MEPN); posteriormente se procedieron a realizar los análisis moleculares, que incluyeron: extracción de ADN, amplificación y análisis bioinformáticos con el fin de analizar las divergencias intra e interespecíficas, así como también la construcción de árboles filogenéticos mediante máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, que corroboren a la identificación molecular de las morfoespecies previamente clasificadas. Finalmente, aquellas morfoespecies identificadas tanto morfológica como molecularmente, serán propuestas como códigos de barras moleculares que posteriormente serán cargadas a la plataforma BOLDSYSTEM (Ratnasingham & Hebert, 2007) después de una revisión hecha por un especialista.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1. Biodiversidad

La biodiversidad o diversidad biológica es un término cuya definición ha sido susceptible de varias controversias debido a los amplios conceptos que engloba, así como la ausencia de parámetros adecuados para su medición (Hurlbert, 1971; Salt, 1979), éstos han hecho de su definición un concepto poco claro que ha venido siendo utilizada en una multitud de contextos. De Mas Castroverde (2007) menciona que, en la actualidad, la biodiversidad “es un indicador del estado de los sistemas biológicos que se utiliza ampliamente para fines de conservación y gestión ambiental” (pág. 17).

Hubbell (2001) define a la biodiversidad como sinónimo de la riqueza de especies y su abundancia relativa en el espacio y tiempo, posterior a ello, Magurran (2004) utiliza como concepto de biodiversidad a la variedad y abundancia de especies en una unidad de estudio definida. Sin embargo, apoyado en las premisas anteriores, De Mas Castroverde (2007) manifiesta que “la diversidad biológica no depende sólo de la riqueza de especies, sino también de la dominancia relativa y la abundancia de cada una de ellas, considerándose más diversa una comunidad más equitativa” (pág. 18).

1.2. Bosques nublados

Una de las definiciones más acordes de los bosques nublados, es la propuesta por Hamilton, Juvik, & Scatena (1995), quienes manifiestan que los bosques nublados constituyen ecosistemas forestales con una flora y estructura características, se encuentran por lo general en franjas altitudinales caracterizados por una cobertura de

nubes persistente o estacional, cuya precipitación se encuentra en rangos anuales de 500 a 10000 mm, éstos bosques presentan una alta proporción de epífitas, entre ellas: briófitas, líquenes y helechos; los suelos son normalmente húmedos y presentan una gruesa capa de materia orgánica humificada; y en cuanto a su biodiversidad, éstos ecosistemas presentan altos grados de endemismo y de riqueza biológica concentrada principalmente en los árboles.

Por otro lado, el clima de estos ecosistemas es templado cálido con temperaturas promedio mensuales entre 20 y 30 °C, encontrándose también temperaturas bajas, correspondientes a 10 °C en las áreas subtropicales en invierno, llegando incluso a heladas en los extremos latitudinales de su distribución en países como México y Argentina (Brown & Kappelle, 2001).

A nivel mundial, los bosques nublados por encima de los 1000 m.s.n.m. representan unos 48 millones de ha, de las cuales aproximadamente el 50% se encuentra en América Latina (Kapos, Rhind, Edwards, Price, & Ravilious, 2000), cuyos valores de diversidad biológicas son considerados, la mayoría de origen andino, lo cual evidencia un extraordinario aporte de la orogenia andina al desarrollo de la diversidad neotropical (Van der Hammen & Hooghiemstra, 2001).

1.2.1. Bosques nublados de Ecuador

En el Ecuador, los bosques nublados se encuentran ubicados en las laderas de las zonas montañosas, a ambos lados de la cordillera andina (Villamarín & Mena, 2009). Según Valencia *et al.* (1999), estos ecosistemas pertenecen a la formación vegetal de Bosque de neblina montano ubicada entre los 1800 y 3000 m de altitud. Datos reportados por

Brown & Kappelle (2001) manifiestan que el Ecuador posee una superficie total de bosques nublados de 11'200000 ha, sin embargo, tan solo 1'448700 ha corresponden a superficies protegidas. Es por esta razón que estudios que impulsen al desarrollo de estrategias de conservación de la biodiversidad presente en estos bosques, son primordiales.

En cuanto a la dinámica ecológica en estos ecosistemas, Brown & Kappelle (2001) mencionan que interacciones planta-animal vinculados a procesos de polinización en los bosques nublados, son poco explorados. Sin embargo, datos reportados en México establecen que aproximadamente el 75 % de especies vegetales son polinizadas por animales, principalmente insectos. En este sentido, información proporcionada por Roy B. & Troya A (com. pers., 2016), quienes se encuentran haciendo estudios en bosques nublados del Noroccidente de Ecuador, manifiestan que una gran proporción de insectos, particularmente del orden díptera, se encuentran asociados a las orquídeas del sector, lo cual sugiere que los dípteros cumplen un papel muy importante en la polinización de orquídeas en los bosques nublados andinos.

1.2.1.1. Flora

Los bosques nublados comprenden vegetación arbórea con alturas entre 20 y 25 m, en su mayoría cubiertos por abundantes epífitas, principalmente musgos, que mantienen una gran cantidad de humedad, debido a la condensación de las masas de aire húmedo en sus estructuras (Villamarín & Mena, 2009); además existe una amplia proporción de especies de la familia Orchidaceae (Suárez, *et al.*, 2006). Datos obtenidos de inventarios realizados en los alrededores del río Cayapas, Noroccidente de Ecuador, reportan la presencia de una mayor proporción de plantas esciófitas (tolerantes a la

sombra) que heliófitas (plantas que requieren luz para crecer) (Palacios & Jaramillo, 2004). Los bosques del Noroccidente de Ecuador son considerados entre los más diversos del mundo, esto basado en registros de alrededor de 1300 especies de plantas vasculares, pertenecientes a 136 familias, en menos de 1 km² en el centro científico Río Palenque (Dodson & Gentry, 1978). Se estima que alrededor del 20% de la flora del occidente de Ecuador es endémica de esa región (Gentry, 1982).

1.2.1.2. Fauna

La topografía de este ecosistema ha permitido el mantenimiento de especies amenazadas como el oso de anteojos, característico de la zona andina; además existe un alto grado de endemismo de pequeños vertebrados, entre los más frecuentes se encuentran: murciélagos de listas blancas, ratones alto andinos y ranas terrestres (Villamarín & Mena, 2009), siendo particularmente en el grupo de los anfibios, uno de los países con mayor diversidad en el mundo junto con Colombia y Brasil (Brown & Kappelle, 2001). Estudios recientes, resaltan además la presencia de una cierta diversidad de reptiles en bosques húmedos del occidente de Ecuador (Hamilton, Mouette, & Almendáriz, 2014). Mientras que, con respecto al grupo de las aves, Navarrete (2010) menciona alrededor de 46 aves endémicas de las estribaciones noroccidentales de los Andes del Ecuador. En cuanto a los insectos, Brown & Kappelle (2001) manifiestan que estos organismos representan uno de los grupos con mayor riqueza biológica en los bosques nublados y por lo general poco estudiados. En este sentido son pocos los estudios relacionados a la fauna del orden Díptera presente en los bosques nublados, sin embargo, una de las familias a las que más se ha prestado atención es Drosophilidae, encontrándose en recientes estudios 13 nuevas especies registradas en bosques nublados de Intillacta y Guajalito (Cabezas, 2012).

1.2.2. Amenazas que enfrentan los bosques nublados

Brown & Kappelle (2001) mencionan que la situación actual en general de los bosques nublados es sumamente crítica ya que se han convertido en uno de los sistemas que se están transformando con mayor rapidez últimamente, esto debido principalmente a problemas político-económicos que llevan a muchos de los pobladores a colonizar áreas vírgenes en busca de un sustento a través de la explotación indiscriminada de recursos, intensificando cada vez más los procesos de degradación. Dodson & Gentry (1991) señalan que en el Ecuador, los bosques nublados han desaparecido completamente del Valle Central, quedando solo el 4% de los que ocupaban la vertiente occidental. Por su parte, Sarmiento (2001) explica que los causantes de los procesos de sabanización y deforestación en estos ecosistemas, se atribuyen a la sustitución de los paisajes de bosques por potreros, campos de cultivo y plantaciones con especies exóticas.

Estos procesos de degradación son tan intensos, siendo así que especies de los bosques nublados como los monos araña (género *Ateles*), la danta centroamericana (*Tapirus bairdii*), el tapir sudamericano (*Tapirus terrestris*), el oso de anteojos andino (*Tremarctos ornatus*) y el tigre (*Felis onca*) están desapareciendo a un ritmo alarmante y con ello también la capacidad de dispersión de muchas especies de plantas (Young, 1990; Varela & Brown, 1995).

En cuanto a esfuerzos por tratar de frenar esta constante pérdida de biodiversidad Brown & Kappelle (2001), recalcan la importancia en la generación de conocimiento de manera que se puedan impulsar y/o elaborar planes regionales de conservación y desarrollo asociadas a la preservación de la biodiversidad.

1.3. Dípteros: Familia Phoridae

1.3.1. Aspectos generales

Los Phoridae, o fóridos, se los conoce vulgarmente también con el nombre de moscas jorobadas o moscas escudo (Disney, 1994; Brown B. V., 2010), su nombre deriva del latín *Phora* que significa movimientos rápidos, destacando así la principal característica de estas moscas, que es su rápida huida. Esta familia presenta una larga historia evolutiva, por lo que conocimientos detallados de estos dípteros son importantes en estudios de evolución (Disney, 1994).

La familia Phoridae muestra una amplia distribución mundial (cosmopolita), existiendo una mayor diversidad de especies en la región Neotropical que en la región Neártica (Brown & Feener, 1995). En este sentido, Brown (2004) menciona que una de las regiones poco estudiadas, es la región Neotropical, donde las 1000 especies descritas en investigaciones anteriores, representan quizás sólo del 10 al 20 % del total real. Disney (1994), especialista en el estudio de los fóridos, menciona que estos dípteros se encuentran entre las familias biológicamente más diversas de insectos, y que además presentan una amplia variedad de hábitos larvarios, habiendo especies saprófagas, herbívoras, carroñeras, fungívoras, depredadores, parásitas y parasitoides.

Los fóridos adultos presentan una alimentación variada, obtienen sus alimentos de las secreciones azucaradas que producen otros insectos, del néctar y polen de las flores, de levaduras, de esporas y de fluidos de carroña (Disney, 1994; Fadamiro & Chen, 2005), incluso también de fluidos que segregan otros insectos o parasitando a los mismos, tales como las hormigas (Brown & Feener, 1991; Uribe, 2013), abejas

(Nogueira, 1997; Uribe, Idárraga J. J., & Idárraga H. R., 2015), termitas (Disney, Neoh, & Lee, 2009), escarabajos (Disney, Zvereva, & Mostovski, 2001), entre otros.

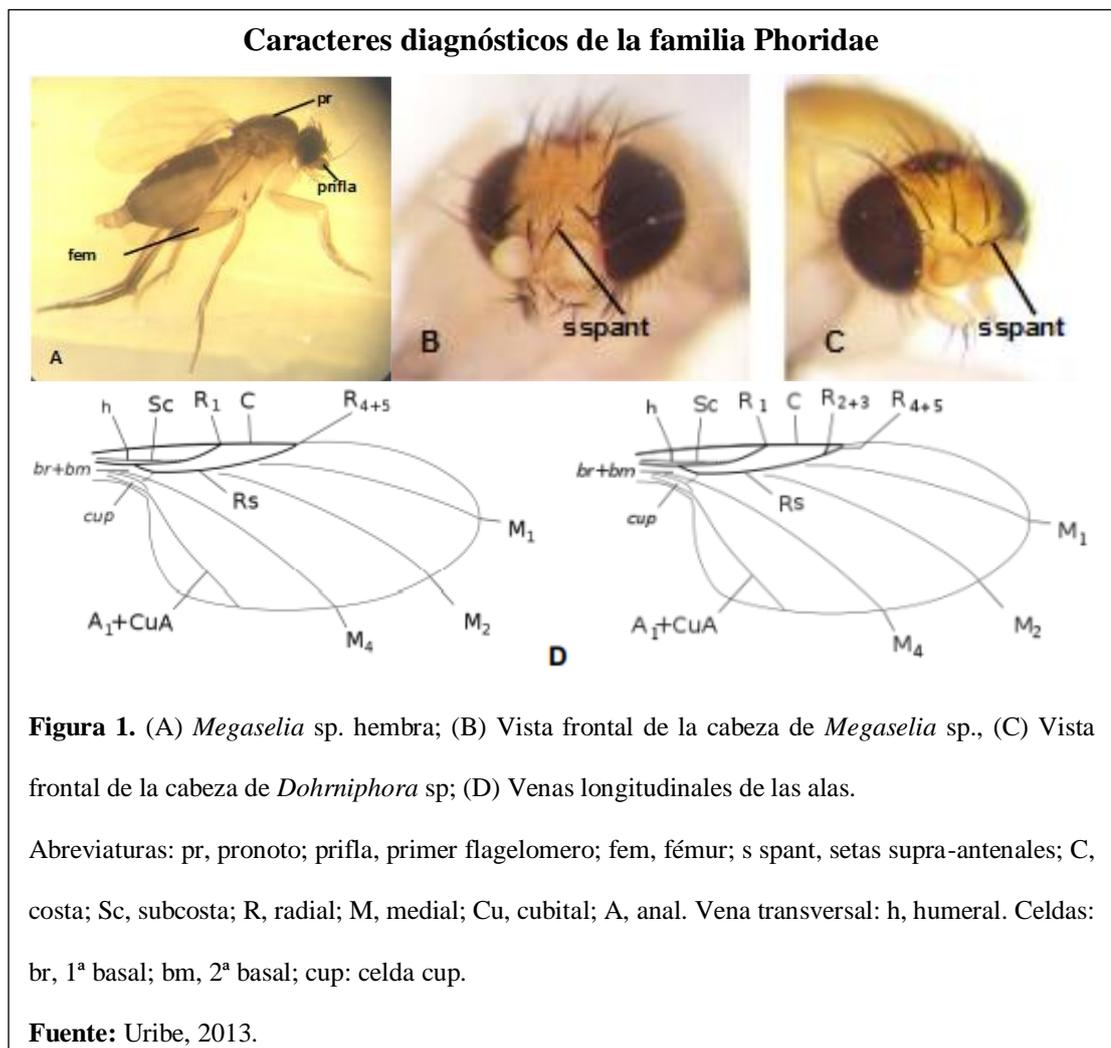
1.3.2. Características morfológicas

Ament & Brown (2016) mencionan que los fóridos comprenden moscas pequeñas, cuyo tamaño varía entre 0.5 – 4 mm, y que por lo general están provistas de varias setas en muchas de sus estructuras. A menudo, sus especies son de colores oscuros, pudiendo ir desde el negro hasta el blanco, aunque también pueden presentar colores llamativos como el amarillo y el naranja (Disney, 1994).

Carles-Tolrá (2007) en base a los caracteres diagnósticos de esta familia, manifiesta que estos dípteros se reconocen muy fácilmente por las alas, al presentar la vena costal y las venas radiales juntas y muy cortas, de esta manera no llegan a sobrepasar los dos tercios de las alas, pudiendo incluso ser más cortas. Las cuatro venas restantes en contraste a las anteriores son más débiles y además las venas transversales son completamente ausentes. Otra característica de esta familia es que las setas más grandes pueden llegar a ser plumosas, en especial las que se encuentran en las patas y en la cabeza (Disney, 1998).

Otras características morfológicas y de diagnóstico de la familia Phoridae son las siguientes: la cabeza presenta por lo general 12 setas frontales, distribuidas en tres filas horizontales, cada fila con 4 setas; a menudo presentan uno o más pares de setas supra-antenas; las antenas están constituidas por tres segmentos, de las cuales el tercer segmento (primer flagelómero o postpedicelo) oculta usualmente al segundo segmento (pedicelo); el tórax presenta un prominente pronoto, dándoles el aspecto de moscas

jorobadas; el escutelo generalmente presenta dos pares de setas, las posteriores más grandes que las anteriores; poseen fémures traseros bien desarrollados y aplanados lateralmente; las tibias normalmente muestran largas setas, la mayoría de géneros presenta al menos una fila de setas empalizadas; las hembras presentan el abdomen dividido en 10 segmentos, los 6 primeros pueden reducirse de número y tamaño, mientras que el ovopositor se forma a partir de los segmentos 7 al 10; en los machos se ausentan los segmentos 7 y 8, a continuación del segmento 6 sigue el hipopigidio que es el segmento 9 modificado en el segmento genital, y el 10 que es el segmento anal (Disney, 1994; Brown, B. V., 2010; Ament & Brown, 2016). En las figuras 1 y 2 se presentan los caracteres diagnósticos en la familia Phoridae, y las diferencias entre macho y hembra en cuanto a los segmentos terminales, respectivamente.



Diferencias entre macho y hembra en los segmentos terminales



Figura 2. (A) *Dohrniphora* sp. hembra; (B) *Coniceromyia* sp. hembra; (C) *Dohrniphora* sp. macho. Abreviaturas: ovi, ovipositor; hipo, hipopigidio.

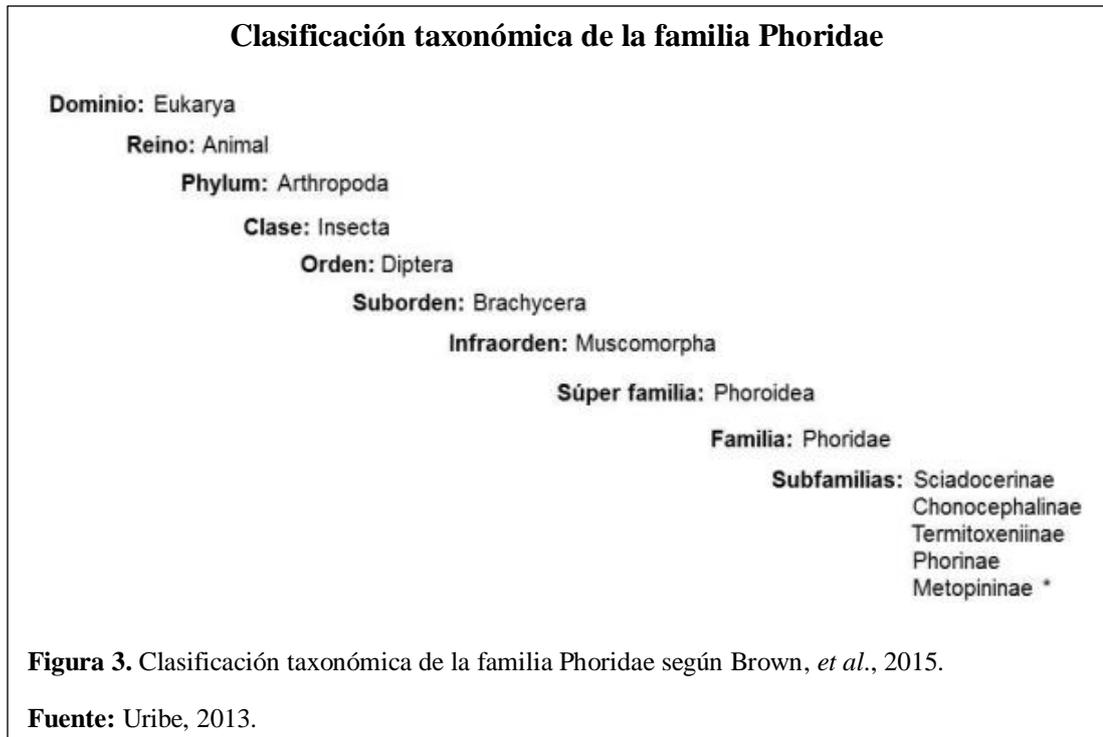
Fuente: Uribe, 2013.

1.3.3. Clasificación taxonómica

La familia Phoridae pertenece al orden Diptera y son clasificadas como base del grupo de las Cyclorrhapha, presentándose como grupo hermano de la familia Ironomyiidae, y con varias relaciones con Lonchopteridae, Platypezidae, y Opetiidae (Brown, B. V., 2010; Wiegmann, *et al.*, 2011). El número de especies descritas hasta el momento sobrepasa los 4000, según estimaciones de Disney (1994) la verdadera riqueza de esta familia podría oscilar entre 20000 a 50000 especies.

La clasificación intrafamiliar de Phoridae se ha encontrado susceptible de varias discusiones, sin embargo, una de las clasificaciones más acertadas recientemente, es la propuesta por Brown, Amorim, & Kung (2015), quienes proponen 5 subfamilias perteneciente a Phoridae (Figura 3), de las cuales Chonocephalinae es propuesta como

una nueva subfamilia, puesto que se presenta como un grupo hermano de las subfamilias restantes.



Dentro de la subfamilia Metopininae existen dos géneros problemáticos, *Megaselia* y *Metopina-group*, de los cuales *Megaselia* representa el grupo más grande y diverso de la familia Phoridae, ocupando casi la mitad de las especies descritas, sin embargo, muchas de los individuos de este género resultan difíciles de determinar haciendo que muchas claves taxonómicas pierdan su validez, además de que algunos autores plantean la posibilidad de que *Megaselia* constituya un grupo parafilético (Brown B. V., 2010). Investigaciones recientes sobre *Megaselia* por parte de Hartop & Brown (2014), mencionan de igual manera la escasez de recursos taxonómicos actualmente disponibles que permitan la identificación de cientos de especies de *Megaselia* desconocidas, proponiendo así métodos de descripción simplificados para taxones difíciles de tratar.

1.3.4. Importancia ecológica

Phoridae se constituye como una familia biológicamente diversa y con una larga historia evolutiva, mostrando un gran número de especies, así como también una variedad de hábitos de vida tanto en fase larvaria como adulta; Disney (1994) los considera dignos de estudio, ya que características como estas les permite estar presentes en una variedad de ecosistemas, desempeñando funciones importantes que abren la posibilidad de usar estos organismos para fines como: polinizadores de plantas, tales como especies de orquídeas del género *Pleurothallis* (Borba & Semir, 2001) y del género *Acianthera* (Melo, Taucce, & Borba, 2011), ambas polinizadas por *Megaselia* spp.; en entomología forense, debido a su papel determinante en la descomposición de materia orgánica muerta, donde la especie más estudiada es *Megaselia scalaris* (Reibe & Madea, 2010), trabajos recientes reportan además a especies como *Dohrniphora cornuta* asociados a cadáveres humanos (Disney, García, Lindström, & Manlove, 2014); en el control biológico de plagas, ya que muchas de las larvas de un considerable número de especies son parasitoides o depredadores especializados (Disney, 1994), un ejemplo de ello son los fóridos *Pseudacteon* spp. los cuales ayudan al control biológico de *Solenopsis invicta*, una especie de hormigas introducida que representa una amenaza ecológica y económicamente significativa para los sistemas que invade (Puckett & Harris, 2010); y también son usados como indicadores del estado de conservación de hábitat terrestres, debido a su riqueza y diversidad biológica (Durska, 2013; García, 2014).

Por otro lado, Disney (1994) también describe aspectos negativos, siendo uno de ellos la conformación de plagas como el caso de *Megaselia halterata* que afectan a cultivos de champiñones, alimentándose del micelio del hongo cuando la mosca se encuentra

en su etapa larvaria (Navarro, Escudero, Ferragut, López-Lorrio, & Gea, 2001), se ha encontrado también a larvas de *Megaselia scalaris* infestando plátanos maduros, lo cual representa un peligro para la salud humana por el consumo de este alimento (Karunaweera, Ithalamulla, & Kumarasinghe, 2014); los fóridos pueden también provocar efectos indirectos en el control biológico de plagas, en este sentido Pardee & Philpott (2011) mencionan que *Pseudacteon* spp. afecta negativamente a la capacidad de las hormigas *Azteca instabilis* para limitar los ataques del barrenador del café (*Hypothenemus hampei*); y también se encuentran involucradas en algunos casos de miasis tanto en el hombre como en animales, siendo las especies más comunes *Megaselia scalaris* y *Dohrniphora cornuta* (Brown B. V., 2010).

1.4. Técnicas de análisis de ADN en sistemática molecular

Tal y como menciona Lanteri, Loiácono, & Margaría (2002), en los últimos veinte años han surgido una serie de cambios importantes dentro de los avances en las ciencias biológicas, permitiendo resolver una serie de problemas a través de la aplicación de técnicas moleculares del ADN. La aplicación de este tipo de técnicas asociadas con los conocimientos filogenéticos ha tenido gran impacto en las clasificaciones biológicas, interpretación de procesos evolutivos, estudio de vías de dispersión (filogeografía) y la estimación de edades geológicas mediante relojes moleculares (Avice, 1994).

1.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica permite amplificar selectivamente fragmentos pequeños de ADN a partir de cantidades pequeñas de tejidos frescos, conservados, congelados e incluso de

material fósil, contribuyendo de esta manera en varios estudios de sistemática molecular (Palumbi, 1996). De acuerdo al gen a amplificarse (sea este nuclear, mitocondrial, o de otro organelo) es posible realizar un análisis comparativo del mismo a lo largo de la evolución, permitiendo así la comparación entre individuos muy distantes filogenéticamente y de esta manera poderlos caracterizar molecularmente (López, 2004). Para el análisis comparativo de secuencias moleculares, es conveniente elegir entre una o más moléculas, según el problema que se plantee, siendo así que genes o regiones muy conservadas y de gran tamaño se utilizan para resolver parentescos lejanos (reinos, filos, clases u órdenes); genes o regiones moderadamente conservados para resolver parentescos en los niveles medios de la jerarquía (orden, familia, género); y las regiones variables y/o regiones no codificadoras (espaciadores, intrones) son útiles para resolver parentescos cercanos (géneros, especies, variedades) (Moreno, 2005). En cuanto a las secuencias de ADN propuestas para investigaciones filogenéticas de dípteros, Gibson *et al.* (2011) proponen varias regiones de genes mitocondriales y nucleares, entre ellas: subunidad ribosómica pequeña (12S), citocromo b (Cytb), subunidad I de citocromo oxidasa (CO1), ARN ribosómico (28S), alanil-ARNt sintetasa (AATS), carbamil fosfato sintasa de CAD (CAD), factor de elongación-1 α (EF-1 α), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGD), triosa fosfato isomerasa (TPI), *white* y *wingless*.

Varias técnicas moleculares basadas en PCR han sido utilizadas en los últimos años tanto en áreas de la sistemática, como en estudios de genética de poblaciones, entre ellas se encuentran: RFLP (análisis de polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción) y RAPD (análisis al azar de polimorfismos del ADN), huellas digitales

del ADN y secuenciación del ADN mitocondrial (Lanteri, *et al.*, 2002; Álvarez, Menalled, & Hoy, 2005).

1.4.2. Códigos de barras de ADN

El término código de barras del ADN (*DNA barcode*) fue adoptado por Hebert, Ratnasingham, & Waard (2003), con la pretensión de generar un inventario de secuencias de ADN de todos los animales y de esta manera poder utilizarlo para gestionar la biodiversidad e identificar cualquier taxón. Según los autores, como las secuencias de ADN son específicas para cada especie, estas podrían utilizarse como código de barras genéticos. En teoría, la presencia de cuatro bases nitrogenadas (A, T, C, G) en cada una de las cadenas del ADN, indican la existencia de 4^n códigos posibles para cualquier secuencia de n nucleótidos de largo, a partir de los cuales se podrían conformar bases de datos que consecuentemente pueden corroborar a la identificación de un gran número de taxones (Labarque, 2012).

Por tanto, los códigos de barras moleculares se consideran como una secuencia corta de ADN, de una localidad uniforme del genoma, usada para identificar especies. La región de gen propuesta como Barcode estándar para la mayoría de grupos de animales, es una región de 648 pares de base del gen mitocondrial citocromo c oxidasa sub unidad 1 (*COI*), cuya efectividad ha sido demostrada en varios trabajos de identificación de aves, peces, mariposas, moscas, entre otros (Barcode of life, 2017). La selección del *COI* como barcode estándar presenta las siguientes ventajas: posee una elevada tasa de sustitución nucleotídica que le proporciona una buena señal filogenética a nivel intra e interespecífico; al ser un gen mitocondrial codificador de proteínas, las inserciones o deleciones son raras, evitando así errores en el marco de

lectura que compliquen la homología entre los nucleótidos; existen cebadores (*primers*) universales muy robustos para *COI* que permitirían secuenciar a la mayoría de los animales (Hebert, Ratnasingham, & Waard, 2003).

Para la validación y estandarización de esta técnica, son necesarios los análisis de divergencia tanto intraespecíficas (entre individuos de la misma especie) como interespecíficas (entre especies), de tal manera que ambos valores de distancias no se superpongan, es decir que el valor máximo de las distancias intraespecíficas se encuentre por debajo del valor mínimo de las distancias interespecíficas (Meyer & Paulay, 2005; Roe & Sperling, 2007). Además, son indispensables también en la validación, métodos de agrupamiento (*neighbor-joining*) y de reconstrucción filogenética (máxima verosimilitud e inferencia bayesiana), de tal manera que se puedan evaluar monofilias específicas obtenidas con datos de esta naturaleza (Solano, Wolff, & Castro, 2013). Los proponentes de los códigos de barras moleculares propusieron que una divergencia nucleotídica entre secuencias superior al 2 % indica la posible presencia de especies distintas (Lanteri, 2007).

En el 2007, Ratnasingham y Hebert formalizan el sistema de identificación y delimitación de especies mediante código de barras como *The Barcode of Life Data System* (BOLD), la cual es una plataforma bioinformática que brinda ayuda en la adquisición, almacenamiento, análisis y publicación de registros de códigos de barras de ADN. Además, presta servicios como repositorio de los datos de los especímenes (taxonómicos, moleculares, geográficos); gestiona, lleva el control de calidad; y es un vehículo de comunicación entre científicos (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Capítulo 2

Marco metodológico

2.1. Especímenes y localización geográfica del estudio



Los Phoridae empleados en el estudio fueron recolectados por Fabián Bersosa, docente investigador de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS) y Adrián Troya, investigador del Instituto de Ciencias Biológicas de la Escuela Politécnica Nacional (ICB-EPN) como parte del proyecto “Biodiversidad, barcoding y filogenia molecular de las moscas que visitan orquídeas en los bosques nublados del noroccidente de Ecuador”. Para ello se utilizaron trampas Malaise en conjunto con trampas adhesivas de color amarillo y azul, y posteriormente se preservaron los individuos en alcohol al 95 %. Todos los especímenes se encuentran depositados en la Colección del Museo de

la Escuela Politécnica Nacional (MEPN), y la información referente a los sitios de recolección (Figura 4) y sus coordenadas geográficas se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1.

Sitios específicos en donde se hizo la recolección de especímenes.

Provincia	Localidad general	Localidad específica	Grados latitudinales	Grados longitudinales	Altitud (msnm)	Código
Imbabura	Los Cedros	Sendero Inca	00°19'10"N	78°47'06"W	1614	LCI
Imbabura	Los Cedros	Sendero Oso	00°18'49"N	78°46'40"W	1857	LC0
Imbabura	Los Cedros	Sendero del Río	00°18'07"N	78°46'53"W	1254	LCR
Pichincha	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Principal	00°07'4"N	78°38'10"W	1283	MPP
Pichincha	Maquipucuna-Pahuma	Maquipucuna Sur	00°02'3"N	78°37'59"W	1481	MPS
Pichincha	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos	00°00'55"N	78°38'17"W	2008	MPOA
Pichincha	Mindo	Río Bravo, Estación 1	00°04'56"S	78°43'55"W	1736	RB1
Pichincha	Mindo	Río Bravo, Estación 2	00°04'56"S	78°43'49"W	1861	RB2
Pichincha	Mindo	Río Bravo, Estación 3	00°04'41"S	78°43'55"W	1469	RB3

Nota: Los permisos de investigación se obtuvieron bajo los siguientes registros: para Pichincha N° 18-2014-IC-FAU-DPAP-MAE de Agosto 2014; y para Imbabura N° 15-2014-0987-1049-IC-FAU-FLO-DPAI-MAE de Diciembre 2014, amparados bajo el contrato marco Nro. MAE-DNB-CM-2016-0047.

Elaborado por: El autor, 2017.

Fuente: Troya & Bersosa, en preparación.

2.2. Análisis morfológico

La identificación taxonómica de los especímenes se realizó en la Sección de Entomología del ICB-EPN; para ello se analizaron un total de 200 individuos, mismos que se encontraban montados en seco y preservados en etanol al 95 %. Primero se identificaron los individuos a nivel de género, siguiendo las claves taxonómicas de Brown B.V. (2010), además del uso de fotografías digitales de la plataforma Phorid.net

(Brown B. V., 2017); y segundo, se clasificó a nivel de morfoespecie, tomando algunos de los caracteres morfológicos detallados en García (2014), y Disney (1994).

La observación de los caracteres de cada uno de los ejemplares recolectados se la realizó mediante el uso de un estéreo-microscopio Olympus SD-STB3 con un aumento de hasta 100 x. En el caso de especímenes en mal estado, por ejemplo, con presencia de polvo o sin partes del cuerpo, así como también de tamaño reducido, se utilizó un estéreo-microscopio Olympus SZX16 con un aumento de hasta 230 x, el cuál fue facilitado por el Departamento de Metalurgia Extractiva de la Escuela Politécnica Nacional (DEMEX), para observar aquellas estructuras difíciles de determinar.

De cada espécimen se tomaron fotografías en vista dorsal, frontal y lateral. A fin de complementar la identificación taxonómica, se tomaron medidas de algunos de los caracteres que presentaron mayor variación morfológica (**Tabla 2**) en base a lo sugerido por Häggqvist, Ulefors, & Ronquist (2015). Adicionalmente a las medidas tomadas, se elaboró una matriz de caracteres morfológicos, misma que se analizó mediante el programa TNT, el cual permite analizar grandes conjuntos de datos para la identificación eficaz de taxones (Goloboff, Farris, & Nixon, 2008). Cada caracter morfológico fue definido en función de la literatura propuesta por Brown B.V. (2010) y Disney (1994). En la medida de lo posible, se incluyeron mayormente caracteres derivados compartidos (sinapomorfías) (Brown, Amorim, & Kung, 2015), aunque también existieron caracteres únicos a cada especie (autopomorfías), esto con el fin de que los datos en conjunto reflejen una historia evolutiva. Posteriormente, estos caracteres fueron codificados de acuerdo a las variaciones (estados de caracter) que presentó cada uno en todos los especímenes observados; por ejemplo, en el caracter

“Nº de setas supra-antenas” se observaron dos estados, un par de setas supra-antenas (0) y dos pares de setas supra-antenas (1) (ver Anexo 1).

Tabla 2.

Caracteres morfológicos de individuos de Phoridae medidos en micrómetros (µm). Ver detalles de su ubicación en el Anexo 2.

Región del cuerpo	Carácter morfológico (µm)
Cuerpo	Longitud total del individuo
Cabeza	Longitud entre setas inter-frontales y setas fronto-orbitales
	Longitud entre setas pre-ocelares y supra-antenas
Tórax	Diámetro del espiráculo anterior
Alas	Altura de la horquilla formada por R ₂₊₃ y R ₄₊₅
	Tamaño entre sección S ₁ y S _{2-S3}
	Tamaño de la vena costal

Elaborado por: El autor, 2017.

2.3. Análisis molecular

Un total de 63 especímenes preservados en alcohol al 95 % y previamente identificados en base a su morfología, fueron empleados en el análisis molecular. Los datos referentes al sitio de recolección, género, morfoespecie, y codificación, se detallan el Anexo 3.

Entre las muestras seleccionadas, se incluyó tanto especies en buen estado (cuerpo completo), como especies en mal estado (cuerpo fragmentado) resultantes de la manipulación durante la recolección e identificación morfológica. Cada espécimen se colocó en microtubos de 1.5 µl con etanol absoluto para su preservación (Brown & Smith, 2010; Wells & Sperling, 2001), y se los llevó posteriormente al Laboratorio de

Biología Molecular del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) en donde se ejecutaron los análisis que se indican a continuación.

2.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir del cuerpo entero y/o fragmentos de cada espécimen, para ello se utilizó el Kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, 2006), siguiendo los protocolos establecidos por el fabricante, con variaciones (Anexo 4).

Como paso previo, se procedió a secar cada uno de los individuos en papel absorbente, procurando así descartar el etanol presente durante su preservación, para después transferirlo a nuevos microtubos de 1.5 µl. Se agregó 80 µl del buffer de lisis a cada muestra, y se trituró con un pistilo, previamente autoclavado, hasta que todo el individuo quede completamente desintegrado; se añadió 1 µl de proteinasa K, y se mezcló durante 15 segundos, mediante un vórtex.

Se incubó la muestra a 57 °C durante 2 horas, se agregó 35 µl de la solución de precipitación de proteínas y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo de 1.5 µl y se añadió 100 µl de isopropanol para la precipitación del ADN, mezclando la solución por inversión; se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. Después se descartó todo el líquido, se procedió al lavado añadiendo 100 µl de etanol al 70 % y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Finalmente se descartó el etanol, y se resuspendió el ADN con 15 µl de agua milli q (ultra pura). Las muestras de ADN obtenidas fueron almacenadas a 4 °C, para posteriormente medir su concentración (ng/µl), calidad y pureza por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 1000.

2.3.2. Amplificación

Las muestras de ADN de los especímenes con una concentración superior a 2 ng/μl fueron empleados para la amplificación de una región del gen mitocondrial *COI*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores universales detallados en la **Tabla 3**.

Tabla 3.

Cebadores universales utilizados para la amplificación de una región del gen *COI*.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Posición 3´	Referencia
LCO1490 (F)	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	1514	Folmer <i>et al.</i> , (1994)
HCO2198 (R)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	2173	
C1-J-1632 (F)	TGATCAAATTTATAAT	1632	Kambhampati & Smith (1995)
C1-N-2191 (R)	CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC	2191	

Nota: Dirección de los cebadores: F, Forward; R, Reverse.

Elaborado por: El autor, 2017.

Fuente: Gibson *et al.*, 2011.

Para las reacciones de PCR se utilizó de 1-2 μl de ADN por cada 25 μl de reacción, la cual a su vez contuvo las siguientes concentraciones finales de cada reactivo: 1x de Buffer PCR, 3 mM de MgCl₂, 0.2 Mm de dNTP's, 0.2 μM de cada primer, 0.05 U/μl de Taq polimerasa y agua grado PCR para un volumen final de 25 μl. Los volúmenes y concentraciones iniciales de cada reactivo se detallan en el Anexo 5.

Los ciclos de PCR se realizaron de acuerdo al protocolo planteado por Boehme, Amendt, & Disney (2010) modificado, con una temperatura inicial de desnaturalización de 94 °C por 4 minutos, seguido de 34 ciclos con las siguientes condiciones: 94 °C por 1 minuto, 47.5 – 48.5 °C por 1 minuto y 72 °C por un minuto.

Seguidamente, se llevó a cabo una extensión final a 72 °C por 10 minutos y mantenimiento a 4 °C.

Los resultados de la amplificación fueron comprobados por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % teñido con syber safe, obteniéndose así regiones amplificadas del gen *COI* de los especímenes empleados en el estudio. Los amplicones obtenidos se los almacenó a -20 °C.

2.3.3. Obtención de secuencias y análisis

Previo a la secuenciación de los amplicones obtenidos, se procedió a purificar los mismos con enzimas fosfatasas y exonucleasa, siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante para el uso de ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, 2017), con el fin de digerir los cebadores y dNTP's libres que puedan interferir en los resultados de la secuenciación. Los productos de purificación fueron correctamente almacenados en placas para su posterior envío a los laboratorios de la compañía Eurofins MWG Operon (Estados Unidos), donde se secuenciaron por el método Sanger tradicional.

Los amplicones secuenciados fueron posteriormente editados mediante el programa Geneious v 9.1 (Kearse, *et al.*, 2012), procurando eliminar la presencia de ruido generado en los extremos de cada cromatograma. Después, se procedió a ensamblar las secuencias Forward y Reverse de cada muestra, con la finalidad de analizar los picos correspondientes a cada nucleótido, y descartar así falsos polimorfismos generados por los porcentajes de fidelidad de la polimerasa o problemas en el método de secuenciación (Márquez, Serrato, & Cerritos, 2011). Las secuencias consenso generadas, se verificaron que sean correspondientes a la familia Phoridae mediante la

herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, tomando en cuenta el porcentaje de cobertura, identidad y valor E de las secuencias.

El alineamiento de las secuencias, se lo realizó en el programa MEGA 6 (Tamura, *et al.*, 2013) utilizando el algoritmo Clustal W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994), el cual realiza un alineamiento múltiple de secuencias de tipo progresivo, que consiste en la selección y alineación de un solo par de secuencias, en la que a partir de la misma se van agregando y alineando las demás secuencias de forma progresiva (Oliveira, 2007). El alineamiento múltiple de secuencias es un paso necesario para obtener una hipótesis de homología posicional que permite realizar comparaciones entre las secuencias (Romero & Ramírez, 2011). El cálculo de distancias genéticas, para los análisis de divergencia intra e interespecífica (las intraespecíficas se realizaron únicamente con las especies que presentaron más de una secuencia), se lo realizó también en el programa MEGA 6, tomando en cuenta todas las secuencias consenso obtenidas y alineadas previamente; el modelo de distancia elegido fue el de máxima probabilidad compuesta (Tamura, Nei, & Kumar, 2004), mismo que consiste en un modelo de estimación simultánea que permite un cálculo más preciso de las distancias, reduciendo considerablemente los errores estadísticos; mientras que el método de estimación de la varianza fue el de Bootstrap con un número de 1000 réplicas.

Para la construcción de los árboles filogenéticos se realizó el análisis de máxima verosimilitud (ML), método que dado una topología y modelo de sustitución, calcula la probabilidad de cada árbol seleccionando el que presenta la máxima verosimilitud (Lió & Goldman, 1998). Este método se realizó en el programa MEGA 6, y el modelo de sustitución usado fue GTR (General Time Reversible) (Tavaré & Miura, 1986)

modelado por una distribución gama (+G) más sitios invariantes (+I), este modelo considera 6 parámetros diferentes como tasa de sustitución (A por C, A por G, A por T, C por G, C por T y G por T). Además, se realizó el análisis mediante inferencia bayesiana, que a diferencia del análisis con máxima verosimilitud, estima la posibilidad de que tan bien los árboles filogenéticos son explicados dados los datos, a través del cálculo de probabilidades posteriores basadas en el Teorema de Bayes (Huelsenbeck, Ronquist, Nielsen, & Bollback, 2001). Los modelos de evolución fueron definidos mediante partición por codones, a través del programa PartitionFinder v 2.1.1 (Lanfear, *et al.*, 2016), el cuál selecciona el mejor modelo evolutivo basándose en tres criterios: el valor del logaritmo de verosimilitud, el valor estadístico BIC (bayesian information criterion) y el número de parámetros para cada modelo, seleccionando así el modelo/s que presentan un logaritmo de verosimilitud grande, el BIC más pequeño y el menor número de parámetros. Una vez definidos los modelos evolutivos, se procedió a realizar los análisis mediante inferencia bayesiana en el programa Beast v 2.4.5 (Bouckaert, *et al.*, 2014), utilizando el método de las cadenas Markov-Monte Carlo con cuatro cadenas por 50 y 600 millones de generaciones.

En ambos análisis filogenéticos, se designó como grupo externo a las especies *Trichophthalma punctata* (Macquart, 1846) y *Agathomyia viduella* (Zetterstedt, 1838) pertenecientes a las familias Nemestrinidae y Platypezidae, respectivamente. La selección de estas especies como grupos externos, se basó en los estudios propuestos por Brown, Amorim, & Kung (2015) y Wiegmann *et al.* (2011). Además para el análisis en conjunto, se utilizaron secuencias descargadas de Bold System y del Genbank (Anexo 6), procurando que las mismas sean de fuentes confiables (publicadas).

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Análisis morfológico de géneros y morfoespecies de Phoridae

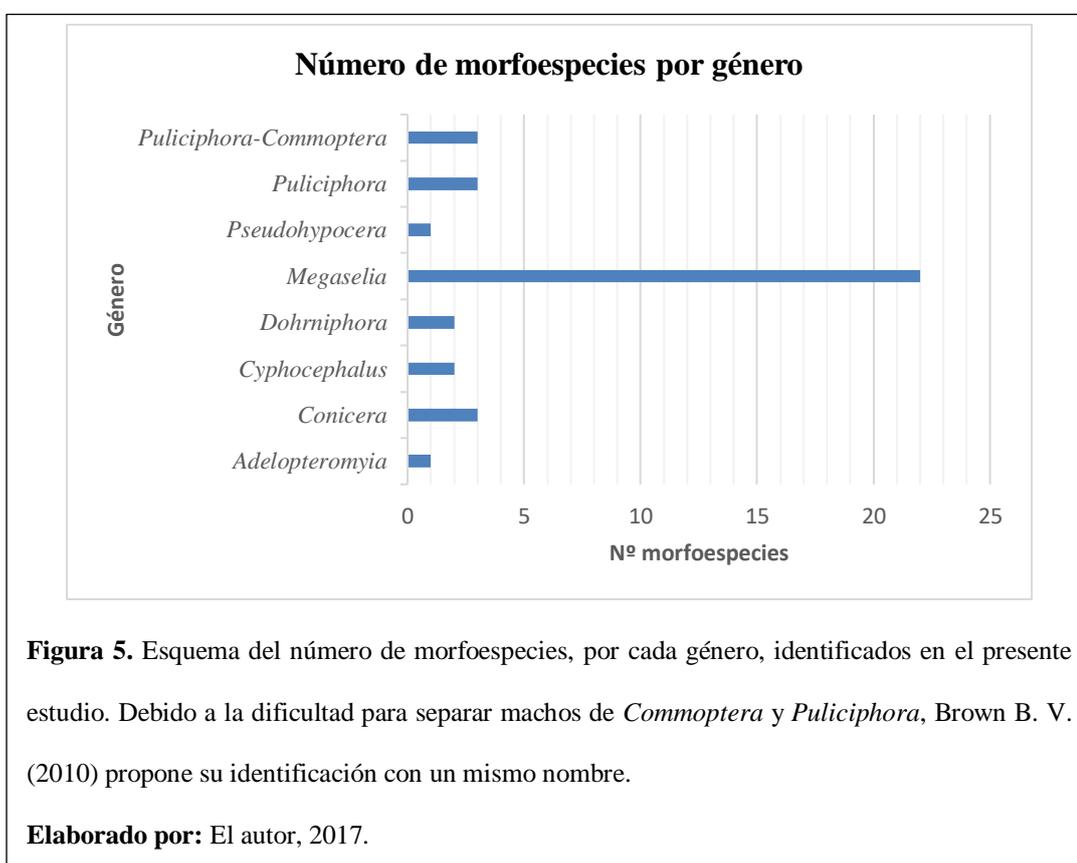
En el presente estudio se identificaron 8 géneros y 37 morfoespecies pertenecientes a las siguientes subfamilias: Metopininae, Phorinae y Chonocephalinae. Resultados similares se señalan en catálogos de Phoridae realizados recientemente en la región neotropical de Colombia, en donde se identificaron 19 géneros distribuidos en las subfamilias antes mencionadas (Ament & Brown, 2016), indicándose así la amplia diversidad y distribución de estos grupos en la región neotropical.

La subfamilia Metopininae fue la más abundante, reportándose un amplio número de individuos distribuidos en los siguientes géneros: *Adelopteromyia* Schmitz, 1923., *Megaselia* Rondani, 1856., *Pseudohypocera* Malloch, 1912., *Puliciphora* Dahl, 1897., y *Puliciphora* Dahl, 1897-*Commoptera* Brues, 1901. El género *Megaselia* es aquel que presentó una mayor variedad de morfoespecies (22 en total) en comparación al resto (Figura 5), siendo *Megaselia* MEPN 10 la morfoespecie más abundante del grupo (n=14) (Figura 6), evidenciándose así la amplia diversidad y abundancia que constituyen a *Megaselia* como uno de los géneros más grandes de la familia Phoridae (Brown B. V., 2010). Registros en el catálogo de Phoridae (PCAT), de la página web Phorid.net (Brown B. V., 2017), señalan apenas seis especies de *Megaselia* registradas en Ecuador (**Tabla 3**), lo cual indica que las morfoespecies identificadas en el presente estudio constituyen nuevos registros para el país.

Por otro lado, *Adelopteromyia* y *Pseudohypocera* corresponden a géneros en los que se determinó apenas una morfoespecie, así como también presentaron un reducido

número de individuos identificados morfológicamente (Figura 5 y 6). Mismos resultados se reflejan en PCAT, señalándose un total de 64 individuos de *Adelopteromyia* reportados en Ecuador, y 16 de *Pseudohypocera kerteszi* (Tabla 3), sugiriendo así un mayor muestreo de fóridos que permita la identificación de nuevos especímenes, y posterior registro para el país, correspondientes a estos géneros.

En cuanto a la subfamilia Phorinae, se reportaron los géneros *Conicera* Meigen, 1830., y *Dohrniphora* Dahl, 1898., con 3 y 2 morfoespecies identificadas respectivamente, siendo las más abundantes: *Conicera* MEPN 1 (n=10) y *Dohrniphora* MEPN 1 (n=6). Mientras que para la subfamilia Chonocephalinae se reportó únicamente al género *Cyphocephalus* Borgmeier, 1967., en la que se determinó apenas 2 morfoespecies, cada una con 4 individuos identificados morfológicamente. Registros de PCAT, en cuanto a *Cyphocephalus*, no reportan ninguna especie para este género (Tabla 4).



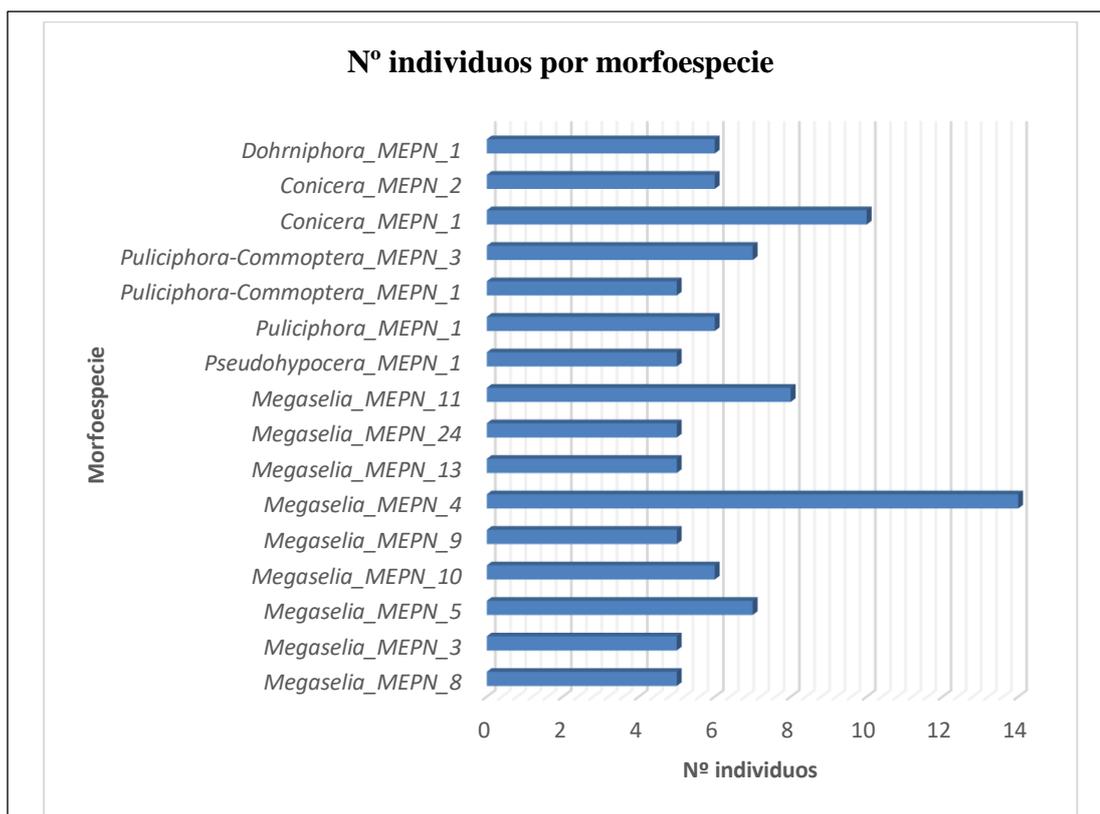


Figura 6. Morfoespecies con mayor número de individuos identificados en el presente estudio.

Nota: El gráfico de barras solamente incluye las morfoespecies con más de 4 individuos.

Elaborado por: El autor, 2017.

Tabla 4.

Número de especies e individuos de géneros de la familia Phoridae en Ecuador. Los datos corresponden solamente a los géneros que se reportaron en el presente estudio.

Género	Nº especies	Nº individuos registrados
<i>Adelopteromyia</i>	-	64
<i>Conicera</i>	-	195
<i>Cyphocephalus</i>	-	7
<i>Dohniphora</i>	42	531
<i>Megaselia</i>	6	3739
<i>Pseudohypocera</i>	1	16
<i>Puliciphora</i>	3	256
<i>Commoptera</i>	-	0

Fuente: Catálogo de Phoridae (PCAT) (Brown B. V., 2017).

Elaborado por: El autor, 2017.

Las variaciones de las medidas morfométricas indicadas en la Tabla 2, resaltan la importancia de las mismas en la diferenciación taxonómica a nivel específico, o de morfoespecies como en el presente estudio. Estas medidas fueron relevantes durante la clasificación de morfoespecies entre los géneros *Dohniphora*, *Megaselia* y *Puliciphora*, en donde se evidenciaron variaciones considerables. En el caso de los caracteres morfológicos medidos en *Megaselia*, todos ellos fueron también propuestos en los trabajos recientes de Hartop & Brown (2014) y Häggqvist, Ulefors, & Ronquist (2015), excepto las longitudes entre setas supra-antenas y preocelares, e interfrontales y fronto-orbitales, proponiéndose así a estos caracteres como determinantes en futuros estudios taxonómicos de *Megaselia*. Por otra parte, para el caso de *Dohniphora*, los caracteres morfológicos referentes a medidas entre las secciones de las alas, ya han sido propuestas en algunos trabajos taxonómicos, como los realizados por Disney (1983) y Brown & Kung (2006), (2007); las mediciones entre las longitudes de las setas frontales no fueron determinantes para clasificación de morfoespecies, mientras que caracteres morfológicos como el tamaño y forma del espiráculo, tamaño de la vena costal, y tamaño de setas ciliares, son relevantes y tentativas de analizar en posteriores estudios taxonómicos, ya que uno de los caracteres que mayor atención han propuesto varios especialistas en la descripción de especies de *Dohniphora*, constituyen tan solo las bases de la cara posterior de los fémures traseros (Brown & Kung, 2007). Finalmente para el género *Puliciphora*, trabajos realizados por Disney & Sinclair (2008) en Galápagos, describen caracteres morfológicos medibles en las secciones del ala, tamaño de la vena costal y tamaño del cuerpo para la identificación de una nueva especie, por lo que estos caracteres resultaron vitales en la identificación de morfoespecies en el presente estudio; mientras

que caracteres como la longitud entre setas interfrontales y frontorbitales, y el diametro del espiráculo resultan de interés para posteriores revisiones taxonómicas.

Por otro lado, los géneros *Conicera*, *Cyphocephalus*, y *Puliciphora-Commoptera* presentaron una menor variación no solo en los caracteres medidos sino también en el resto de caracteres morfológicos, por lo que su clasificación resultó dificultosa, recomendándose así tomar en cuenta nuevos caracteres morfológicos que corroboren a la identificación de especies. Mientras que para los géneros *Adelopteromyia* y *Pseudohypocera*, debido al reducido número de individuos identificados, no se pudo constatar si los caracteres morfológicos revisados, son determinantes a la hora de identificar especies. Uno de los trabajos que propone nuevos caracteres morfológicos, para la identificación y clasificación taxonómica de la familia Phoridae, son los mencionados por Brown, Amorim, & Kung (2015), quienes reportan alrededor de 46 caracteres morfológicos situados en las estructuras del tórax; a estos se suman también una serie de caracteres homoplásicos, revisados por Ament (2017) para el análisis filogenético de la subfamilia Phorinae. Ambos trabajos abren la posibilidad del uso de un mayor número de caracteres morfológicos que permitan la identificación de especies en Phoridae.

Las medidas del tamaño de cada espécimen revelaron que *Dohrniphora*, *Megaselia* y *Pseudohypocera* corresponden a géneros que, en promedio, presentan individuos más grandes en comparación al resto, por el contrario los machos de las morfoespecies agrupadas en *Puliciphora-Commoptera* se encuentran entre los individuos más diminutos de la familia (~ 1mm), lo cual puede ser una barrera en la observación de caracteres y posterior determinación taxonómica.

A continuación, se describen los principales caracteres morfológicos que diferencian una morfoespecie de otra, número de individuos identificados, y localidades registradas. Las fotografías de cada morfoespecie se muestran en el Anexo 8.

Subfamilia **Chonocephalinae** Brown *et al.* 2015

Género *Cyphocephalus* Borgmeier, 1967

***Cyphocephalus* MEPN 1.** (n=4; tamaño espécimen = $1227 \pm 59 \mu\text{m}$); longitud entre setas inter-frontales (IF) y setas fronto-orbitales (FO) = $10 \pm 0.02 \mu\text{m}$; frente estrecha; 2 pares de setas escutelares; presencia de pliegue anepisternal; vena costal mayor a longitud media del ala. Ver Anexo 8-A.

Sitios registrados: MPS, MPOA.

***Cyphocephalus* MEPN 2.** (n=4; tamaño espécimen = $1184 \pm 109 \mu\text{m}$); longitud entre IF y FO = $18 \pm 1 \mu\text{m}$; frente más ancha; 3 pares de setas escutelares; sin pliegue anepisternal; vena costal igual a longitud media del ala. Ver Anexo 8-B.

Sitios registrados: MPOA, LCO.

Subfamilia **Metopininae** Rondani, 1856

Género *Adelopteromyia* Schmitz, 1923

***Adelopteromyia* MEPN 1.** (n=3; tamaño espécimen = $2806 \pm 222 \mu\text{m}$); setas frontales muy largas; longitud entre setas preocelares (PO) y setas supra-antenas (SA) = $49 \pm 2 \mu\text{m}$; postpedicelo alargado; anepisternum sin pelos; espiráculo abierto, de diámetro $65 \pm 12 \mu\text{m}$; vena R_{2+3} ausente; S_1 más pequeño que S_2 ; vena costal mayor a longitud media del ala. Ver Anexo 8-C.

Sitios registrados: RB2.

Género *Megaselia* Rondani, 1856

***Megaselia* MEPN 1.** (n=3; tamaño espécimen de aprox. 2500 μm); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $35 \pm 1 \mu\text{m}$; IF cercanas y por debajo de SA; longitud entre PO y SA = $76 \pm 8 \mu\text{m}$; postpedicelo grande-redondo; espiráculo abierto; setas ciliares $\frac{1}{4}$ más largas que altura de horquilla R_{2+3} ; longitud de S_1 igual que S_2 - S_3 ; vena costal mayor a longitud media del ala, cerco muy largo, en comparación al resto de morfos, y delgado. Ver Anexo 8-D.

Sitios registrados: LCI.

***Megaselia* MEPN 2.** (n=3; tamaño espécimen de aprox. 2800 μm); IF próximas a FO, longitud entre IF y FO de aprox. 22 μm ; IF distantes y por debajo de SA; frente negra, base café claro; longitud entre PO y SA de aprox. 90 μm ; espinas largas en palpos; postpedicelo grande-redondo ligeramente alargado; anepisternum con pelos; espiráculo abierto; setas ciliares $\frac{1}{4}$ más largo que altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc completa; cerco pequeño y grueso. Ver Anexo 8-E.

Sitios registrados: RB2.

***Megaselia* MEPN 3.** (n=5; tamaño espécimen = $1445 \pm 40 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $18 \pm 5 \mu\text{m}$; IF distantes y por debajo de SA; longitud entre PO y SA = $59 \pm 24 \mu\text{m}$; espiráculo abierto, de diámetro = $20 \pm 2 \mu\text{m}$; altura de la horquilla R_{2+3} = $48 \pm 4 \mu\text{m}$; tamaño de setas ciliares aprox. igual a altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc incompleta. Ver Anexo 8-F.

Sitios registrados: RB3, LCI.

***Megaselia* MEPN 4.** (n=14; tamaño espécimen = $2126 \pm 400 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $26 \pm 2 \mu\text{m}$; IF distantes y en mismo plano que SA; longitud entre PO y SA = $71 \pm 6 \mu\text{m}$; espiráculo abierto, de diámetro = $36 \pm 4 \mu\text{m}$; altura de la horquilla R_{2+3} = $83 \pm 15 \mu\text{m}$; setas ciliares $\frac{3}{4}$ más largas que altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc completa. Ver Anexo 8-G.

Sitios registrados: LCI, MPS, RB2.

***Megaselia* MEPN 5.** (n=7; tamaño espécimen = $2023 \pm 412 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $37 \pm 4 \mu\text{m}$; IF cercanas y por debajo de SA; frente café oscura y negra mate; longitud entre PO y SA = $68 \pm 7 \mu\text{m}$; espiráculo abierto/cerrado, de diámetro = $33 \pm 6 \mu\text{m}$; altura de la horquilla $R_{2+3} = 50 \pm 5 \mu\text{m}$; setas ciliares $\frac{1}{4}$ más largas que altura de horquilla R_{2+3} ; S_1 más corta que S_2 - S_3 ; vena costal mayor a longitud media del ala; cerco largo y grueso. Ver Anexo 8-H.

Sitios registrados: RB3, LCI.

***Megaselia* MEPN 6.** (n=3; tamaño espécimen = $2333 \pm 38 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $42 \pm 5 \mu\text{m}$; IF cercanas y por debajo de SA; frente negra, base café claro; longitud entre PO y SA = $74 \pm 8 \mu\text{m}$; postpedicelo pequeño-redondo ligeramente alargado; espiráculo abierto/cerrado, de diámetro $41 \pm 6 \mu\text{m}$; altura de la horquilla $R_{2+3} = 77 \pm 11 \mu\text{m}$; S_1 más corta que S_2 - S_3 ; vena costal mayor a longitud media del ala; cerco largo y delgado. Ver Anexo 8-I.

Sitios registrados: MPOA.

***Megaselia* MEPN 7.** (n=4; tamaño espécimen de aprox. $1800 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO de aprox. $24 \mu\text{m}$; IF distantes y por debajo de SA; longitud entre PO y SA de aprox. $60 \mu\text{m}$; espinas largas en palpos; postpedicelo grande-redondo; anepisternum con pelos; espiráculo cerrado; setas ciliares aprox. igual a altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc incompleta. Ver Anexo 8-J.

Sitios registrados: RB1.

***Megaselia* MEPN 8.** (n=5; tamaño espécimen = $1681 \pm 550 \mu\text{m}$); IF por debajo a FO, longitud entre IF y FO = $21 \pm 4 \mu\text{m}$; frente negra, base café claro; IF distantes a SA, en el mismo plano; longitud entre PO y SA = $77 \pm 10 \mu\text{m}$; espiráculo abierto, de diámetro = $34 \pm 3 \mu\text{m}$; altura de la horquilla $R_{2+3} = 62 \pm 18 \mu\text{m}$; setas ciliares aprox.

igual a altura de la horquilla R_{2+3} ; S_1 igual que S_2-S_3 ; vena costal igual a longitud media del ala. Ver Anexo 8-K.

Sitios registrados: LCI, LCO.

***Megaselia* MEPN 9.** (n=5; tamaño espécimen = $1861 \pm 198 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $21 \pm 10 \mu\text{m}$; IF distantes y por debajo de SA; longitud entre PO y SA = $68 \pm 26 \mu\text{m}$; postpedicelo pequeño-redondo; un par de setas escutelares; anepisternum sin pelos; espiráculo cerrado, de diámetro = $31 \pm 6 \mu\text{m}$; altura de la horquilla R_{2+3} = $64 \pm 11 \mu\text{m}$; setas ciliares $\frac{1}{4}$ más largas que altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc incompleta; cerco grande y delgado. Ver Anexo 8-L.

Sitios registrados: RB2, LCI.

***Megaselia* MEPN 10.** (n=6; tamaño espécimen = $2009 \pm 370 \mu\text{m}$); IF por debajo de FO, longitud entre IF y FO = $44 \pm 4 \mu\text{m}$; IF cercanas al margen del ojo, por debajo de SA; longitud entre PO y SA = $88 \pm 20 \mu\text{m}$; postpedicelo pequeño-redondo ligeramente alargado; dos pares de setas escutelares; anepisternum con pelos; espiráculo abierto, de diámetro = $31 \pm 8 \mu\text{m}$; cabeza del halterio amarilla; setas ciliares $\frac{3}{4}$ más largas que altura de horquilla R_{2+3} ; S_1 igual que S_2-S_3 ; vena costal igual a longitud media del ala. Ver Anexo 8-M.

Sitios registrados: RB3.

***Megaselia* MEPN 11.** (n=8; tamaño espécimen = $2504 \pm 432 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $48 \pm 1 \mu\text{m}$; IF cercanas y por debajo de SA; longitud entre PO y SA = $82 \pm 6 \mu\text{m}$; un par de setas escutelares; espiráculo abierto, de diámetro = $41 \pm 4 \mu\text{m}$; setas ciliares $\frac{3}{4}$ más largas que altura de la horquilla R_{2+3} ; S_1 más corta que S_2-S_3 ; vena costal mayor a longitud media del ala. Ver Anexo 8-N.

Sitios registrados: MPOA.

***Megaselia* MEPN 13.** (n=5; tamaño espécimen = $1767 \pm 305 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO de aprox. $50 \mu\text{m}$; IF cercanas y en mismo plano que SA; longitud entre PO y SA = $96 \pm 26 \mu\text{m}$; espinas cortas en palpos; postpedicelo pequeño-redondo ligeramente alargado; espiráculo cerrado, de diámetro = $30 \pm 9 \mu\text{m}$; setas ciliares $\frac{3}{4}$ más largas que altura de la horquilla R_{2+3} ; S_1 igual que S_2-S_3 ; vena costal igual a longitud media del ala. Ver Anexo 8-O.

Sitios registrados: LCC, LCI, LCR.

***Megaselia* MEPN 14.** (n=3; tamaño espécimen de aprox. $1800 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO de aprox. $20 \mu\text{m}$; IF distantes y en mismo plano que SA; longitud entre PO y SA de aprox. $65 \mu\text{m}$; espiráculo abierto, de aprox. $26 \mu\text{m}$ de diámetro; cabeza de halterio amarilla; setas ciliares $\frac{3}{4}$ más largas que altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc completa; S_1 igual que S_2-S_3 ; vena costal menor a longitud media del ala. Ver Anexo 8-P.

Sitios registrados: LCI.

***Megaselia* MEPN 15.** (n=3; tamaño espécimen = $2393 \pm 61 \mu\text{m}$); IF por debajo a FO, longitud entre IF y FO = $45 \pm 1 \mu\text{m}$; IF cercanas al margen del ojo, por debajo de SA; frente negra mate; longitud entre PO y SA = aprox. $95 \mu\text{m}$; espinas largas en palpos; postpedicelo pequeño-redondo; anepisternum con pelos; espiráculo cerrado, de diámetro = $39 \pm 12 \mu\text{m}$; altura de la horquilla R_{2+3} = $79 \pm 10 \mu\text{m}$; setas ciliares $\frac{1}{4}$ más largas que altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc completa. Ver Anexo 8-Q.

Sitios registrados: RB2, LCI.

***Megaselia* MEPN 16.** (n=4; tamaño espécimen = $2612 \pm 86 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $47 \pm 5 \mu\text{m}$; IF cercanas y por debajo de SA; frente negro, base café claro y café clara; longitud entre PO y SA = $106 \pm 28 \mu\text{m}$; espinas cortas en palpos; postpedicelo grande-redondo; anepisternum sin pelos; espiráculo abierto, de

diámetro = $46 \pm 17 \mu\text{m}$; altura de la horquilla $R_{2+3} = 63 \pm 11 \mu\text{m}$; tamaño de setas ciliares aprox. igual a altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc incompleta. Ver Anexo 8-R.

Sitios registrados: RB2, RB3.

***Megaselia* MEPN 17.** (n=3; tamaño espécimen = $3436 \pm 452 \mu\text{m}$); IF por debajo a FO, longitud entre IF y FO = $51 \pm 12 \mu\text{m}$; IF cercanas al margen del ojo, por debajo de SA; longitud entre PO y SA = $123 \pm 26 \mu\text{m}$; postpedicelo pequeño-redondo; anepisternum con pelos; espiráculo abierto, de diámetro = $50 \pm 1 \mu\text{m}$; altura de la horquilla $R_{2+3} = 129 \pm 60 \mu\text{m}$; setas ciliares $\frac{1}{4}$ más cortas que altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc completa. Ver Anexo 8-S.

Sitios registrados: LCI.

***Megaselia* MEPN 18.** (n=3; tamaño espécimen = $3364 \pm 37 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $36 \pm 4 \mu\text{m}$; IF distantes y por debajo de SA; longitud entre PO y SA = $77 \pm 3 \mu\text{m}$; postpedicelo grande-redondo; anepisternum sin pelos; espiráculo abierto, de diámetro = $50 \pm 3 \mu\text{m}$; altura de la horquilla $R_{2+3} = 164 \pm 28 \mu\text{m}$; setas ciliares $\frac{1}{4}$ más cortas que altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc incompleta. Ver Anexo 8-T.

Sitios registrados: MPOA.

***Megaselia* MEPN 19.** (n=2; tamaño espécimen de aprox. $2000 \mu\text{m}$); espinas largas en palpos; postpedicelo pequeño redondo; espiráculo cerrado de aprox. $35 \mu\text{m}$ de diámetro; setas ciliares aprox. igual a altura de la horquilla R_{2+3} ; Vena Sc completa; S_1 más corto que S_2 - S_3 ; vena costal mayor a longitud media del ala; cerco pequeño y grueso. Ver Anexo 8-U.

Sitios registrados: MPP.

***Megaselia* MEPN 20.** (n=4; tamaño espécimen = $2431 \pm 90 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $39 \pm 4 \mu\text{m}$; IF distantes y por debajo de SA; longitud entre

PO y SA = $106 \pm 10 \mu\text{m}$; postpedicelo grande-redondo ligeramente alargado; espiráculo abierto/cerrado, de diámetro = $46 \pm 10 \mu\text{m}$; altura de la horquilla $R_{2+3} = 70 \pm 14 \mu\text{m}$; setas ciliares aprox. igual a altura de la horquilla R_{2+3} ; vena Sc completa; S_1 igual que S_2-S_3 ; vena costal mayor a longitud media del ala. Ver Anexo 8-V.

Sitios registrados: LCI.

***Megaselia* MEPN 24.** (n=5; tamaño espécimen = $1751 \pm 176 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $37 \pm 6 \mu\text{m}$; IF distantes y por debajo de SA; longitud entre PO y SA = $85 \pm 10 \mu\text{m}$; espinas cortas en palpos; postpedicelo grande-redondo; espiráculo cerrado, de diámetro = $28 \pm 6 \mu\text{m}$; tamaño de setas ciliares aprox. igual que altura de la horquilla R_{2+3} ; S_1 igual que S_2-S_3 ; vena costal igual a longitud media del ala. Ver Anexo 8-W.

Sitios registrados: RB2, RB3, LCI.

***Megaselia* MEPN 25.** (n=4; tamaño espécimen = $2240 \pm 151 \mu\text{m}$); IF por debajo de FO, longitud entre IF y FO = $35 \pm 9 \mu\text{m}$; IF cercanas al margen del ojo, por debajo de SA; longitud entre PO y SA = $108 \pm 8 \mu\text{m}$; postpedicelo grande-redondo; dos pares de setas escutelares; anepisternum con pelos; espiráculo cerrado, de aprox. $37 \mu\text{m}$ de diámetro; altura de la horquilla $R_{2+3} = 52 \pm 3 \mu\text{m}$; vena Sc completa; cerco grande y grueso. Ver Anexo 8-X.

Sitios registrados: MPP, LCI.

***Megaselia* MEPN 26.** (n=4; tamaño espécimen = $2189 \pm 233 \mu\text{m}$); IF muy próximas a FO, longitud entre IF y FO = $12 \pm 0,5 \mu\text{m}$; IF distantes y por debajo de SA; frente café clara; longitud entre PO y SA = $52 \pm 1 \mu\text{m}$; espinas cortas en palpos, postpedicelo pequeño-redondo; anepisternum sin pelos; espiráculo cerrado; setas ciliares aprox. igual a altura de horquilla R_{2+3} ; vena Sc incompleta; S_1 menor que S_2-S_3 ; vena costal mayor a longitud media del ala; cerco pequeño y grueso. Ver Anexo 8-Y.

Sitios registrados: LCI.

Nota. *Megaselia* MEPN 12, *Megaselia* MEPN 21, *Megaselia* MEPN 22 y *Megaselia* MEPN 23 corresponden a morfoespecies que inicialmente, en base a su morfología, se encontraban clasificadas como parte del resto de morfoespecies, pero molecularmente resultaron ser distintas, utilizándose el voucher en los respectivos análisis moleculares.

Género *Pseudohypocera* Malloch, 1912

***Pseudohypocera* MEPN 1.** (n=5; tamaño espécimen = $2287 \pm 136 \mu\text{m}$); IF diagonales a FO, longitud entre IF y FO = $119 \pm 3 \mu\text{m}$; IF cercanas y por encima de SA; frente negra brillante; longitud entre PO y SA = $216 \pm 23 \mu\text{m}$; espinas cortas en palpos; espiráculo abierto y ovalado; altura de la horquilla $R_{2+3} = 96 \pm 4 \mu\text{m}$; vena Sc incompleta; más de 7 setas en alula; S_1 mayor que S_2 - S_3 ; vena costal igual a longitud media del ala; cerco pequeño y grueso. Ver Anexo 8-Z.

Sitios registrados: RB2.

Género *Puliciphora* Dahl, 1897

***Puliciphora* MEPN 1.** (n=6; tamaño espécimen = $1393 \pm 72 \mu\text{m}$); longitud entre IF y FO = $20 \pm 1 \mu\text{m}$; espinas cortas en palpos; postpedicelo pequeño-redondo ligeramente alargado; espiráculo cerrado, de diámetro = $22 \pm 4 \mu\text{m}$; setas ciliares cortas; engrosamiento muy notorio entre venas humeral y R_1 ; S_1 igual que S_2 ; vena costal menor a longitud media del ala. Ver Anexo 8-AA.

Sitios registrados: LCI.

***Puliciphora* MEPN 2.** (n=3; tamaño espécimen = $1774 \pm 84 \mu\text{m}$); longitud entre IF y FO = $27 \pm 4 \mu\text{m}$; espinas largas en palpos; postpedicelo pequeño-redondo; espiráculo cerrado, de diámetro = $16 \pm 2 \mu\text{m}$; setas ciliares largas; leve engrosamiento entre venas

humeral y R₁; S₁ menor que S₂; vena costal mayor a longitud media del ala. Ver Anexo 8-AB.

Sitios registrados: MPOA.

***Puliciphora* MEPN 3.** (n=4; tamaño espécimen = 1354 ± 150 μm); longitud entre IF y FO = 26 ± 6 μm; espinas cortas en palpos; postpedicelo pequeño-redondo ligeramente alargado; espiráculo cerrado, de diámetro = 16 ± 5 μm; setas ciliares cortas; leve engrosamiento entre venas humeral y R₁; S₁ menor que S₂; vena costal mayor a longitud media del ala. Ver Anexo 8-AC.

Sitios registrados: MPP.

Géneros *Puliciphora* Dahl, 1897-*Commoptera* Brues, 1901

***Puliciphora-Commoptera* MEPN 1.** (n=5; tamaño espécimen de aprox. 1100 μm); tamaño de SA poco menor a longitud media de la altura de la frente; longitud entre PO y SA de aprox. 65 μm; frente ancha; espinas cortas en palpos; postpedicelo grande-redondo ligeramente alargado; espiráculo cerrado, de diámetro = 21 ± 1 μm; cerco grande y grueso. Ver Anexo 8-AD.

Sitios registrados: LCR.

***Puliciphora-Commoptera* MEPN 2.** (n=4; tamaño espécimen = 1068 ± 328 μm); tamaño de SA igual a longitud media de la altura de la frente; longitud entre PO y SA = 43 ± 6 μm; frente angosta; espinas largas en palpos; postpedicelo grande-redondo; espiráculo cerrado, de diámetro = 17 ± 4 μm; cerco pequeño y grueso. Ver Anexo 8-AE.

Sitios registrados: LCI, LCO.

***Puliciphora-Commoptera* MEPN 3.** (n=7; tamaño espécimen = 1152 ± 83 μm); tamaño de SA igual a longitud media de la altura de la frente; longitud entre PO y SA

= $39 \pm 5 \mu\text{m}$; frente ancha; espinas largas en palpos; postpedicelo pequeño-redondo; espiráculo cerrado, de diámetro = $22 \pm 8 \mu\text{m}$; cerco grande y grueso. Ver Anexo 8-AF.

Sitios registrados: LCO.

Subfamilia **Phorinae** Rondani, 1856

Género *Conicera* Meigen, 1830

Conicera MEPN 1. (n=10; tamaño espécimen = $1568 \pm 134 \mu\text{m}$); longitud entre PO y SA = $68 \pm 4 \mu\text{m}$; espiráculo abierto, de diámetro = $27 \pm 6 \mu\text{m}$; vena costal menor e igual que longitud media del ala. Ver Anexo 8-AG.

Sitios registrados: LCI, LCR, RB2.

Conicera MEPN 2. (n=6; tamaño espécimen = $1498 \pm 140 \mu\text{m}$); longitud entre PO y SA = $53 \pm 1 \mu\text{m}$; espiráculo cerrado, de diámetro = $20 \pm 4 \mu\text{m}$; vena costal menor e igual que longitud media del ala. Ver Anexo 8-AH.

Sitios registrados: RB2.

Conicera MEPN 3. (n=4; tamaño espécimen = $1394 \pm 71 \mu\text{m}$); longitud entre PO y SA = $62 \pm 4 \mu\text{m}$; espiráculo abierto, de diámetro = $25 \pm 4 \mu\text{m}$; vena costal menor que longitud media del ala. Ver Anexo 8-AI.

Sitios registrados: LCI, RB2.

Género *Dohrniphora* Dahl, 1898

Dohrniphora MEPN 1. (n=6; tamaño espécimen = $1817 \pm 175 \mu\text{m}$); postpedicelo grande; ausencia del pliegue anepisternal; espiráculo cerrado, de diámetro = $50 \pm 2 \mu\text{m}$; cabeza del halterio oscura; altura de la horquilla $R_{2+3} = 45 \pm 6 \mu\text{m}$; tamaño setas

ciliares aprox. igual a altura de la horquilla R_{2+3} ; vena costal igual que longitud media del ala. Ver Anexo 8-AJ.

Sitios registrados: LCI, LCR.

***Dohrniphora* MEPN 2.** (n=3; tamaño espécimen = $2256 \pm 20 \mu\text{m}$); postpedicelo pequeño; presencia del pliegue anepisternal; espiráculo abierto, de diámetro = $45 \pm 1 \mu\text{m}$; cabeza del halterio amarilla; altura de la horquilla R_{2+3} de aprox. $33 \mu\text{m}$; setas ciliares $\frac{1}{2}$ más largo que la altura de la horquilla R_{2+3} ; vena costal mayor que longitud media del ala. Ver Anexo 8-AK.

Sitios registrados: MPP.

3.2. Análisis molecular de morfoespecies de Phoridae

3.2.1. Extracción de ADN

Se obtuvo el ADN de 60 muestras de las 63 separadas para la identificación molecular, siendo el protocolo de extracción establecido, el adecuado para extracción de ADN de especímenes de Phoridae. Sin embargo, las cantidades de concentración de ADN variaron significativamente entre los individuos analizados (Anexo 9), esto posiblemente debido al tamaño reducido de cada individuo (entre 1 a 3 mm), el empleo de especímenes fragmentados, así como también el método de conservación de los individuos durante su captura. Es así que para largos periodos de conservación de especímenes recolectados, se recomienda el uso de otros métodos de preservación, tales como: el uso de alcohol etílico o isopropílico absoluto (Márquez J. , 2005), empleo de acetona (Cook & Mostovski, 2002), sílica gel y/o congelación de los especímenes (Castaño, *et al.*, 2011). Estudios en *Anopheles* (Diptera: Culicidae) enfocados a la comparación de métodos de conservación para la extracción de ADN,

sugieren que la conservación en silica gel y/o congelación a -80 °C, constituyen las mejores condiciones para la preservación de estos dípteros para posteriores ensayos moleculares (Castaño, *et al.*, 2011).

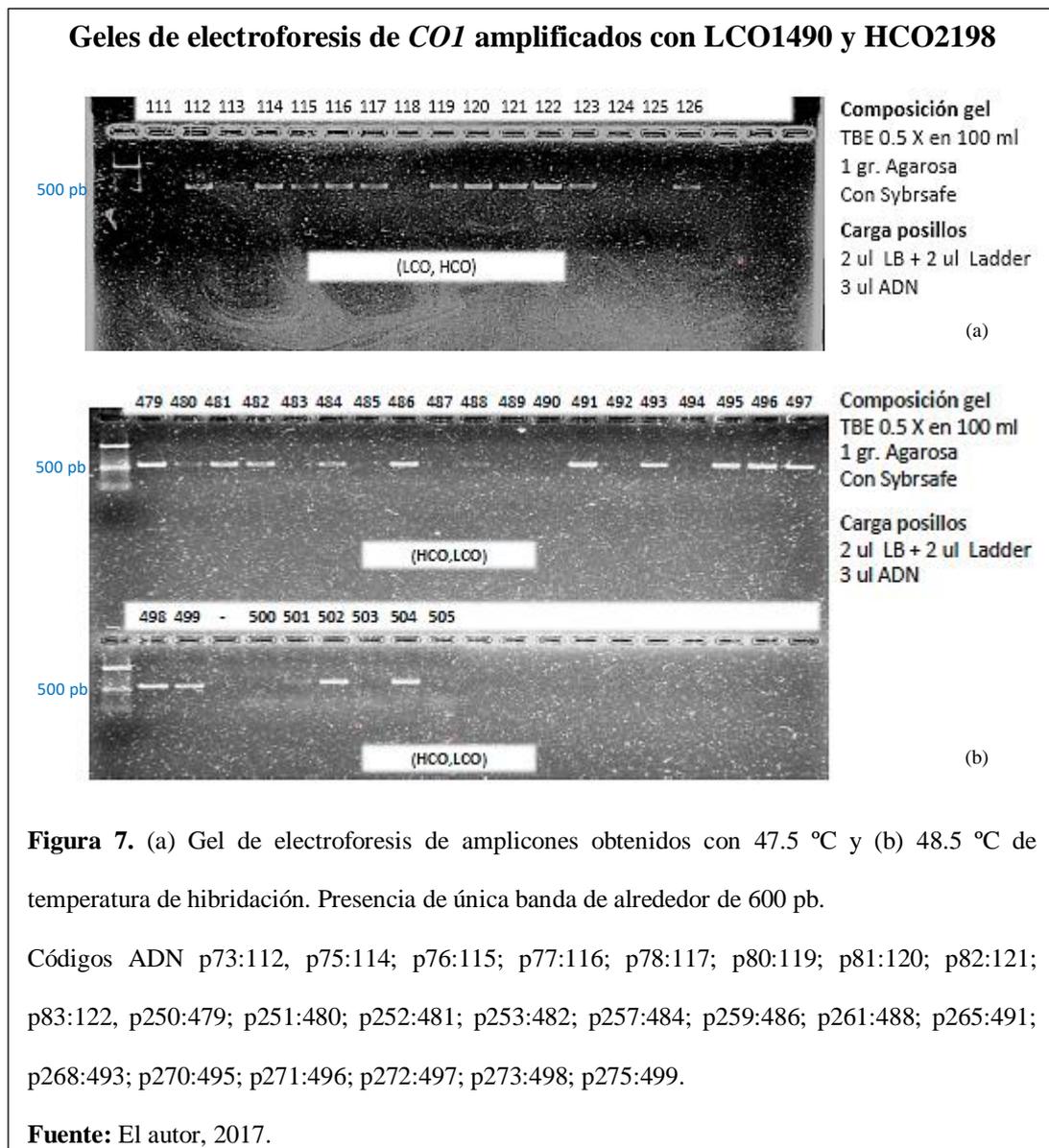
Por otro lado, los valores de las relaciones de absorbancia 260/280 (Anexo 9) determinados por el Nanodrop, reflejaron que el 70 % de muestras de ADN obtenidas, corresponden a muestras de pureza óptima y moderada, situándose sus valores dentro del rango estimado, entre 1.6 – 2.1 (Damián, *et al.*, 2013; Dhaliwal, 2013). El 23.3 % de las muestras presentaron valores mayores a 2.1, señalándose así un exceso de ARN en las mismas (Thermo Fisher Scientific, 2016); y el 6.7 % restante pertenecen a muestras con valores inferiores a 1.6, indicándose una contaminación por proteínas, para lo cual se recomienda repetir la digestión con proteinasa K (Frederick, *et al.*, 2003). En cuanto a las relaciones de absorbancia 260/230 (Anexo 9), el 35 % de las muestras de ADN presentaron valores por debajo a 1.5, lo que indica la contaminación con sales, carbohidratos y/o fenoles (Banco Nacional de ADN Carlos III , 2016), aun así la variación en los resultados no influyó en la amplificación de ADN ya que la mayoría de valores no se alejaron significativamente de la media, 1.86 ± 1.21 .

3.2.2. Amplificación de *COI*

De las 60 muestras de ADN obtenidas, se amplificó un fragmento del gen mitocondrial *COI* en todas mediante el protocolo establecido. Las temperaturas de hibridación fueron establecidas mediante ensayos previos en un termociclador con gradientes, probando temperaturas entre 45 – 53 °C de acuerdo a varios protocolos de amplificación de *COI* en Phoridae (Boehme, *et al.*, 2010; Brown & Smith, 2010; Hash, Brown, Smith, & Kanao, 2013), siendo las temperaturas de 47.5 y 48.5 °C, las

adecuadas para la amplificación de *COI* en los especímenes analizados, obteniéndose de ellas un 48.3 y 45 % de amplicones, respectivamente.

Mediante electroforesis en gel de agarosa se pudo constatar la presencia de una única banda de alrededor de 600 pb en todas las muestras amplificadas con los cebadores LCO1490 Y HCO2198 (Figura 7), obteniéndose un total de 58 amplicones. En el caso de los cebadores C1-J-1632 y C1-N-2191, se amplificó únicamente dos muestras, que con los cebadores anteriores fueron difíciles de obtener; los resultados indican la presencia de una única banda de alrededor de 500 pb en cada muestra (Figura 8).



Gel de electroforesis de *COI* amplificados con C1-J-1632 y C1-N-2191

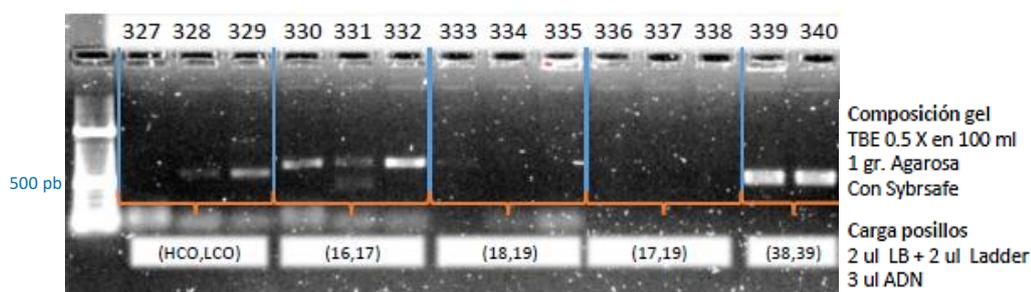


Figura 8. Gel de electroforesis de amplicones obtenidos con 48.5 °C de temperatura de hibridación. Presencia de única banda de alrededor de 500 pb que corresponde a las muestras de ADN p89:339 y p91:340. Cebadores C1-J-1632=38 y C1-N-2191=39. Los códigos (16,17), (18,19) y (17,19) corresponden a otros pares de cebadores con los que se realizaron pruebas.

Elaborado por: El autor, 2017.

3.2.3. Análisis y características de las secuencias

Los amplicones secuenciados por la empresa Eurofins MWG Operon, fueron generados en formato “ab1”, y presentaron una calidad superior al 80 %. Después de editadas las secuencias de *COI*, en el programa Geneious (v 9.1), se lograron generar un total de 57 secuencias consenso con un porcentaje de calidad mayor al 85 %, con la excepción de Conicera MEPN 3 RB, cuya calidad fue del 13 %, aun así se la consideró dentro de los análisis posteriores, debido a los porcentajes de homología con *Conicera* sp. (Query cobert (QC) de 99 %, Identidad del 92 % y valor-E de 0) determinados por el BLASTn. Las secuencias consenso generadas, en su mayoría constaron con una longitud media de 670 pb (Anexo 10).

El alineamiento de las secuencias mostró una ausencia de inserciones y deleciones tanto entre el set de secuencias de interés como de los grupos externos usados, además el conjunto de datos muestra un contenido del 67.4 % en adenina y timina, similar al porcentaje de A y T obtenido por Hash *et al.* (2013) que reporta un valor de 71.1 %.

(a). *Distancias genéticas*

Para el análisis de distancias intraespecíficas se analizaron un total de 12 morfoespecies (**Tabla 4**), de las cuales se reportó más de un individuo, sus valores oscilaron entre 0 y 1.13 %, con una mayor frecuencia de distancias iguales a 0, indicándose así la correspondencia de cada individuo con su respectiva morfoespecie identificada morfológicamente, además de compartir el mismo haplotipo. Trabajos realizados por Boehme *et al.* (2010) y Häggqvist *et al.* (2015) en identificación de especímenes de Phoridae, reportan una distancia genética intraespecífica de *COI* entre 1 – 2 %, valores que juntos a los obtenidos en el presente estudio, son determinantes en la asociación de especies en general.

Por su parte las diferencias en las distancias intraespecíficas con respecto a la localidad a la que pertenecen cada individuo, muestran una distancia genética del 0.2 % para individuos de *Megaselia* MEPN 4, siendo los sitios registrados (Los Cedros, Maquipucuna-Pahuma, y Río Bravo) no constituyentes de barreras geográficas que delimiten la presencia de esta morfoespecie en los hábitats mencionados. Resultados similares, se reportan también para los individuos de *Megaselia* MEPN 8 y *Megaselia* MEPN 9, ambas morfoespecies con individuos registrados en Los Cedros y Río Bravo, y una distancia genética de cero (**Tabla 4**). Ambos resultados abren la oportunidad de nuevos estudios que permitan la predicción de patrones de movimiento y probabilidades de dispersión o mortalidad de las especies a través de las características del paisaje, tales como el modelo de aislamiento por resistencia, el cual estima la relación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas (Garrido & Vázquez, 2013).

Tabla 5.

Distancias genéticas dentro de grupos de Phoridae identificados en el presente estudio.

Para el cálculo de las distancias se incluyeron todas las secuencias obtenidas (n=59).

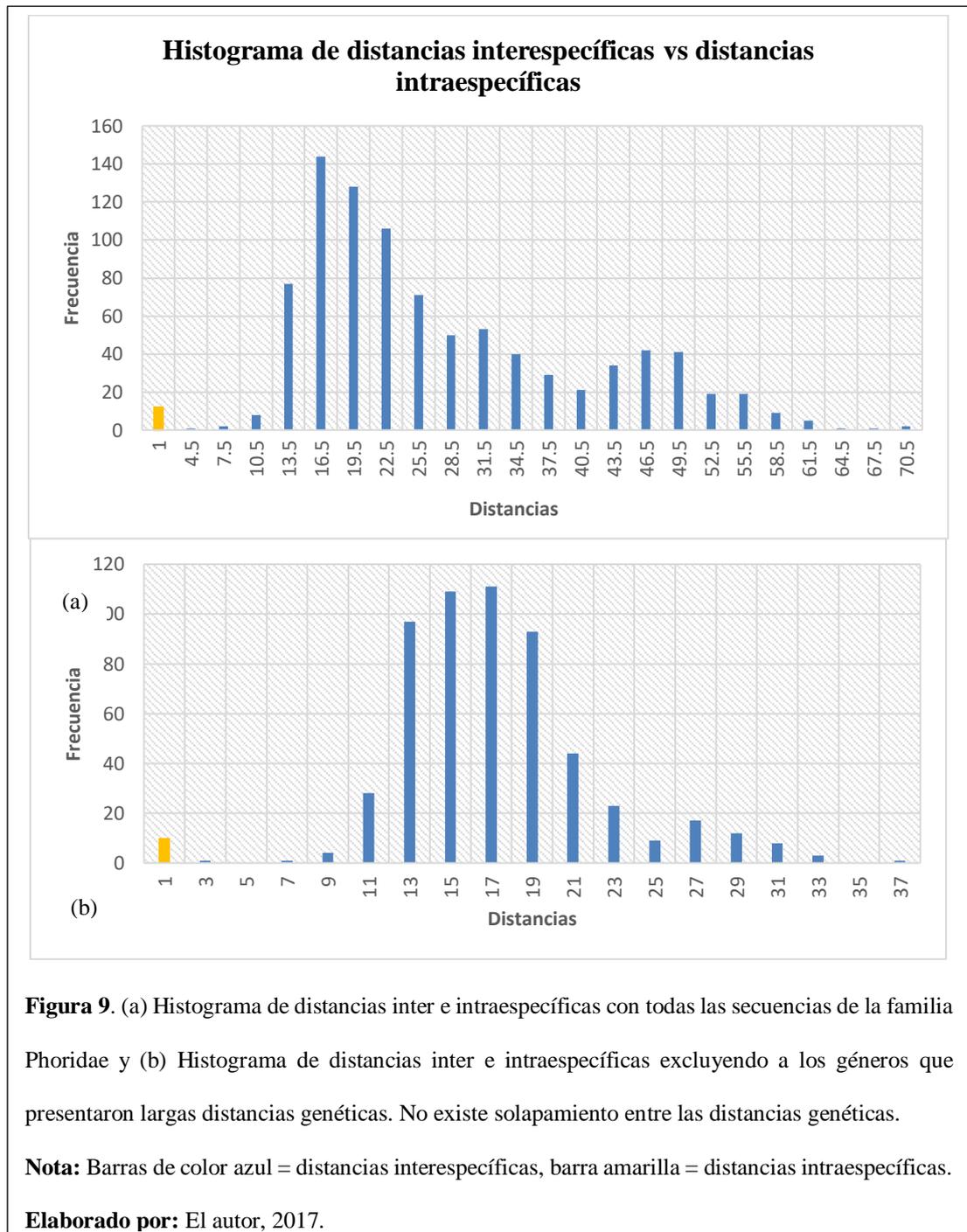
Morfoespecie	Distancia	Error estándar	Distancia (%)
<i>Pseudohypocera</i> MEPN 1	0	0	0
<i>Megaselia</i> MEPN 2	0	0	0
<i>Megaselia</i> MEPN 4	0,0022	0,0022	0,22
<i>Megaselia</i> MEPN 5	0,0113	0,0065	1,13
<i>Megaselia</i> MEPN 7	0	0	0
<i>Megaselia</i> MEPN 8	0	0	0
<i>Megaselia</i> MEPN 9	0	0	0
<i>Megaselia</i> MEPN 10	0,0037	0,0036	0,37
<i>Megaselia</i> MEPN 11	0	0	0
<i>Conicera</i> MEPN 1	0	0	0
<i>Puliciphora-Commoptera</i> MEPN 1	0	0	0
<i>Puliciphora-Commoptera</i> MEPN 3	0	0	0

Nota: Las distancias se obtuvieron en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) a través del modelo de máxima probabilidad compuesta (Tamura *et al.*, 2004) modelado con una distribución gamma.

Elaborado por: El autor, 2017.

En cuanto a las variaciones en las distancias interespecíficas, sus valores oscilaron entre 3.73 % (*Megaselia* MEPN 3 - *Megaselia* MEPN 4) y 71.68 % (*Puliciphora-Commoptera* MEPN 3 - *Puliciphora-Commoptera* MEPN 2), esta última distancia manifestándose como ramas largas en la construcción del árbol filogenético de todo el set de Phoridae (Anexo 11). Por su parte, Boehme *et al.* (2010) reporta una divergencia interespecífica de 7.9 a 18.6 %, mientras que Häggqvist *et al.* (2015) indica valores entre 14 al 21%, lo cual indica una relación más estrecha entre las morfoespecies 3 y 4 de *Megaselia*, aún así los valores reportados en el presente estudio permiten una clara diferenciación entre las especies. Debido a las largas distancias genéticas que presentan *Adelopteromyia*, *Puliciphora*, *Puliciphora-Commoptera* y *Cyphocephalus*, se procedió al cálculo de las distancias únicamente de los géneros *Megaselia*, *Pseudohypocera*, *Conicera* y *Dohniphora*, dando como resultado distancias

intraespecíficas entre 0 a 0.95 %, y distancias interespecíficas entre 2.82 % (*Megaselia* MEPN 3-*Megaselia* MEPN 4) y 36.2 % (*T. punctata*-*Megaselia* MEPN 1).



En ambos análisis no existe el solapamiento de distancias genéticas intraespecíficas e interespecíficas (Fig. 9), resultando el gen CO1 de gran utilidad e importancia para la delimitación de especies (Meyer & Paulay, 2005) de dípteros de la familia Phoridae.

(b). Análisis de máxima verosimilitud

El árbol generado por el método de máxima verosimilitud y modelo de sustitución GTR+I+G, se lo realizó mediante un análisis bootstrap con 500 réplicas (Anexo 11); en éste se observó la agrupación de varias de las morfoespecies de acuerdo a la subfamilia a la que pertenecen, encontrándose un primer grupo conformado por morfoespecies del género *Megaselia* y *Pseudohypocera* pertenecientes a la subfamilia Metopininae; un segundo grupo conformado por los géneros *Conicera* y *Dohrniphora* correspondientes a la subfamilia Phorinae; un tercer grupo conformado por los géneros *Adelopteromyia*, *Puliciphora*, *Puliciphora-Commoptera* y *Cyphocephalus*, pertenecientes a la subfamilia Metopininae y el último a Chonocephalinae; y un cuarto grupo conformado por dos especies de *Puliciphora* (*Puliciphora* MEPN 3 y *P. borinquenensis*). Sin embargo, estos dos últimos grupos visualizados presentan ramas muy largas en comparación a los grupos externos, lo cual constituye un factor limitante dentro del análisis de estas secuencias, pudiendo ocurrir la repulsión de grupos hermanos debido a que estos se ubican en las ramas largas del árbol (Siddall, 1998). Kück, Mayer, Wägele, & Misof (2012) mencionan que la incorporación de sitios invariantes junto con tasas de distribución aumentan la fiabilidad en las estimaciones mediante máxima verosimilitud, indicando así un correcto análisis de los datos en el presente estudio, ya que el modelo de sustitución elegido incluyó una proporción de sitios invariantes y distribución gamma.

Los valores de soporte del 99 % en las terminales de las ramas largas, indican la presencia de dos especies claramente definidas, *Puliciphora-Commoptera* MEPN 1 y *Puliciphora-Commoptera* MEPN 3. Se puede asumir además, la posibilidad de que *Puliciphora* constituya un grupo parafilético, observándose a *Puliciphora* MEPN 3

más emparentada a *P. borinquenensis* que con el resto de morfoespecies del mismo género. Reportes generados por BLASTn indican que las secuencias *Puliciphora-Commoptera* MEPN 3, *Puliciphora-Commoptera* MEPN 3.1, *Puliciphora-Commoptera* MEPN 1 y *Puliciphora-Commoptera* MEPN 1.1 tienen un parentesco con secuencias de *Megaselia* sp. (Anexo 10), sin embargo, los valores con respecto al QC e Identidad son relativamente bajos (QC de 95 – 97 %, Identidad de 80 – 85 % y valor-E de $2e-180$ - $4e-137$), en cuanto a los valores óptimos que indican una alta homología entre especies (Identidad > 98 %, valor-E ≤ 0.01) (Altschul, *et al.*, 1997; James-Kewnt, 2002), por tanto se asume que esta relación es indicativa de que las morfoespecies analizadas pertenecen a la subfamilia Metopininae. Por otro lado análisis en BLAST de *Puliciphora-Commoptera* MEPN 2, muestran una considerable relación de homología con la especie *Lutzomyia peruensis* (familia Psychodidae) con un QC de 99 %, Identidad de 81 % y valor-E de $1e-89$, esta relación posiblemente generada debido a la falta de información genética de la secuencia obtenida, ya que el fragmento del gen *COI* del individuo constó de tan solo 425 pb; sin embargo, su posición en el árbol filogenético lo agrupa con secuencias del género *Cyphocephalus*, concluyendo así la correspondencia de *Puliciphora-Commoptera* MEPN 2 con la familia Phoridae.

En cuanto a las morfoespecies de *Puliciphora* se observa a cada una de ellas ocupando sitios distintos en el árbol, siendo clara las diferencias moleculares entre ellas. Reportes del BLASTn indican que *Puliciphora* MEPN 3 y *Puliciphora* MEPN 2 tienen parentesco con individuos de *Megaselia* sp. (Anexo 10), con valores de QC de 93 – 96%, Identidad de 85 – 86 %, y valor-E de 0, asumiendo de igual manera esta relación, indicativa de géneros pertenecientes a la subfamilia Metopininae. Por el contrario

resultados del alineamiento de *Puliciphora* MEPN 1 en BLASTn, indican varias secuencias emparentadas del orden Díptera, Coleóptera y Lepidóptera, con un QC de 93 – 100 %, Identidad de 81 – 82 % y valor-E de 5e-161 – 1e-152; sin embargo, aparece agrupado, aunque con un valor de soporte bajo, a *Puliciphora-Commoptera* MEPN 3 dentro del árbol filogenético, asumiendo a esta morfoespecie dentro de la familia Phoridae.

Las morfoespecies de *Adelopteromyia* y *Cyphocephalus* se las considera también como posibles especies de interés para la generación de códigos de barras, ya que su presencia en el árbol filogenético muestra agrupamientos con las demás morfoespecies de Phoridae (Anexo 11). Reportes en cuanto al alineamiento de *Adelopteromyia* en BLASTn señalan una relación de parentesco con secuencias de *Megaselia* sp. (QC de 92 – 99 %, Identidad de 84 – 85 % y valor-E de 0), señalando así su correspondencia a la subfamilia Metopininae. Mientras que para las morfoespecies de *Cyphocephalus* los resultados del BLASTn muestran el parentesco con especies del Orden Lepidóptera QC de 84 y 97 %, Identidad de 79 y 83 %, y valor-E de 5e-106 y 6e-170, respectivamente para *Cyphocephalus* MEPN 1 y *Cyphocephalus* MEPN 2; los bajos valores de Identidad y valor-E no son determinantes en las relaciones de parentesco, por lo que las secuencias de *Cyphocephalus* propuestas, constituyen los primeros reportes de especies pertenecientes a la subfamilia Chonocephalinae basados en fragmentos de *COI*.

Debido a las ramas largas presentes en los géneros antes mencionados, análisis posteriores se realizaron únicamente con géneros de la subfamilia Metopininae y Phorinae, con el fin de adquirir una mejor estructura del árbol filogenético (Figura 10).

Árbol filogenético de máxima verosimilitud de Metopininae y Phorinae

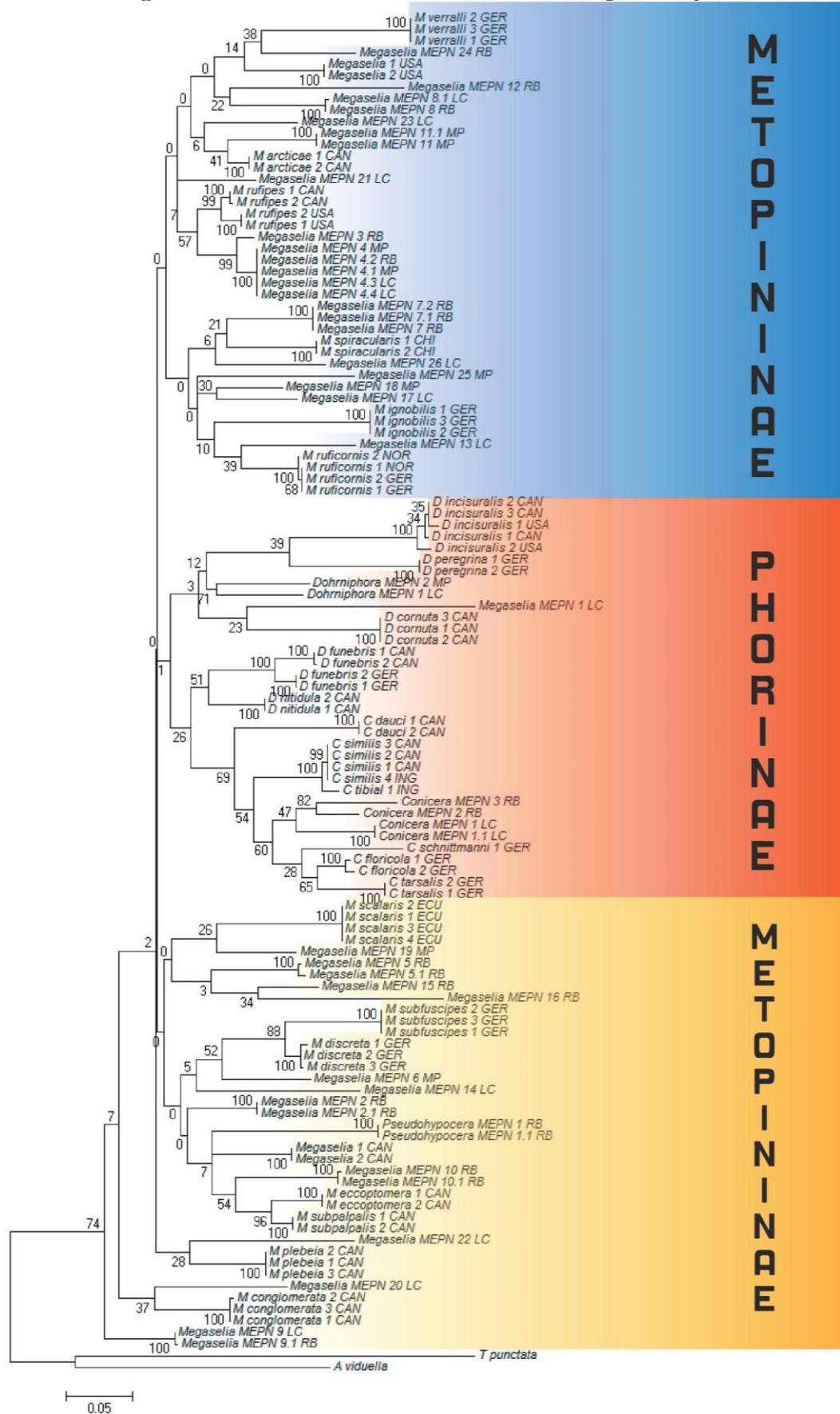


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud. Modelo GTR+I+G y Bootstrap con 500 réplicas. Evidencia del género *Megaselia* como grupo parafilético.

Fuente: Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013).

En éste nuevo árbol se puede observar la presencia de tres clados distintos, acordes a la subfamilia a la que pertenecen cada género, encontrándose a *Megaselia* como un grupo parafilético de la subfamilia Metopininae (1° y 3° clado), corroborando así a esclarecer la duda que se tiene de *Megaselia* como grupo monofilético con respecto a los demás géneros de Phoridae (Häggqvist, *et al.*, 2015). Sin embargo, Hartop & Brown (2014) mencionan la necesidad de mayores estudios en la descripción y abundancia de *Megaselia* a fin de contribuir a un mayor progreso taxonómico del género. Secuencias del género *Pseudohypocera* MEPN 1 se muestran evidentemente como una especie definida, apoyados en un valor de soporte del 100 %, aunque su relación de parentesco con otras secuencias, no se encuentra resuelto (valor de Bootstrap bajo), su ubicación en el árbol junto con secuencias de *Megaselia*, indican su correspondencia dentro de la subfamilia Metopininae.

Por otra parte, se observa a *Megaselia* MEPN 1 dentro del grupo de secuencias de la subfamilia Phorinae (2 ° clado), sin embargo, los valores de soporte que sustentan este parentesco, son relativamente bajos, siendo necesarios mayores análisis.

(c). Análisis bayesiano

Para la construcción del árbol filogenético mediante inferencia bayesiana, se procedió a realizar el análisis por separado de las secuencias pertenecientes a la subfamilia Metopininae y Phorinae, ya que para cada una de ellas se escogieron los modelos evolutivos adecuados, de acuerdo con el set de datos alineados.

Para la subfamilia Metopininae, los resultados de la selección de los modelos evolutivos a través del programa PartitionFinder v 2.1.1 (Lanfear, *et al.*, 2016), señalan

como modelo óptimo a GTR+I+G+X, con los siguientes valores de criterios de selección: logaritmo de verosimilitud = -8748.88867188, valor del estadístico BIC (bayesian information criterion) = 18640.4256404, y número de parámetros = 175. En el árbol filogenético generado (Figura 11) se observan varios clados agrupando a diferentes morfoespecies y secuencias del Genbank correspondientes a *Megaselia*, evidenciando así, la amplia diversidad de individuos de *Megaselia* como uno de los géneros más abundantes de la familia Phoridae (Brown B. V., 2010; Hartop & Brown, 2014; Häggqvist, *et al.*, 2015). En el primer subgrupo constituido por individuos de *Megaselia* MEPN 4, se observa una estrecha relación con *Megaselia* MEPN 3, planteando la posibilidad de que esta última morfoespecie corresponda a la primera (basados en la escala del árbol de 0.05), sin embargo, los análisis de su divergencia interespecífica muestran una distancia del 2.82 %, demostrándose así la presencia de dos morfoespecies distintas.

Los análisis de máxima verosimilitud que indicaron la relación de *Megaselia* MEPN 1 con individuos de Phorinae, fueron totalmente resueltos en los análisis bayesianos, mostrando una mejor organización con los demás individuos de *Megaselia*, además de que reportes del BLASTn indican su parentesco con *Megaselia* sp. (QC de 96 %, Identidad de 88 % y valor-E de 0). Por otro lado se observan a *Megaselia* MEPN 12 y *Megaselia* MEPN 22 en un grupo completamente separado de las demás morfoespecies de *Megaselia* analizadas, ambas con una distancia genética promedio de 18,3 y 17,61 %, respectivamente, razón por la cual se encuentran menos emparentadas a las morfoespecies restantes, sin embargo, muestran una estrecha relación, con una probabilidad posterior de 1, a *M. ignobilis* y *M. veralli*; reportes del BLASTn señalan su parentesco con secuencias de *Megaselia* sp. (Anexo 10).

Árbol filogenético por el método bayesiano de la Subfamilia Metopininae

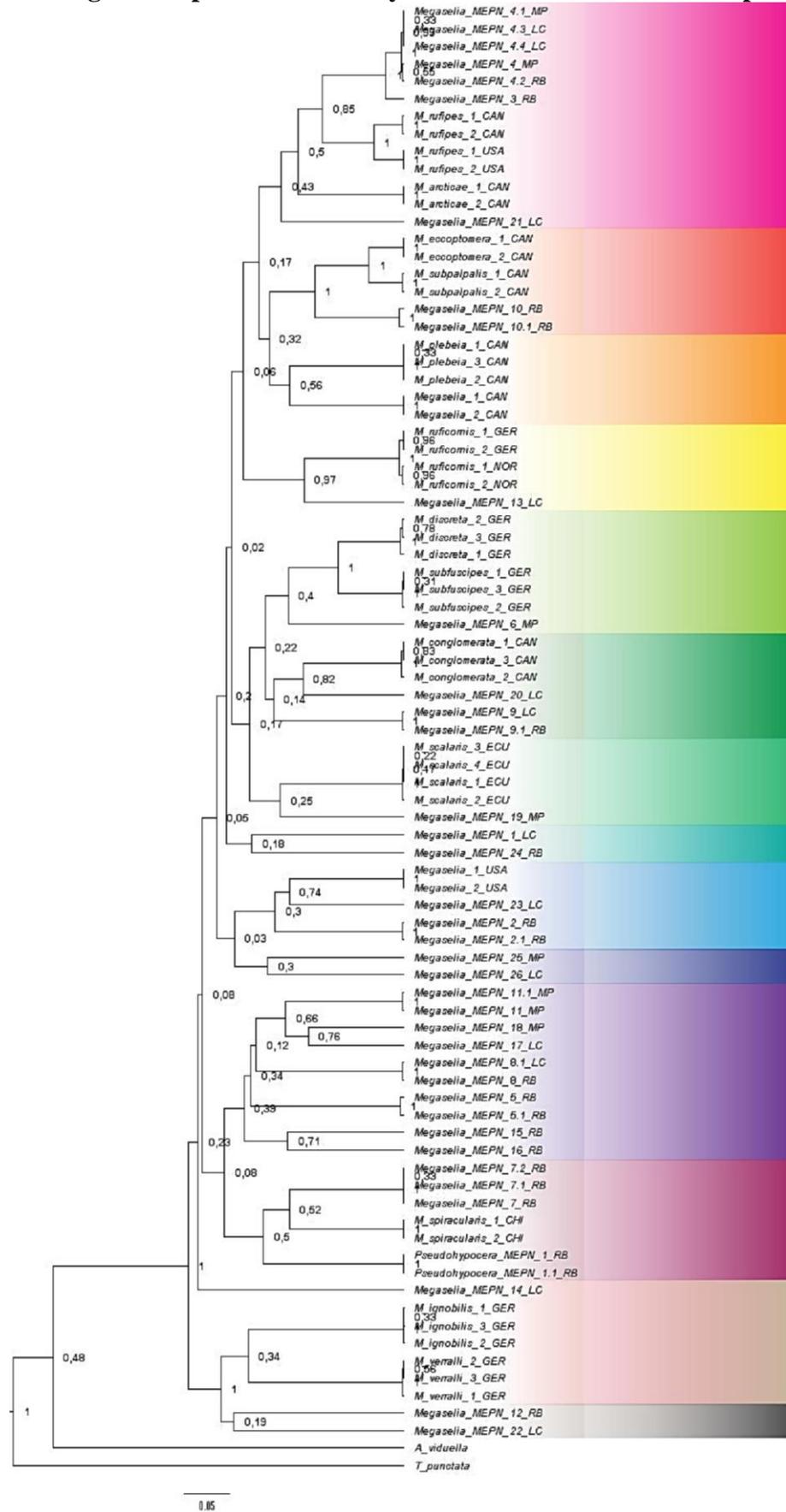


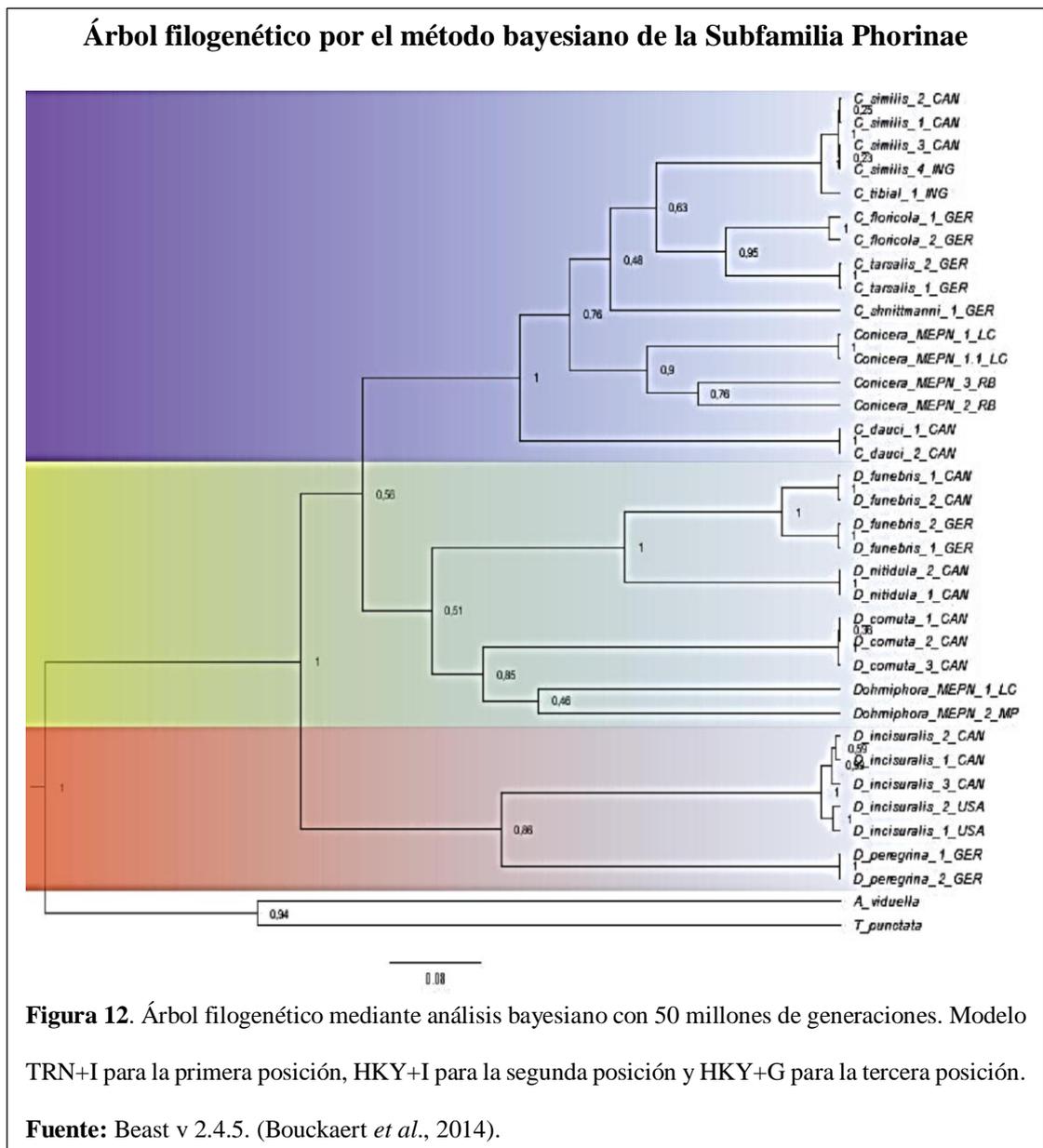
Figura 11. Árbol filogenético mediante análisis bayesiano con 600 millones de generaciones, y modelo GTR+I+G+X. Los colores representan a los distintos grupos formados dentro de Metopininae

Fuente: Beast v 2.4.5. (Bouckaert *et al.*, 2014)

En cuanto a la subfamilia Phorinae, los resultados de la selección de los modelos evolutivos a través del programa PartitionFinder v 2.1.1 (Lanfear *et al.*, 2016), señalan como modelos óptimos a los siguientes: TRN+I para la primera posición, HKY+I para la segunda posición y HKY+G para la tercera posición. Los criterios considerados para la selección de estos modelos, constaron de los siguientes valores: logaritmo de verosimilitud = -3867.73873901, valor del estadístico BIC = 8303.40981686, y número de parámetros para cada modelo = 87. En el árbol filogenético generado (Figura 12), se observa un primer grupo compuesto por el género *Conicera*, el cual se muestra como un grupo monofilético, con una probabilidad posterior de 1; dentro de este grupo se encuentra a individuos de *Conicera* MEPN 1 como una especie definida, y emparentada a *Conicera* MEPN 2 y *Conicera* MEPN 3. La relación entre estos dos últimos individuos (probabilidad posterior de 0.76) en comparación a la escala del árbol de 0.08, indica que se tratan de dos especies diferentes, tal y como se las identificó morfológicamente; sin embargo, la poca variación en los caracteres morfológicos observados, sumado a la baja calidad de la secuencia de *Conicera* MEPN 3 (13.1 %) (Anexo 10), plantean la hipótesis de que ambas morfoespecies correspondan a una sola, aun así la distancia interespecífica entre ambos grupos muestra un valor de 7.85 %.

Por otro lado, se puede observar un segundo y tercer grupo, ambas conformadas por individuos del género *Diplonevra* y *Dohrniphora*, donde *Dohrniphora* MEPN 1 y *Dohrniphora* MEPN 2 se encuentran emparentadas genéticamente a *Dohrniphora cornuta*, con una probabilidad posterior de 0.85. Aunque resultados en el BLASTn reportan el parentesco de *Dohrniphora* MEPN 1 a *Diplonevra nitidula* (QC 95 %, Identidad de 90% y valor-E de 0) y *Dohrniphora* MEPN 2 a *Phalacrotophora* y

Megaselia (QC 98 %, Identidad de 91 % y valor-E de 0), análisis previos mediante máxima verosimilitud con secuencias de *Diplonevra*, *Megaselia* y *Phalacrotophora*, indicaron de igual manera una mayor relación de parentesco con secuencias de *Dohrniphora*; esto sumado a la alta probabilidad posterior obtenida mediante inferencia bayesiana, son determinantes a la hora de esclarecer la correspondencia de las morfoespecies de *Dohrniphora* con su respectivo género. Hash *et al.* (2013) menciona que *Dohrniphora* representa un grupo monofilético, y que dentro del género las especies del Nuevo Mundo (regiones tropicales) son parafiléticas con respecto a las del Viejo Mundo (regiones afro-tropicales, australianas y orientales).



Conclusiones

Análisis morfológicos de las morfoespecies identificadas en el presente estudio, reportan la presencia de individuos de tres subfamilias distintas: Metopininae, Phorinae y Chonocephalinae, donde la familia Metopininae fue la más abundante, siendo *Megaselia* el género que más registros presentó en las localidades estudiadas.

Mediante análisis morfológicos se registraron 8 géneros y 37 morfoespecies, en contra parte, análisis moleculares reportaron 41 morfoespecies, siendo evidente la gran utilidad de los códigos de barras de ADN en la determinación de especies. En cuanto a los códigos de barras propuestos para la plataforma BOLDSYSTEM, se proponen a 52 secuencias (Anexo 12), de las cuales a más de presentar buena calidad en el fragmento de ADN, se tiene información morfológica, además de vouchers depositados en la Colección de Entomología del ICB-EPN. Los valores de bootstrap y probabilidades posteriores en las terminales de los árboles filogenéticos, fueron cercanos al 100 % y 1.

Los valores de las distancias genéticas intraespecíficas reportadas en el presente estudio no superan el 1 %, en tanto que las interespecíficas presentan valores que oscilan entre 3.73 – 71.68 % cuando se incluyen a los géneros *Adelopteromyia*, *Cyphocephalus*, *Puliciphora* y *Puliciphora-Commoptera*; y valores del 2.82 – 36.2 % cuando se excluyen a los géneros mencionados.

La ausencia del solapamiento en las distancias genéticas, tanto intra como interespecíficas, validan la utilidad del gen Citocromo oxidasa 1 (*COI*) para la identificación molecular de especies de la familia Phoridae.

Recomendaciones

Analizar un mayor número de caracteres morfológicos (en base a toda la literatura disponible) dentro de cada género de la familia Phoridae, tales como estructuras del tórax, abdomen y genitales, a fin de complementar a una identificación eficaz de taxones. Para el caso particular del enorme de grupo *Megaselia* es importante considerar fuentes de apoyo especializadas para la identificación de especies de éste género, tales como “New Megaselia site” de la plataforma Phorid.net.

Considerar otros métodos de preservación de los especímenes, tales como la congelación, y el uso de alcohol isopropílico absoluto o acetona, con el fin de evitar la degradación del ADN y de tal manera contribuir a la obtención de una mayor concentración del mismo, así como una elevada calidad y pureza que resulten en un análisis molecular más óptimo.

Realizar mayores análisis moleculares dentro de los grupos, es decir, obtener un mayor número de secuencias de individuos de la misma especie, a fin de contribuir a un análisis más exhaustivo de las divergencias intraespecíficas, así como también analizar las diferencias moleculares que presentan a nivel geográfico, colaborando así a futuros planes de conservación de la riqueza biológica de las localidades en estudio.

Tomar en cuenta que los códigos de barras de ADN y sus análisis en árboles filogenéticos, son útiles para la identificación de especies; si se requieren estudios genéticos más detallados, como construcción de filogenias, los códigos de barras de ADN pueden constituir puntos de partida para la selección óptima de taxones, y formar parte del conjunto de secuencias necesarias para los análisis mencionados.

Referencias

- Albores-Ortiz, O., & Sosa, V. (2006). Polinización de dos especies simpátricas de *Stelis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Acta botánica mexicana*(74), 155-168.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
- Álvarez, J. M., Menalled, F., & Hoy, M. (2005). Las herramientas moleculares en el control biológico. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*(74), 4-11.
- Ament, D. C. (2017). Phylogeny of Phorinae sensu latu (Diptera: Phoridae) inferred from a morphological analysis with comprehensive taxon sampling and an uncommon method of character coding. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 181(1), 151-188.
- Ament, D. C., & Brown, B. V. (2016). Family Phoridae. *Zootaxa*, 4122(1), 414-451.
- Arima, E. Y., Barreto, P., Araújo, E., & Soares-Filho, B. (2014). Public policies can reduce tropical deforestation: Lessons and challenges from Brazil. *Land Use Policy*, 41, 465-473.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Boston, Estados Unidos: Springer US.
- Banco Nacional de ADN Carlos III. (2016). *Programa control de calidad de muestras*. Obtenido de <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- Barcode of life. (2017). *What Is DNA Barcoding?* Obtenido de <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>

- Boehme, P., Amendt, J., & Disney, R. H. (2010). Molecular identification of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. *International Journal of Legal Medicine*, 124, 577-581.
- Borba, E. L., & Semir, J. (2001). Pollinator Specificity and Convergence in Fly-pollinated Pleurothallis(Orchidaceae) Species: A Multiple Population Approach. *Annals of Botany*, 88(1), 75-88.
- Bouckaert, R. R., Heled, J., Kuehnert, D., Vaughan, T. G., Wu, C.-H., Xie, D., . . . Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003537.
- Brown, A. D., & Kappelle, M. (2001). *Introducción a los bosques nublados del neotrópico: Una síntesis regional*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: INBio.
- Brown, B. V. (2004). Revision of the subgenus Udamochiras of Melaloncha bee-killing flies (Diptera: Phoridae: Metopininae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140(1), 1-42.
- Brown, B. V. (2010). Phoridae. En B. V. Brown, A. Borkent, J. M. Cumming, D. M. Wood, N. E. Woodley, & M. Zumbado, *Manual of Central American Diptera* (págs. 725-752). Canada: NRC Research Press.
- Brown, B. V. (2017). *Phorid.net, online data phorid flies*. Recuperado el junio de 2017, de <http://www.phorid.net/>
- Brown, B. V., & Feener, D. H. (1991). Behavior and Host Location Cues of Apocephalus paraponerae (Diptera: Phoridae), a Parasitoid of the Giant Tropical Ant, Paraponera clavata (Hymenoptera: Formicidae). *Biotropica*, 23(2), 182-187.

- Brown, B. V., & Feener, D. H. (1995). Efficiency of two mass sampling methods for sampling phorid flies (Diptera: Phoridae) in a tropical biodiversity survey. *Contributions in Science*, 459, 1-10.
- Brown, B. V., & Kung, G. A. (2006). Review of the Caribbean species of *Dohrniphora* Dahl (Diptera: Phoridae). *Journal of Natural History*, 40(32-34), 1931-1945.
- Brown, B. V., & Kung, G. A. (2007). Revision of the New World *Dohrniphora* Dahl Species with Hind Tibial Setae (Diptera: Phoridae). *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 65(2), 157-237.
- Brown, B. V., & Smith, P. T. (2010). The bee-killing flies, genus *Melaloncha* Brues (Diptera: Phoridae): a combined molecular and morphological phylogeny. *Systematic Entomology*, 35(4), 649-657.
- Brown, B. V., Amorim, D., & Kung, G. (2015). New morphological characters for classifying Phoridae (Diptera) from the structure of the thorax. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 173, 424–485.
- Cabezas, M. B. (2012). *Diversidad del Género Drosophila (Díptera, Drosophilidae) en dos bosques nublados de las Estribaciones Occidentales ecuatorianas, Estación Científica Río Guajalito (Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador) y Reserva Intillacta (Pichincha, Ecuador)*. Tesis de grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Carles-Tolrá, M. (2007). Phoridae: familia nueva de dípteros para Andorra (Diptera, Phoridae). *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 419-422.
- Carles-Tolrá, M. (2015). Orden Diptera. *IDEA-SEA*(63), 1-22.
- Castaño, T., Sánchez, P., Viana, L., Correa, M., Gutiérrez, L., & Zapata, M. (2011). Comparación de los métodos de preservación de especímenes Anopheles

- (Diptera: Culicidae) para la extracción de ADN. *Revista Salud Uninorte*, 27(1), 36-48.
- Cisneros-Heredia, D. F. (2006). *La Herpetofauna de la Estación de Biodiversidad Tiputini, Ecuador: Diversidad y Ecología de los Anfibios & Reptiles de una Comunidad Taxonómicamente Diversa*. B. S. Proyecto Final, Universidad San Francisco de Quito, Quito.
- Cook, C. E., & Mostovski, M. B. (2002). 16S mitochondrial sequences associate morphologically dissimilar males and females of the family Phoridae (Diptera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 77(2), 267-273.
- Damián, P., González, L., López, A., & Espino, N. (2013). *Manual de Prácticas de laboratorio Técnicas Básicas de Biología Molecular*. México, D.F: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- De la Cruz, J. (2005). *Entomología: morfología y fisiología de los insectos*. Palmira, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- De Mas Castroverde, E. (2007). *Evaluación y Predicción de la Biodiversidad. Un modelo con Araneidos en el Parque Natural del Cadí-Moixeró*. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Dhaliwal, A. (2013). Extraction and purification of DNA. *Materials and Methods*, 3, 191.
- Disney, R. H. (1983). Four new species of Dohrniphora (Diptera: Phoridae) from Panama. *Insect Systematics and Evolution*, 14(4), 452-456.
- Disney, R. H. (1994). *Scuttle Flies: The Phoridae*. Cambridge, Reino Unido: Springer Science & Business Media.

- Disney, R. H. (1998). Family Phoridae. En L. Papp, & B. Darvas, *Contributions to a Manual of Palaearctic Diptera (with special reference to flies of economic importance)* (págs. 51-79). Budapest, Hungría: Science Herald.
- Disney, R. H., & Sinclair, B. J. (2008). Some Scuttle Flies (Diptera: Phoridae) of the Galápagos Islands. *Tijdschrift voor Entomologie*, 151(1), 115-132.
- Disney, R. H., García, A., Lindström, A., & Manlove, J. (2014). Further occurrences of *Dohrniphora cornuta* (Bigot) (Diptera, Phoridae) in forensic cases indicate likely importance of this species in future cases. *Forensic Science International*, 241, 20-22.
- Disney, R. H., Neoh, K. B., & Lee, C. L. (2009). A New Species of Scuttle Fly (Diptera: Phoridae) Parasitizing a Termite (Isoptera: Termitidae) in Malaysia. *Sociobiology*, 54(1), 89-94.
- Disney, R. H., Zvereva, E., & Mostovski, M. (2001). A scuttle fly (Diptera: Phoridae) parasitizing a beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in Russia. *Entomologica Fennica*, 12, 59-63.
- Dodson, C. H., & Gentry, A. (1978). Flora of the Rio Palenque Science Center, Los Rios Province, Ecuador. *Selbyana*, 4(1-6), 1-628.
- Dodson, C. H., & Gentry, A. H. (1991). Biological Extinction in Western Ecuador. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 78(2), 273-295.
- Durska, E. (2013). Effects of disturbances on scuttle flies (Diptera: Phoridae) in Pine Forests. *Biodiversity and Conservation*, 22(9), 1991-2021.
- Fadamiro, H. Y., & Chen, L. (2005). Utilization of aphid honeydew and floral nectar by *Pseudacteon tricuspis* (Diptera: Phoridae), a parasitoid of imported fire ants, *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae). *Biological Control*, 34(1), 73-82.

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Frederick, M., Ausubel, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., . . . Sharp, P. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. Cambridge, Reino Unido: John Wiley and Sons.
- García, C. (2014). *Estudio faunístico y ecológico de la familia Phoridae Latreille, 1796 (Insecta, Diptera) en el P.N. del Montseny*. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- García-Morrás, J. A., Alcántara, A., Ferragut, F. J., Gea, F. J., Navarro, M. J., & López, J. A. (2000). Determinación y abundancia estacional de las poblaciones de dípteros (Diptera: Phoridae y Sciaridae) en los cultivos de champiñón en Castilla-La Mancha (España). *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 26(4), 527-536.
- Garrido, T., & Vázquez, E. (2013). Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(3), 1031-1054.
- Gentry, A. (1982). Patterns of Neotropical Plant Species Diversity. En M. K. Hecht, B. Wallace, & G. T. Prance, *Evolutionary Biology* (págs. 1-84). Boston, Estados Unidos: Springer US.
- Gibson, J. F., Kelso, S., Jackson, M. D., Kits, J. H., Miranda, G. F., & Skevington, J. H. (2011). Diptera-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification Primers of Use in Molecular Phylogenetic Research. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(5), 976-997.

- Goloboff, P. A., Farris, J. S., & Nixon, K. C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24(5), 774-786.
- Gregory, T. R. (2005). DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*, 434(7037), 1067-1067.
- Häggqvist, S., Ulefors, S. O., & Ronquist, F. (2015). A new species group in *Megaselia*, the lucifrons group, with description of a new species (Diptera, Phoridae). *ZooKeys*, 512, 89-108.
- Hamilton, L. S., Juvik, J., & Scatena, F. N. (1995). The Puerto Rico Tropical Cloud Forest Symposium: Introduction and Workshop Synthesis. En L. S. Hamilton, J. Juvik, & F. N. Scatena, *Tropical Montane Cloud Forests. Ecological Studies 10* (págs. 1-23). Berlín, Alemania: Springer Verlag.
- Hamilton, P., Mouette, C., & Almendáriz, A. (2014). *Initial Analysis of Coastal Ecuadorian Herpetofauna of Dry and Moist Forests*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/254631548_Initial_Analysis_of_Coastal_Ecuadorian_Herpetofauna_of_Dry_and_Moist_Forests
- Hartop, E., & Brown, B. V. (2014). The tip of the iceberg: a distinctive new spottedwing *Megaselia* species (Diptera: Phoridae) from a tropical cloud forest survey and a new, streamlined method for *Megaselia* descriptions. *Biodiversity Data Journal*, 2, e4093.
- Harvey, M. L., Dadour, I. R., & Gaudieri, S. (2003). Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Science International*, 131(2-3), 134-139.

- Hash, J. M., Brown, B. V., Smith, P. T., & Kanao, T. (2013). A Molecular Phylogenetic Analysis of the Genus *Dohrniphora* (Diptera: Phoridae). *Entomological Society of America*, 106(4), 401-409.
- Hebert, P. D., & Gregory, T. R. (2005). The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852-859.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society*, 270(1), 96-99.
- Hubbell, S. P. (2001). *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography* (MPB-32). Reino Unido: Princeton University Press.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., & Bollback, J. P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310-2314.
- Hurlbert, S. H. (1971). The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. *Ecology*, 52(4), 577-586.
- James-Kewnt, W. (2002). BLAT—The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome research*, 12, 656-664.
- Kambhampati, S., & Smith, P. T. (1995). PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Molecular Biology*, 4(4), 233-236.
- Kapos, V., Rhind, J., Edwards, M., Price, M. F., & Ravilious, C. (2000). Developing a map of the world's mountain forest. En M. F. Price, & N. Butt, *Forests in Sustainable Mountain Development: A State-of-Knowledge Report for 2000* (págs. 4-9). Wallingford, Estados Unidos: CAB International.

- Karunaweera, N., Ihalamulla, R., & Kumarasinghe, S. (2014). *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae) can live on ripe bananas - a potential health hazard? *Ceylon Medical Journal*, 47(1), 9-10.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., . . . Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kück, P., Mayer, C., Wägele, J. W., & Misof, B. (2012). Long Branch Effects Distort Maximum Likelihood Phylogenies in Simulations Despite Selection of the Correct Model. *PLOS ONE*, 7(10), e36593.
- Labarque, F. M. (2012). *Evaluación de identificaciones taxonómicas mediante código de barras del ADN en un grupo tropical megadiverso*. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*.
- Lanteri, A. A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 66(3-4), 15-25.
- Lanteri, A. A., Loíacono, M. S., & Margaría, C. B. (2002). Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos. En C. Costa, S. Vanin, J. Lobo, & A. Melic, *Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática - Pribes 2002* (págs. 207-220). Zaragoza, España: Sociedad Entomológica Aragonesa.

- Lió, P., & Goldman, N. (1998). Models of Molecular Evolution and Phylogeny. *Genome Research*, 8, 1233-1244.
- López, J. (2004). Técnicas de Biología Molecular Aplicadas a la Taxonomía y Filogenia de Moluscos. *Spira*, 1(4), 23-33.
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring Biological Diversity*. Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- Márquez, J. (2005). Técnicas de colecta y preservación de insectos. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*(37), 385-408.
- Márquez, L., Serrato, A., & Cerritos, R. (2011). *Secuenciación de Fragmentos de ADN*. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/secuenciacion.pdf>
- Melo, M. C., Taucce, P. P., & Borba, E. L. (2011). Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 293, 161.
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*, 3(12), e422.
- Morales-Barquero, L., Borrego, A., Skutsch, M., Kleinn, C., & Healey, J. R. (2015). Identification and quantification of drivers of forest degradation in tropical dry forests: A case study in Western Mexico. *Land Use Policy*, 49, 296-309.
- Moreno, M. (2005). De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural, Sección Biológica*, 100(1-4), 45-65.
- Navarrete, L. (2010). *Distribución de las aves en las Regiones geográficas ecuatorianas*. Obtenido de <http://www.birdsinecuador.com/es/capitulo-1>

- Navarro, M. J., Escudero, A., Ferragut, F., López-Lorrio, A., & Gea, F. J. (2001). Evolución de las poblaciones de los dípteros *Megaselia halterata* y *Lycoriella auripila* (Diptera: Phoridae y Sciaridae) en el cultivo de champiñon de Castilla-La Mancha. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 27, 373-381.
- Nogueira, P. (1997). *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. São Paulo, Brasil: Editora Nogueirapis.
- Oliveira, A. (2007). *Multialinhamento de seqüências biológicas utilizando algoritmos genéticos*. São Carlos: Universidad de São Paulo.
- Palacios, W., & Jaramillo, N. (2004). Ecological forest species groups in Northeastern Ecuador and their importance for the management of indigenous forest. *Lyonia*, 6(2), 55-75.
- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. En D. M. Hillis, C. Moritz, & B. K. Mable, *Molecular Systematics* (págs. 205-247). Sunderland, MA, Estados Unidos: Sinauer Associates, Inc.
- Pardee, G. L., & Philpott, S. M. (2011). Cascading Indirect Effects in a Coffee Agroecosystem: Effects of Parasitic Phorid Flies on Ants and the Coffee Berry Borer in a High-Shade and Low-Shade Habitat. *Environmental Entomology*, 40(3), 581-588.
- Puckett, R. T., & Harris, M. K. (2010). Phorid Flies, *Pseudacteon* spp. (Diptera: Phoridae), Affect Forager Size Ratios of Red Imported Fire Ants *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) in Texas. *Environmental Entomology*, 39(5), 1593-1600.
- QIAGEN. (2006). *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*. Obtenido de http://diagnostics1.com/MANUAL/General_Qiagen.pdf

- Ratnasingham, S., & Hebert, P. (2007). Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364.
- Reibe, S., & Madea, B. (2010). Use of *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae) for post-mortem interval estimation indoors. *Parasitology Research*, 106(3), 637-640.
- Roe, A. D., & Sperling, F. A. (2007). Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 325-345.
- Romero, P., & Ramírez, R. (2011). Divergencia intraespecífica y código de barras de ADN en *Systrophia helicycloides* (Gastropoda, Scolodontidae). *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 201-208.
- Salt, G. W. (1979). A Comment on the Use of the Term Emergent Properties. *The American Naturalist*, 113(1), 145-148.
- Sarmiento, F. (2001). Los bosques nublados de Ecuador. En A. D. Brown, & M. Kappelle, *Introducción a los bosques nublados del neotrópico: Una síntesis regional* (págs. 34-36). Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: INBio.
- Schindel, D. E., & Miller, S. E. (2005). DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435(7038), 17-17.
- Siddall, M. E. (1998). Success of Parsimony in the Four-Taxon Case: Long-Branch Repulsion by Likelihood in the Farris Zone. *Cladistics*, 14, 209-220.
- Solano, J., Wolff, M., & Castro, L. (2013). Identificación molecular de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(2), 281-290.
- Suárez, J. P., Weiss, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnellid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(Pt 11), 1257-1270.

- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, *101*, 11030-11035.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729.
- Tavaré, S., & Miura, R. M. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on mathematics in the life sciences*, *17*, 57-86.
- Thermo Fisher Scientific. (2015). *Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10966034/User-Guide-Platinum-Taq-DNA-Polymerase>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *NanoDrop One. Guía del usuario*. Obtenido de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2017). *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78200.200.UL>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, *22*(22), 4673-4680.
- Uribe, S. (2013). *Fóridos (Díptera: Phoridae) asociados al hábitat de hormigas cortadoras de hojas (Atta cephalotes y Acromyrmex octospinosus) y sus patrones de localización en un bosque seco tropical andino*. Tesis de maestría,

Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/9278/>

- Uribe, S., Idárraga, J. J., & Idárraga, H. R. (2015). Primer registro de parasitoidismo de *Melaloncha ronnai* (Diptera: Phoridae) en abejas africanizadas en Colombia. *Revista Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia*, 4(2), 11-16.
- Valencia, R., Cerón, C., Palacios, W., & Sierra, R. (1999). Las Formaciones Naturales de la Sierra del Ecuador. En R. Sierra, *Propuesta Preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental* (págs. 79-108). Quito: Rimana.
- Van der Hammen, T., & Hooghiemstra, H. (2001). Historia y paleoecología de los bosques montanos andinos neotropicales. En A. D. Brown, & M. Kappelle, *Introducción a los bosques nublados del neotrópico: Una síntesis regional*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: INBio.
- Varela, R. O., & Brown, A. D. (1995). Tapires y pecaríes como dispersores de plantas de los bosques húmedos subtropicales de Argentina. *Investigación, Conservación y Desarrollo en Selvas Subtropicales de Montaña*, 129-140.
- Villamarín, S., & Mena, P. (2009). Guía de Ecosistemas del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ). En *Publicación Miscelánea No. 6. Serie de Publicaciones del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN) - Fondo Ambiental del MDMQ* (págs. 1-51). Quito, Ecuador: Imprenta Nuevo Arte.
- Wells, J. D., & Sperling, F. A. (2001). DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120(1-2), 110-115.

- Wiegmann, B. M., Trautwein, M. D., Winkler, I. S., Barr, N, ..., & Yeates, D. K. (2011). Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5690-5695.
- Young, K. R. (1990). Dispersal of *Styrax ovatus* seeds by the Spectacled Bear (*Tremarctos ornatus*). *ResearchGate*, 2(2), 68-69.
- Zehner, R., Amendt, J., Schütt, S., Sauer, J., Krettek, R., & Povolný, D. (2004). Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *ResearchGate*, 118(4), 245-247.

Anexos

Anexo 1.

Lista de caracteres morfológicos de la familia Phoridae, revisados en el presente estudio.

Caracter	Estados
1. Color cabeza del halterio	cabeza amarilla (0)
	cabeza oscura (1)
2. Color de la frente	negro mate (0)
	café oscuro (1)
	café claro/amarilla (2)
	negro, base café claro; negro, base café oscuro (3)
	negro brillante (4)
3. Color de las patas	amarillas, ápice de fémur trasero oscuro; amarillas, ápice de fémur trasero negro (0)
	café claras con mitad de fémur trasero oscuro (1)
	café oscuras dorsalmente (2)
	café claras; amarillas; amarillas con patas traseras oscuras; café claro con patas traseras oscuras (3)
4. Dirección setas supra-antenas	hacia arriba o dorsalmente (0)
	hacia abajo o ventralmente (1)
5. Engrosamiento de la vena costal	ausencia (0)
	presencia (1)
6. Espiráculo anterior	cerrado (0)
	abierto (1)
7. Espesor del cerco	delgado (menor que la mitad del ancho de la cara lateral del epandrium) (0)
	ancho (aproximadamente igual a la mitad del ancho de la cara lateral del epandrium) (1)
8. Forma triángulo ocelar	con protuberancia (0)
	simple (1)
9. Forma del postpedicelo	alargado (0)
	redondo ligeramente alargado en el ápice (en forma de gota) (1)
	redondo (2)
10. Muesca en terminalia	ausencia (0)
	presencia (1)

Anexo 1. (Continuación...)

Caracter	Estados
11. Número setas escutelares	tres pares (0)
	un par (1)
	dos pares (2)
12. Número setas supra-antenas	un par (0)
	dos pares (1)
13. Pelos en anepisternum	ausentes (0)
	presentes (1)
14. Pelos en epandrium	ausencia (0)
	presencia (1)
15. Pelos escutelares	ausentes (0)
	presentes (1)
16. Pelos en proctíger	ausencia (0)
	presencia (1)
17. Pliegue anepisternal	ausencia (0)
	presencia (1)
18. Setas en alula	menos de 7 setas en la alula (0)
	más de 7 setas en la alula (1)
19. Setas inferiores fronto-orbitales	próximas a las setas inferiores inter-frontales (0)
	distantes a las setas inferiores inter-frontales (1)
20. Setas inferiores inter-frontales	ausentes (0)
	presentes (1)
21. Setas preocelares	ausentes (0)
	presentes (1)
22. Tamaño del cerco	cerco más pequeño o igual que longitud de la cara dorsal del epandrium (0)
	cerco más grande que la longitud de la cara dorsal del epandrium (1)
23. Tamaño entre pelos del proctíger y cerco	pelos del proctíger más cortos que pelos de los cercos (0)
	pelos del proctíger igual que pelos de los cercos (1)
24. Tamaño entre setas basales y setas axilares	basales más cortas que axilares (0)
	basales iguales que axilares (1)
	basales más largas que axilares (2)
25. Tamaño entre setas basales y setas ciliares	basales más cortas que ciliares (0)
	basales iguales que ciliares (1)
	basales más largas que ciliares (2)

Anexo 1. (Continuación...)

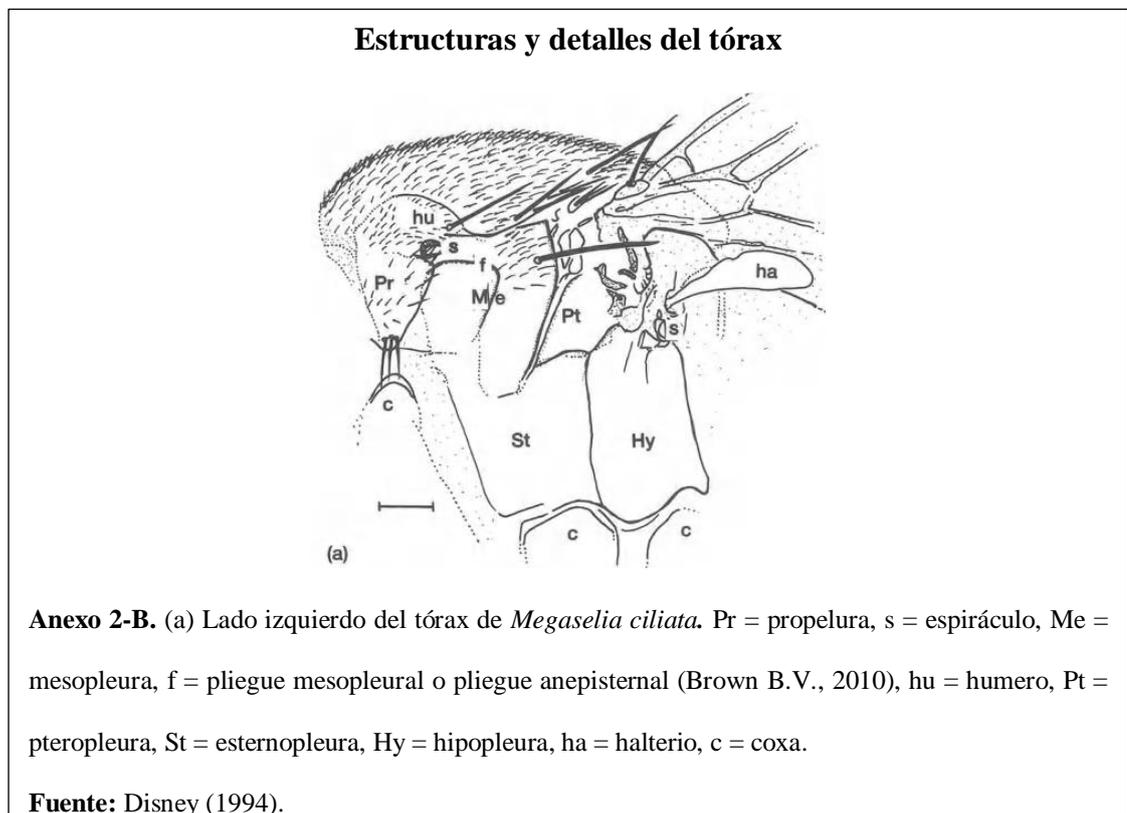
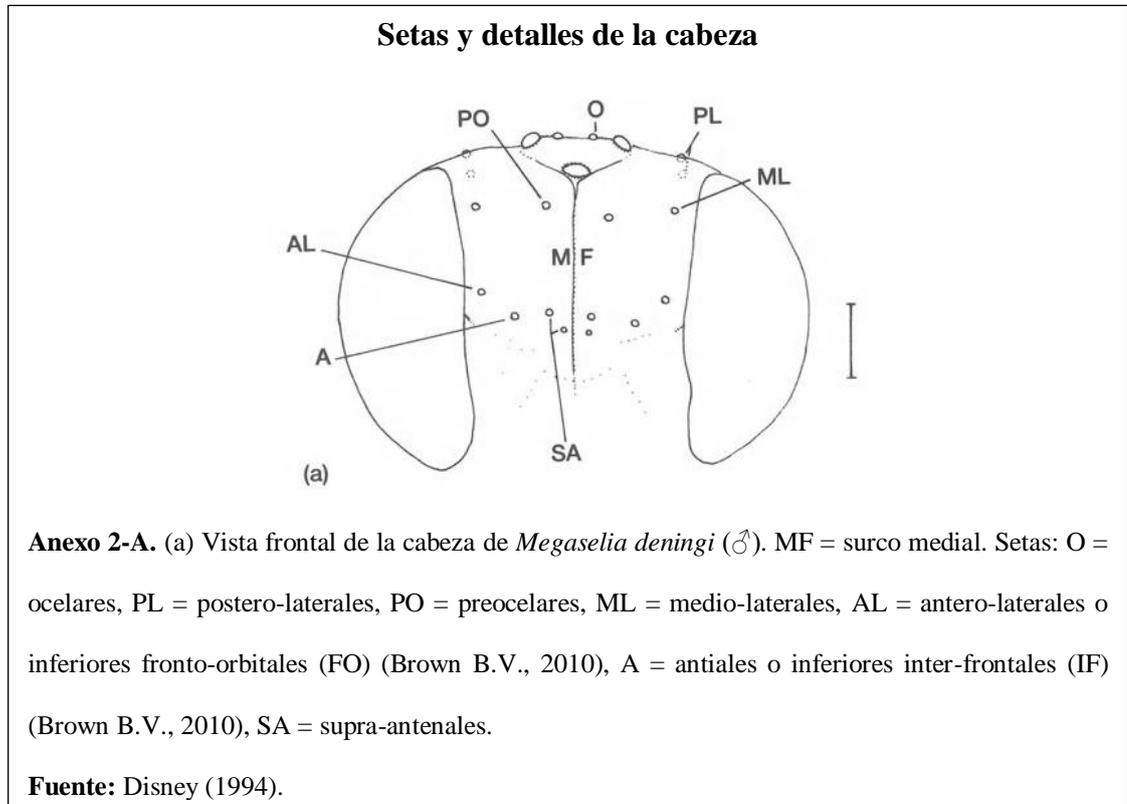
Caracter	Estados
26. Tamaño de espinas en palpos	cortas (menor o igual a longitud media del palpo) (0)
	largas (mayor a longitud media del palpo) (1)
27. Tamaño de postpedicelo	pequeño (no cubre parte de ojos o frente) (0)
	grande (cubre parte de ojos o frente) (1)
28. Tamaño de protuberancia del triángulo ocelar	menor relieve (0)
	mayor relieve (1)
29. Tamaño de setas ciliares de la vena costal	cortas (menor a altura de horquilla R_{2+3} - R_{4+5}) (0)
	largas (mayor a altura de horquilla R_{2+3} - R_{4+5}) (1)
30. Tamaño setas supra-antenas	cortas (menor a longitud media de la altura de la frente) (0)
	largas (igual o mayor a longitud media de la altura de la frente) (1)
31. Tibia media con par setas basales	ausencia (0)
	presencia (1)
32. Tibia media con seta anterior en el ápice	ausencia (0)
	presencia (1)
33. Tibia trasera con par de setas basales	ausencia (0)
	presencia (1)
34. Tibia trasera con fila de setas espinales	ausencia (0)
	presencia (1)
35. Tibia trasera con fila de setas gruesas	ausencia (0)
	presencia (1)
36. Tibia trasera empalizada	ausencia (0)
	presencia (1)
37. Ubicación setas inter-frontales	por debajo de las setas supra-antenas (0)
	en línea recta a las setas supra-antenas (1)
	por encima de las setas supra-antenas (2)
38. Vena R_{2+3}	ausencia (0)
	presencia (1)
39. Vena Sc	incompleta (0)
	completa (1)

Nota: Los caracteres morfológicos difíciles de observar debido al mal estado del individuo (presencia de polvo, partes del cuerpo dobladas o fragmentadas) se codificaron con una interrogante (?). Mientras que los caracteres morfológicos ausentes para ciertos géneros de la familia Phoridae, se los codificó con un guion bajo (_).

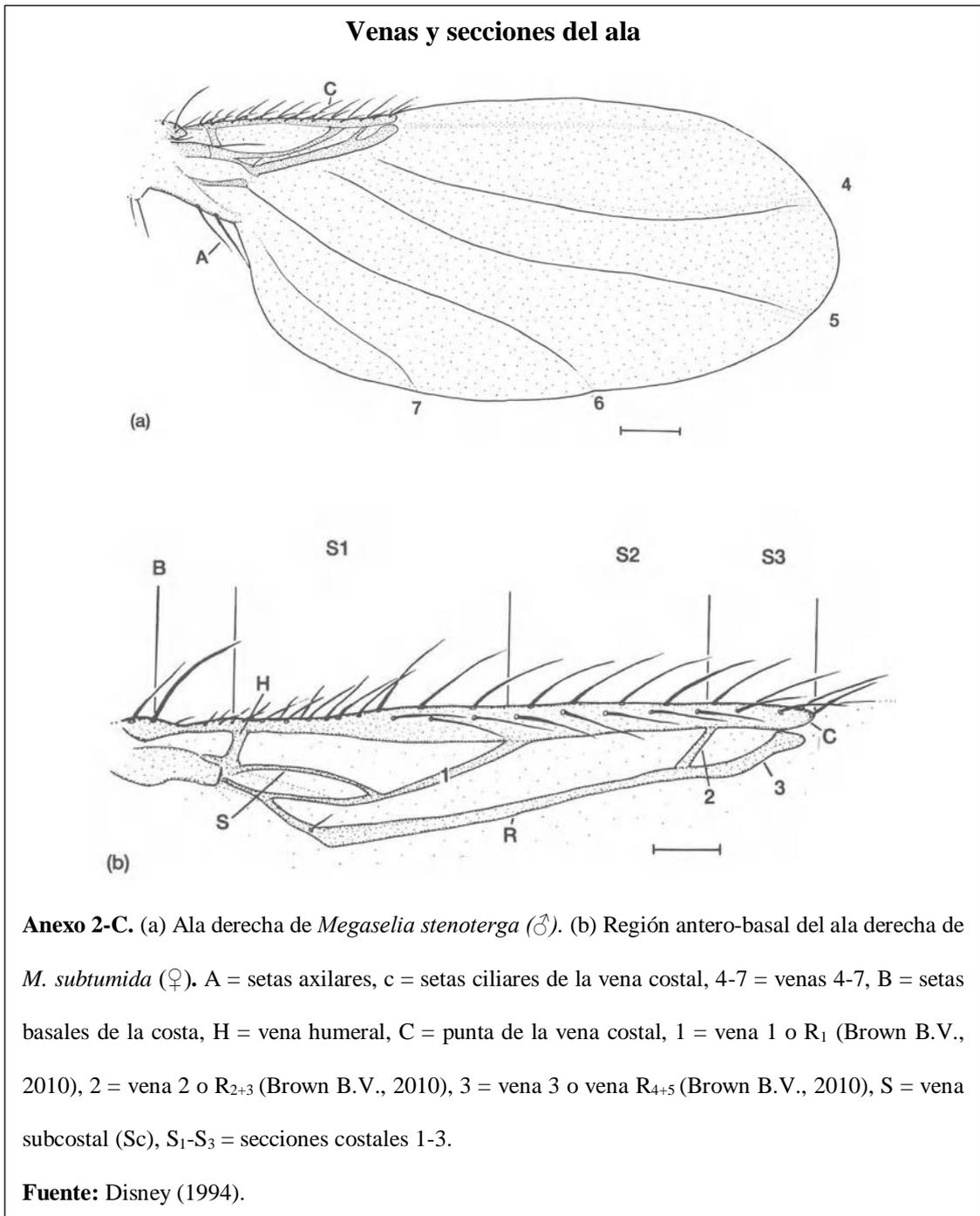
Elaborado por: El autor, 2017.

Anexo 2.

Ubicación de los caracteres morfológicos tomados en cuenta para su medición.



Anexo 2. (Continuación...)



Anexo 3.

Lista de morfoespecies, códigos y localidades de la familia Phoridae empleadas para la identificación molecular.

Muestra	Código MEPN	Género	Morfoespecie	Localidad General	Localidad Específica
1	9900	<i>Adelopteromyia</i>	MEPN_1	Mindo	Río Bravo, Estación 2
2	9911.3	<i>Conicera</i>	MEPN_1	Los Cedros	Sendero Inca
3	9911.4	<i>Conicera</i>	MEPN_1	Los Cedros	Sendero Inca
4	9912	<i>Conicera</i>	MEPN_1	Los Cedros	Sendero Inca
5	9907.2	<i>Conicera</i>	MEPN_2	Mindo	Río Bravo, Estación 2
6	9876	<i>Conicera</i>	MEPN_3	Mindo	Río Bravo, Estación 2
7	15052.2	<i>Cyphocephalus</i>	MEPN_1	Maquipucuna-Pahuma	Maquipucuna Sur
8	15055.2	<i>Cyphocephalus</i>	MEPN_2	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos
9	15045	<i>Dohrniphora</i>	MEPN_1	Los Cedros	Sendero Inca
10	15047	<i>Dohrniphora</i>	MEPN_1	Los Cedros	Sendero Inca
11	15065	<i>Dohrniphora</i>	MEPN_2	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Principal
12	9957.6	<i>Megaselia</i>	MEPN_1	Los Cedros	Sendero Inca
13	9882.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_2	Mindo	Río Bravo, Estación 2
14	9882.4	<i>Megaselia</i>	MEPN_2	Mindo	Río Bravo, Estación 2
15	9865	<i>Megaselia</i>	MEPN_3	Mindo	Río Bravo, Estación 3
16	15093	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	Maquipucuna-Pahuma	Maquipucuna Sur
17	15743	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	Maquipucuna-Pahuma	Maquipucuna Sur
18	15739	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	Mindo	Río Bravo, Estación 2
19	9925.7	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	Los Cedros	Sendero Inca
20	9925.8	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	Los Cedros	Sendero Inca
21	9886.2	<i>Megaselia</i>	MEPN_5	Mindo	Río Bravo, Estación 3

Anexo 3. (Continuación...)

Muestra	Código MEPN	Género	Morfoespecie	Localidad General	Localidad Específica
22	9886.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_5	Mindo	Río Bravo, Estación 3
23	9860	<i>Megaselia</i>	MEPN_5	Mindo	Río Bravo, Estación 2
24	15263	<i>Megaselia</i>	MEPN_6	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos
25	4080	<i>Megaselia</i>	MEPN_7	Mindo	Río Bravo, Estación 1
26	15035.1	<i>Megaselia</i>	MEPN_7	Mindo	Río Bravo, Estación 1
27	15035.2	<i>Megaselia</i>	MEPN_7	Mindo	Río Bravo, Estación 1
28	7459	<i>Megaselia</i>	MEPN_8	Mindo	Río Bravo, Estación 1
29	9961	<i>Megaselia</i>	MEPN_8	Los Cedros	Sendero Oso
30	9927.1	<i>Megaselia</i>	MEPN_9	Los Cedros	Sendero Inca
31	9890	<i>Megaselia</i>	MEPN_9	Mindo	Río Bravo, Estación 2
32	9888.4	<i>Megaselia</i>	MEPN_10	Mindo	Río Bravo, Estación 3
33	9888.5	<i>Megaselia</i>	MEPN_10	Mindo	Río Bravo, Estación 3
34	15088.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_11	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos
35	15059.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_11	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos
36	9899	<i>Megaselia</i>	MEPN_12	Mindo	Río Bravo, Estación 2
37	9966	<i>Megaselia</i>	MEPN_13	Los Cedros	Sendero Cascada
38	9925.6	<i>Megaselia</i>	MEPN_14	Los Cedros	Sendero Inca
39	9926	<i>Megaselia</i>	MEPN_14	Los Cedros	Sendero Inca
40	9903	<i>Megaselia</i>	MEPN_15	Mindo	Río Bravo, Estación 2
41	9882.5	<i>Megaselia</i>	MEPN_16	Mindo	Río Bravo, Estación 2
42	9939.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_17	Los Cedros	Sendero Inca
43	15081.2	<i>Megaselia</i>	MEPN_18	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos
44	15081.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_18	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos

Anexo 3. (Continuación...)

Muestra	Código MEPN	Género	Morfoespecie	Localidad General	Localidad Específica
45	15083	<i>Megaselia</i>	MEPN_19	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Principal
46	9939.4	<i>Megaselia</i>	MEPN_20	Los Cedros	Sendero Inca
47	9945	<i>Megaselia</i>	MEPN_21	Los Cedros	Sendero Oso
48	9914.8	<i>Megaselia</i>	MEPN_22	Los Cedros	Sendero Oso
49	9909	<i>Megaselia</i>	MEPN_23	Los Cedros	Sendero Inca
50	15037	<i>Megaselia</i>	MEPN_24	Mindo	Río Bravo, Estación 2
51	15091	<i>Megaselia</i>	MEPN_25	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Principal
52	15054	<i>Megaselia</i>	MEPN_25	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Principal
53	9928	<i>Megaselia</i>	MEPN_26	Los Cedros	Sendero Inca
54	9881.1	<i>Pseudohypocera</i>	MEPN_1	Mindo	Río Bravo, Estación 2
55	9881.2	<i>Pseudohypocera</i>	MEPN_1	Mindo	Río Bravo, Estación 2
56	9918	<i>Puliciphora</i>	MEPN_1	Los Cedros	Sendero Inca
57	15082	<i>Puliciphora</i>	MEPN_2	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos
58	15078.2	<i>Puliciphora</i>	MEPN_3	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Principal
59	9938	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_1	Los Cedros	Sendero del Río
60	9921.2	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_1	Los Cedros	Sendero del Río
61	9941.2	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_2	Los Cedros	Sendero Inca
62	9914.6	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_3	Los Cedros	Sendero Oso
63	9914.7	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_3	Los Cedros	Sendero Oso

Nota: Código MEPN, designado por el Instituto de Ciencias Biológicas de la Escuela Politécnica Nacional (ICB-EPN).

Elaborado por: El autor, 2017.

Anexo 4.

Protocolo de extracción de ADN de los especímenes de Phoridae analizados en el presente estudio.

Reactivo	Cantidad (µl)	Incubación	Centrifugación
Solución de lisis	80		
Proteinasa K	1	57 °C	
Sol. precipitación de proteínas	35		13 000 rpm por 5 min
Isopropanol	100		13 000 rpm por 5 min
Alcohol 70 %	100		13 000 rpm por 5 min
Agua	15		

Nota: El tiempo de incubación de la muestra corresponde a 2 horas.

Elaborado por: El autor, 2017.

Anexo 5.

Cantidades y concentraciones de cada reactivo empleado para la preparación del Master mix.

Reactivo	Concentración inicial	Cantidad	Concentración final
Agua milli q		18.3 µl	
Buffer PCR	10 X	2.5 µl	1 X
MgCl ₂	50 mM	1.5 µl	3 mM
dNTP's	10 mM	0.5 µl	0.2 mM
Primer forward	10 µM	0.5 µl	0.2 µM
Primer reverse	10 µM	0.5 µl	0.2 µM
Taq polimerasa	5U/µL	0.25 µl	0.05 U/µl
ADN		1 µl	
Volumen total		25 µl	

Elaborado por: Toapanta, 2017.

Fuente: Thermo Fisher Scientific, 2015.

Anexo 6.

Secuencias de *COI* de especies de Phoridae descargadas de Bold System y del Genbank.

Especie	País	Código BOLD / Genbank
<i>Conicera dauci</i>	Canadá	KR754587.1
<i>Conicera dauci</i>	Canadá	TTMDI472-10
<i>Conicera floricola</i>	Alemania	GMGRB1723-13
<i>Conicera floricola</i>	Alemania	GMGRC1346-13
<i>Conicera schnittmanni</i>	Alemania	GMGRG2520-13
<i>Conicera similis</i>	Canadá	KT076374.1
<i>Conicera similis</i>	Canadá	HPPPI481-13
<i>Conicera similis</i>	Canadá	HPPPD968-13
<i>Conicera similis</i>	Inglaterra	JN896286.1
<i>Conicera tarsalis</i>	Alemania	GMGRD798-13
<i>Conicera tarsalis</i>	Alemania	GMGRD1644-13
<i>Conicera tibial</i>	Inglaterra	GU075402.1
<i>Dohniphora cornuta</i>	Canadá	JSDIR985-11
<i>Dohniphora cornuta</i>	Canadá	JSDIR860-11
<i>Dohniphora cornuta</i>	Canadá	SMTPR691-16
<i>Dohniphora incisuralis</i>	Canadá	TTMDJ723-10
<i>Dohniphora incisuralis</i>	Canadá	TTMDI452-10
<i>Dohniphora incisuralis</i>	Canadá	TTMDI379-10
<i>Dohniphora incisuralis</i>	USA	BBDIV682-12
<i>Dohniphora incisuralis</i>	USA	BBDIV1004-12
<i>Diplonevra funebris</i>	Canadá	CNPPD1618-12
<i>Diplonevra funebris</i>	Canadá	CNPPH741-12
<i>Diplonevra funebris</i>	Alemania	GMGMN1095-14
<i>Diplonevra funebris</i>	Alemania	GMGMJ1123-14
<i>Diplonevra peregrina</i>	Alemania	GBDP15566-14
<i>Diplonevra peregrina</i>	Alemania	GBDP15567-14
<i>Diplonevra nitidula</i>	Canadá	BBDEE539-10
<i>Diplonevra nitidula</i>	Canadá	BBDEE037-10
<i>Megaselia arcticae</i>	Canadá	ASDIP056-15
<i>Megaselia arcticae</i>	Canadá	ASDIP053-15
<i>Megaselia conglomerata</i>	Canadá	CNWLO414-13
<i>Megaselia conglomerata</i>	Canadá	SSGLA4038-15
<i>Megaselia conglomerata</i>	Canadá	NGAAE143-14
<i>Megaselia discreta</i>	Alemania	GMGRF4046-13
<i>Megaselia discreta</i>	Alemania	GMGRF813-13
<i>Megaselia discreta</i>	Alemania	GMGRG156-13
<i>Megaselia eccoptomera</i>	Canadá	KT118234.1
<i>Megaselia eccoptomera</i>	Canadá	KT118234.1

Anexo 6. (Continuación...)

Especie	País	Código BOLD / Genbank
<i>Megaselia ignobilis</i>	Alemania	GMGRA618-13
<i>Megaselia ignobilis</i>	Alemania	GMGRB1197-13
<i>Megaselia ignobilis</i>	Alemania	GMGRB1606-13
<i>Megaselia plebeia</i>	Canadá	CNWLD143-12
<i>Megaselia plebeia</i>	Canadá	CNWLD076-12
<i>Megaselia plebeia</i>	Canadá	CNWLD426-12
<i>Megaselia ruficornis</i>	Noruega	DINOR051-11
<i>Megaselia ruficornis</i>	Noruega	DINOR050-11
<i>Megaselia rufipes</i>	Canadá	CNBPA134-12
<i>Megaselia rufipes</i>	Canadá	CNBPA156-12
<i>Megaselia rufipes</i>	Estados Unidos	GMGBB155-13
<i>Megaselia rufipes</i>	Estados Unidos	GMGBB454-13
<i>Megaselia spiracularis</i>	China	JQ941752.1
<i>Megaselia spiracularis</i>	China	JQ941751.1
<i>Megaselia scalaris</i>	Ecuador	QCAZI_122136 *
<i>Megaselia scalaris</i>	Ecuador	QCAZI_122135 *
<i>Megaselia scalaris</i>	Ecuador	QCAZI_122138 *
<i>Megaselia subfuscipes</i>	Alemania	GMGRE1323-13
<i>Megaselia subfuscipes</i>	Alemania	GMGRD1630-13
<i>Megaselia subfuscipes</i>	Alemania	GMGRG467-13
<i>Megaselia subpalpalis</i>	Canadá	KR697502.1
<i>Megaselia subpalpalis</i>	Canadá	KR697259.1
<i>Megaselia verralli</i>	Alemania	GMGRD098-13
<i>Megaselia verralli</i>	Alemania	GMGRD2118-13
<i>Megaselia verralli</i>	Alemania	GMGRD2631-13
<i>Megaselia</i> sp	Estados Unidos	GMGBB356-13
<i>Megaselia</i> sp	Estados Unidos	BBDIT1876-12
<i>Megaselia</i> sp	Canadá	CNPPJ228_12
<i>Megaselia</i> sp	Canadá	TTMDI782_10
<i>Puliciphora borinquensis</i>	Alemania	GU075407.1
<i>Puliciphora</i> sp	Canadá	CNPPC705-12
<i>Puliciphora</i> sp	Canadá	SMTPI664-14
<i>Puliciphora</i> sp	Canadá	SSPPA2000-15

Nota: Las secuencias marcadas con (*) corresponden a secuencias de CO1 registradas en la base de datos del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ).

Elaborado por: El autor, 2017.

Anexo 7.

Medidas en μm de caracteres morfológicos tomados en cuenta para la identificación de morfoespecies de cada género de Phoridae en estudio.

Caracteres	<i>Conicera</i> (20)	<i>Cyphocephalus</i> (8)	<i>Dohrniphora</i> (9)	<i>Megaselia</i> (114)	<i>Pseudohypocera</i> (5)	<i>Puliciphora</i> (19)	<i>Puliciphora-Commoptera</i> (22)
Longitud total individuo	1510.4 \pm 136.6	1205.2 \pm 81.7	1992.4 \pm 270.7	2250.8 \pm 524.7	2287.3 \pm 135.6	1486.9 \pm 177.3	1076 \pm 168.9
Longitud entre setas inter-frontales (IF) y fronto-orbitales (FO)	—	14.2 \pm 4.9	43.8 \pm 6	33.4 \pm 12.4	119 \pm 2.6	22.8 \pm 4.3	20.1 \pm 4
Longitud entre setas preocelares (PO) y supra-antenas (SA)	61.5 \pm 7.3	15.5 \pm 0.6	189.2 \pm 16.9	80.6 \pm 20.8	216.3 \pm 22.8	47.8 \pm 8.11	43.7 \pm 9.4
Diámetro del espiráculo anterior	24.6 \pm 5.7	11.6 \pm 1.1	48.4 \pm 3.1	35.5 \pm 9.3	89.5 \pm 39.2	20.5 \pm 5.4	20.9 \pm 5.4
Altura de la horquilla formada por R ₂₊₃ y R ₄₊₅	—	—	38.6 \pm 5.4	67.5 \pm 28.3	96 \pm 4	—	—
Tamaño entre S ₁ y S _{2-S3}	175.5 \pm 45.2	30.2 \pm 22	451 \pm 48.8	75.9 \pm 67.4	106.7 \pm 25.9	74.8 \pm 35.1	114.6 \pm 36
Tamaño de la vena costal	50 - 100	50 - 100	44.6 \pm 40.2	102.9 \pm 75.7	40 - 60	30 - 70	40 - 60

Nota: Se excluyó al género *Adelopteromyia* puesto que solo presentó 2 individuos para su medición. Los números en paréntesis representan el número de individuos medidos.

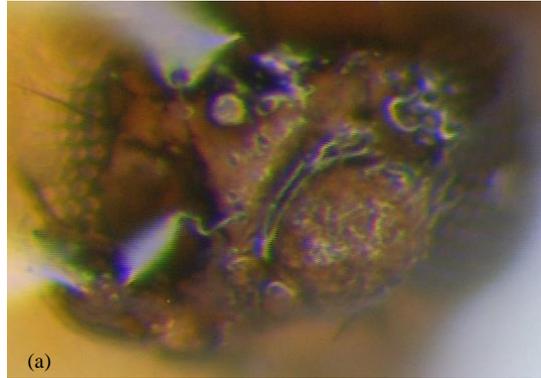
El valor del tamaño entre S₁ y S_{2-S3} corresponde a la diferencia en el tamaño entre ambas secciones. El valor del tamaño de la vena costal corresponde a la diferencia en el tamaño entre la vena costal y la longitud media del ala.

Elaborado por: El autor, 2017.

Anexo 8.

Fotografías de vista lateral (VL) y frontal (VF) de las morfoespecies de cada género de Phoridae identificados en el presente estudio.

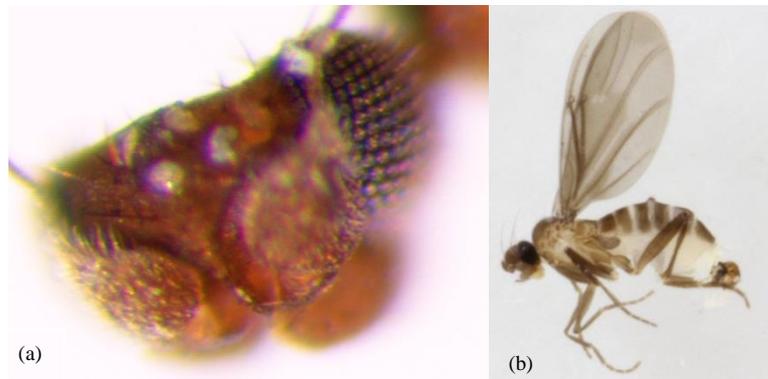
Cyphocephalus MEPN 1



Anexo 8-A. (a) VF de la cabeza de *Cyphocephalus* MEPN 1. Frente estrecha, postpedicelo grande-redondo ligeramente alargado.

Fuente: El autor, 2017.

Cyphocephalus MEPN 2



Anexo 8-B. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Cyphocephalus* MEPN 2. Frente más amplia, postpedicelo grande-redondo ligeramente alargado; vena costal igual a longitud media del ala.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

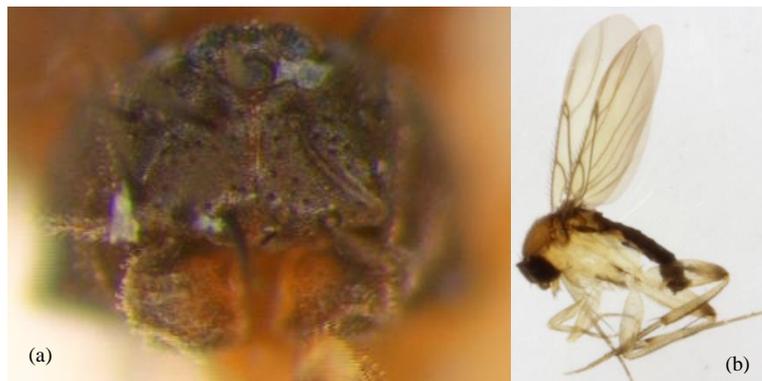
***Adelopteromyia* MEPN 1**



Anexo 8-C. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Adelopteromyia* MEPN 1. Setas frontales muy largas.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 1**



Anexo 8-D. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 1. IF diagonales a FO y cercanas a SA.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 2**

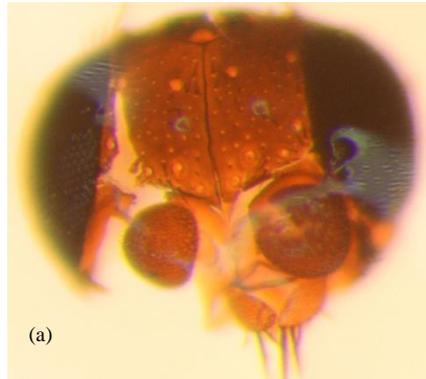


Anexo 8-E. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 2. IF próximas a FO y distantes de SA.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

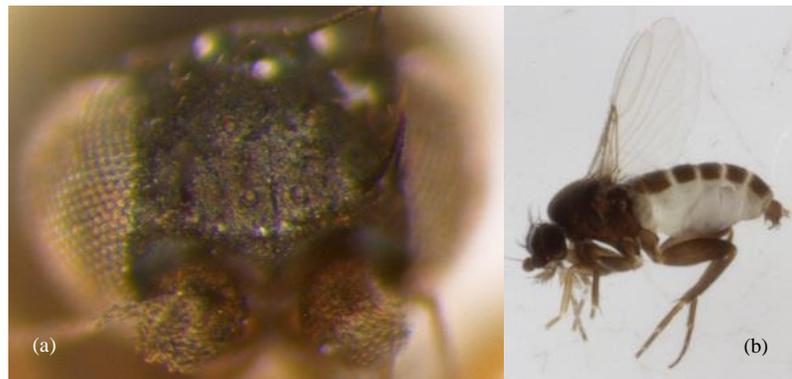
***Megaselia* MEPN 3**



Anexo 8-F. (a) VF de la cabeza de *Megaselia* MEPN 3. IF diagonales a FO; IF distantes y debajo de SA.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 4**



Anexo 8-G. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 4. S_1 igual que S_2 y S_3 ; vena Sc completa.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 5**



Anexo 8-H. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 5. S_1 más corta que S_2 - S_3 ; Sc incompleta

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

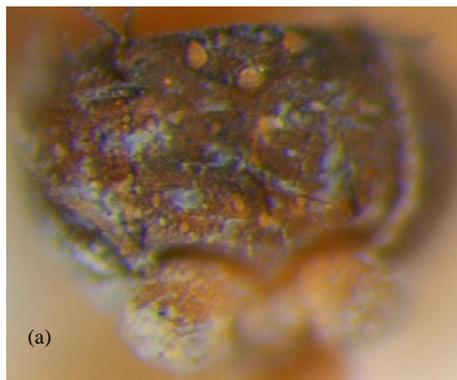
***Megaselia* MEPN 6**



Anexo 8-I. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 6. Postpedicelo pequeño-redondo ligeramente alargado.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 7**



Anexo 8-J. (a) VF de la cabeza de *Megaselia* MEPN 7. Frente café oscura; postpedicelo grande-redondo.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 8**

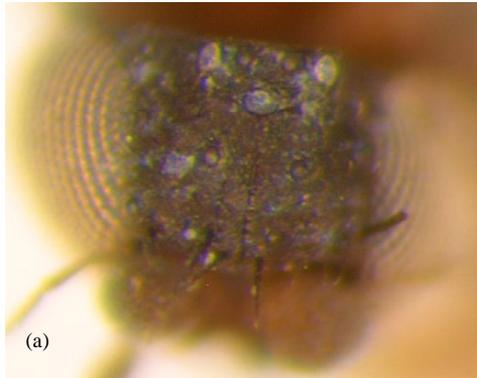


Anexo 8-K. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 8. Postpedicelo pequeño-redondo.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

***Megaselia* MEPN 9**



Anexo 8-L. (a) VF de la cabeza de *Megaselia* MEPN 9. IF diagonales y cercanas a FO; IF distantes a SA.
Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 10**



Anexo 8-M. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 10. IF cercanas a margen del ojo.
Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 11**



Anexo 8-N. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 11. IF diagonales y distantes a FO; S₁ más corta que S₂-S₃; vena costal mayor a longitud media del ala; cerco grande y grueso.
Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

***Megaselia* MEPN 13**



Anexo 8-O. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 13. IF diagonales y muy distantes a FO.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 14**



Anexo 8-P. (a) VL de *Megaselia* MEPN 14. Vena costal menor a longitud media del ala.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 15**



Anexo 8-Q. (a) VF de la cabeza de *Megaselia* MEPN 15. IF cercanas al margen del ojo.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 16**

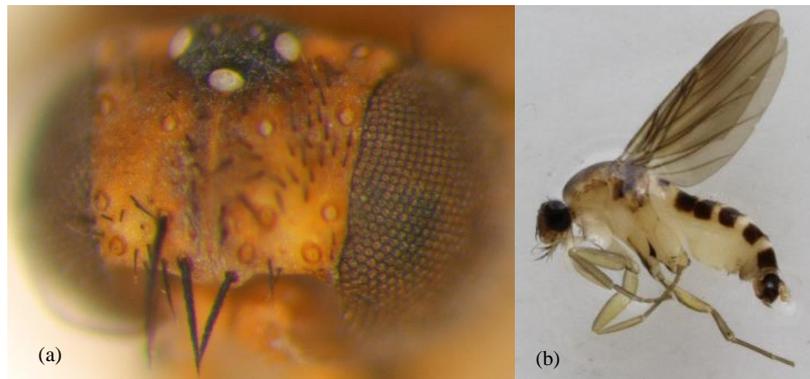


Anexo 8-R. (a) VF de la cabeza de *Megaselia* MEPN 16. IF diagonales y distantes a FO, debajo de SA.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

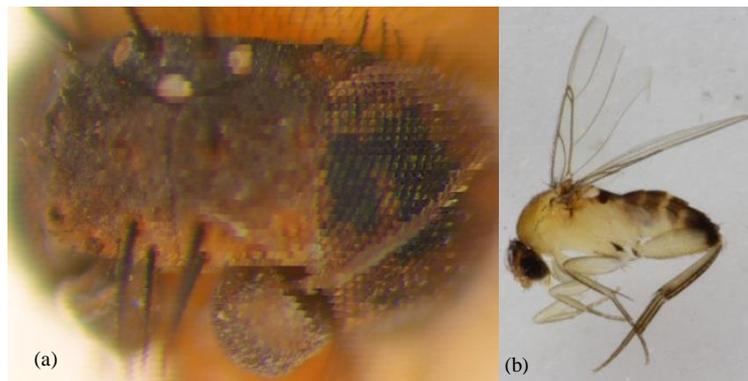
***Megaselia* MEPN 17**



Anexo 8-S. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 17. IF cercanas al margen del ojo.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 18**



Anexo 8-T. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 18. IF diagonales a FO; vena Sc incompleta.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 19**



Anexo 8-U. (a) VL de *Megaselia* MEPN 19. Vena costal mayor a longitud media del ala.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 20**

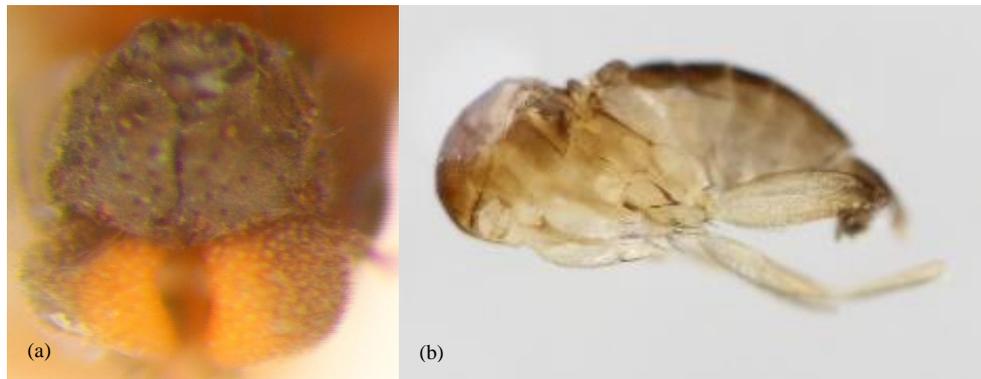


Anexo 8-V. (a) VF de la cabeza de *Megaselia* MEPN 20. IF diagonales y distantes a FO.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

***Megaselia* MEPN 24**



Anexo 8-W. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 24. Postpedicelo grande-redondo.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 25**



Anexo 8-X. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 25. IF cercanas al margen del ojo.

Fuente: El autor, 2017.

***Megaselia* MEPN 26**

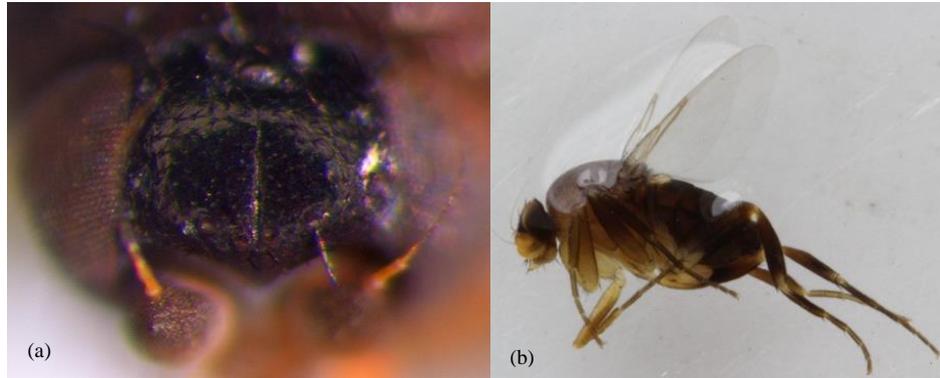


Anexo 8-Y. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Megaselia* MEPN 26. IF muy próximas a FO; S₁ menor que S₂-S₃; vena costal mayor a longitud media del ala; cerco pequeño y grueso.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

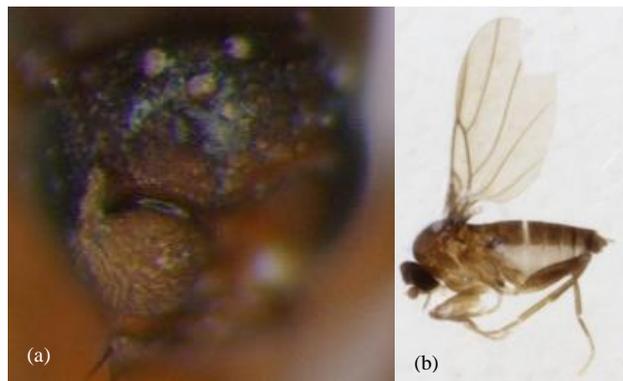
***Pseudohypocera* MEPN 1**



Anexo 8-Z. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Pseudohypocera* MEPN 1. Frente negra brillante.

Fuente: El autor, 2017.

***Puliciphora* MEPN 1**



Anexo 8-AA. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Puliciphora* MEPN 1. Postpedicelo pequeño-redondo ligeramente alargado; engrosamiento entre humeral y R₁; vena costal menor a longitud media del ala.

Fuente: El autor, 2017.

***Puliciphora* MEPN 2**

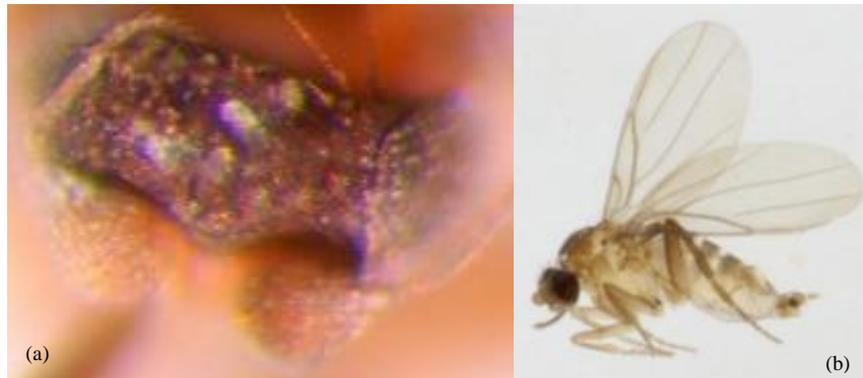


Anexo 8-AB. (a) VF de la cabeza de *Puliciphora* MEPN 2. Postpedicelo pequeño-redondo.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

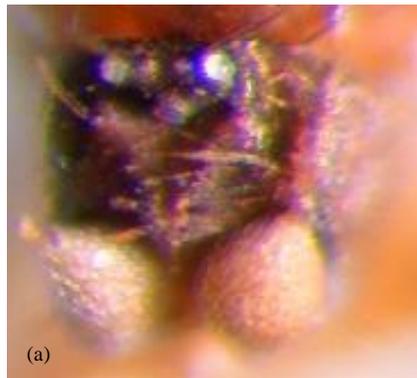
***Puliciphora* MEPN 3**



Anexo8-AC. (a) VF de cabeza y (b) VL de *Puliciphora* MEPN 3. Vena costal mayor a long. media del ala.

Fuente: El autor, 2017.

***Puliciphora-Commoptera* MEPN 1**



Anexo 8-AD. (a) VF de la cabeza de *Puliciphora-Commoptera* MEPN 1. Frente más amplia.

Fuente: El autor, 2017.

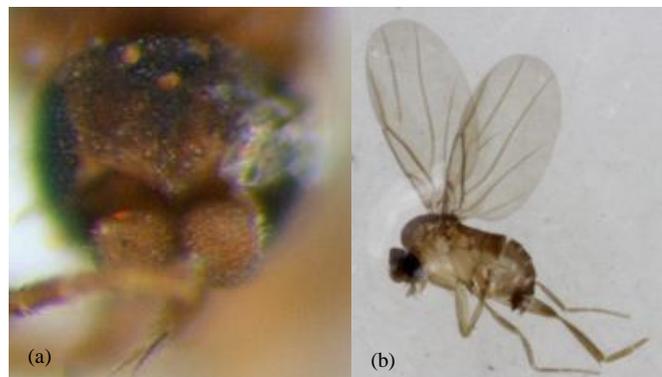
***Puliciphora-Commoptera* MEPN 2**



Anexo 8-AE. (a) VF de la cabeza de *Puliciphora-Commoptera* MEPN 2. Frente estrecha.

Fuente: El autor, 2017.

***Puliciphora-Commoptera* MEPN 3**

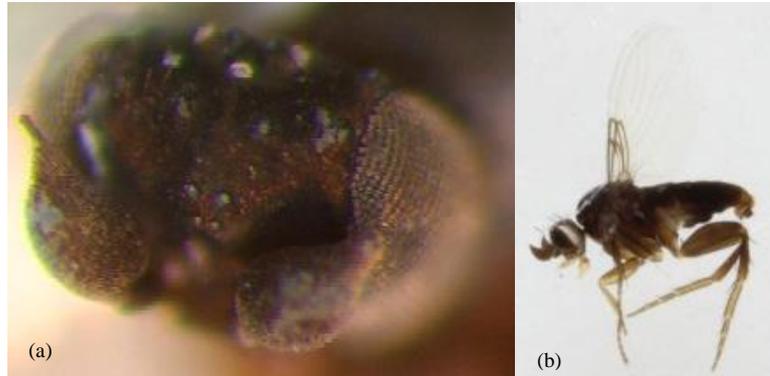


Anexo 8-AF. (a) VF de cabeza y (b) VL de *Puliciphora-Commoptera* MEPN 3. Espinas largas en palpos.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

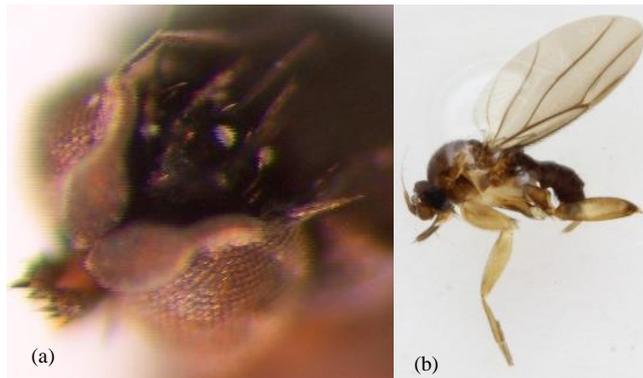
***Conicera* MEPN 1**



Anexo 8-AG. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Conicera* MEPN 1. SA distantes de PO.

Fuente: El autor, 2017.

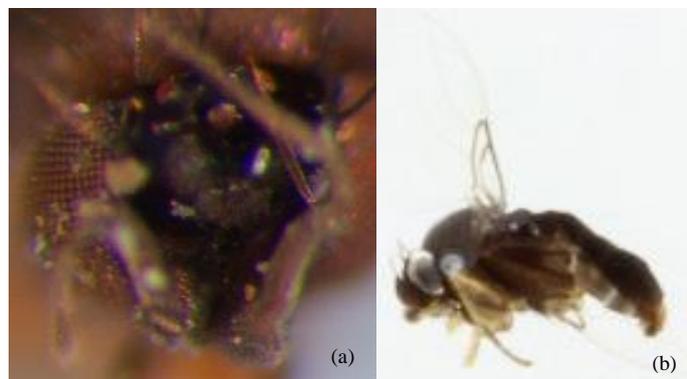
***Conicera* MEPN 2**



Anexo 8-AH. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Conicera* MEPN 2. SA menos distantes de PO.

Fuente: El autor, 2017.

***Conicera* MEPN 3**

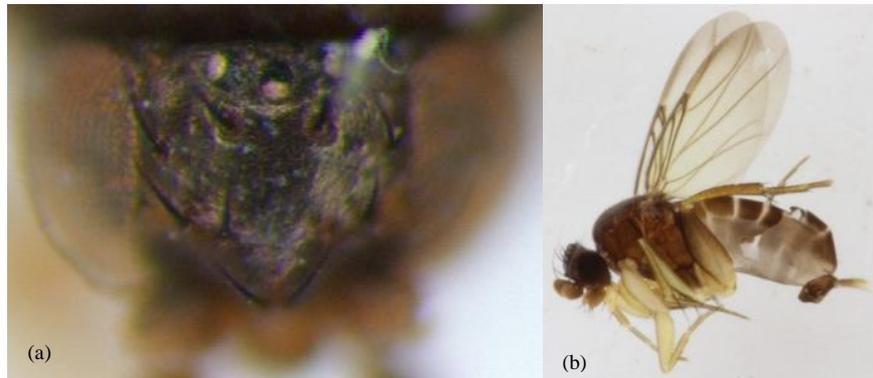


Anexo 8-AI. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Conicera* MEPN 3. SA distantes de PO; vena costal menor que longitud media del ala.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 8. (Continuación...)

***Dohrniphora* MEPN 1**



Anexo 8-AJ. (a) VF de la cabeza y (b) VL de *Dohrniphora* MEPN 1. Postpedicelo grande y alargado; vena costal igual que longitud media del ala.

Fuente: El autor, 2017.

***Dohrniphora* MEPN 2**



Anexo 8-AK. (a) VF de la cabeza de *Dohrniphora* MEPN 2. Postpedicelo alargado, más pequeño que el anterior; espinas largas en palpos.

Fuente: El autor, 2017.

Anexo 9.

Medidas de cuantificación, e índices de calidad y pureza de las muestras de ADN obtenidas en el presente estudio.

Muestra	Código MEPN	Género	Morfoespecie	Código ADN	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
1	9900	<i>Adelopteromyia</i>	MEPN_1	p128	347.20	6.944	3.659	1.90	1.65
2	9911.3	<i>Conicera</i>	MEPN_1	p122	10.85	0.217	0.092	2.35	0.69
3	9911.4	<i>Conicera</i>	MEPN_1	p123	42.97	0.859	0.272	3.15	6.16
4	9912	<i>Conicera</i>	MEPN_1	p257	19.47	0.389	0.199	1.95	1.56
5	9907.2	<i>Conicera</i>	MEPN_2	p124	-15.87	-0.317	-0.277	1.15	1.52
6	9876	<i>Conicera</i>	MEPN_3	p125	8.71	0.174	-0.053	-3.31	0.31
7	15052.2	<i>Cyphocephalus</i>	MEPN_1	p130	3.24	0.065	0.029	2.25	6.44
8	15055.2	<i>Cyphocephalus</i>	MEPN_2	p261	25.6	0.512	0.364	1.41	0.34
9	15045	<i>Dohniphora</i>	MEPN_1	p129	59.14	1.183	0.568	2.08	2.62
10	15065	<i>Dohniphora</i>	MEPN_2	p270	215.65	4.313	1.922	2.24	2.45
11	9957.6	<i>Megaselia</i>	MEPN_1	p109	88.59	1.772	0.791	2.24	2.08
12	9882.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_2	p117	68.42	1.368	0.735	1.86	0.87
13	9882.4	<i>Megaselia</i>	MEPN_2	p271	568.04	11.361	5.332	2.13	2.5
14	9865	<i>Megaselia</i>	MEPN_3	p28	4.60	0.092	0.065	1.41	0.33
15	15093	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	p31	63.58	1.272	0.593	2.14	1.24
16	15743	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	p32	46.36	0.927	0.416	2.23	0.68
17	15739	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	p265	242.77	4.855	2.242	2.17	2.34
18	9925.7	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	p81	46.37	0.927	0.515	1.8	1.65
19	9925.8	<i>Megaselia</i>	MEPN_4	p82	38.44	0.769	0.369	2.08	2.01
20	9886.2	<i>Megaselia</i>	MEPN_5	p67	441.82	8.836	4.245	2.08	2.44
21	9886.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_5	p68	19.3	0.386	0.179	2.16	1.46

Anexo 9. (Continuación...)

Muestra	Código MEPN	Género	Morfoespecie	Código ADN	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
22	9860	<i>Megaselia</i>	MEPN_5	p252	25.93	0.519	0.256	2.03	2.13
23	15263	<i>Megaselia</i>	MEPN_6	p76	30.72	0.614	0.318	1.93	1.85
24	4080	<i>Megaselia</i>	MEPN_7	p254	180.28	3.606	1.75	2.06	2.17
25	15035.1	<i>Megaselia</i>	MEPN_7	p3					
26	15035.2	<i>Megaselia</i>	MEPN_7	p251	204.95	4.099	1.88	2.18	2.58
27	7459	<i>Megaselia</i>	MEPN_8	p69	29.85	0.597	0.286	2.08	1.77
28	9961	<i>Megaselia</i>	MEPN_8	p250	196.93	3.939	1.812	2.17	2.47
29	9927.1	<i>Megaselia</i>	MEPN_9	p275	42.68	0.854	0.369	2.31	3.09
30	9890	<i>Megaselia</i>	MEPN_9	p269	32.05	0.641	0.273	2.35	1.42
31	9888.4	<i>Megaselia</i>	MEPN_10	p77	40.97	0.819	0.392	2.09	2.49
32	9888.5	<i>Megaselia</i>	MEPN_10	p78	33.64	0.673	0.317	2.12	1.93
33	15088.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_11	p7					
34	15059.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_11	p80	35.14	0.703	0.321	2.19	1.97
35	9899	<i>Megaselia</i>	MEPN_12	p120	12.19	0.244	0.097	2.5	0.64
36	9966	<i>Megaselia</i>	MEPN_13	p91	282.45	5.649	2.563	2.2	2.3
37	9925.6	<i>Megaselia</i>	MEPN_14	p83	44.01	0.88	0.446	1.97	1.79
38	9903	<i>Megaselia</i>	MEPN_15	p12					
39	9882.5	<i>Megaselia</i>	MEPN_16	p230	201.23	4.025	1.922	2.09	2.02
40	9939.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_17	p118	16.07	0.321	0.148	2.17	0.78
41	15081.2	<i>Megaselia</i>	MEPN_18	p2					
42	15081.3	<i>Megaselia</i>	MEPN_18	p131/2	27.93	0.559	0.264	2.11	3.92
43	15083	<i>Megaselia</i>	MEPN_19	p71	58.21	1.164	0.544	2.14	1.78
44	9939.4	<i>Megaselia</i>	MEPN_20	p272	73.86	1.477	0.669	2.21	2.82

Anexo 9. (Continuación...)

Muestra	Código MEPN	Género	Morfoespecie	Código ADN	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
45	9945	<i>Megaselia</i>	MEPN_21	p273	421.19	8.424	3.896	2.16	2.15
46	9914.8	<i>Megaselia</i>	MEPN_22	p101	28.41	0.568	0.26	2.18	3.14
47	9909	<i>Megaselia</i>	MEPN_23	p253	27.38	0.548	0.269	2.03	2.16
48	15037	<i>Megaselia</i>	MEPN_24	p73	28.03	0.561	0.261	2.14	1.5
49	15091	<i>Megaselia</i>	MEPN_25	p75	18.93	0.379	0.201	1.88	1.13
50	9928	<i>Megaselia</i>	MEPN_26	p89	349.63	6.993	3.2	2.19	2.61
51	9881.1	<i>Pseudohyocera</i>	MEPN_1	p115	43.92	0.878	0.441	1.99	1.23
52	9881.2	<i>Pseudohyocera</i>	MEPN_1	p116	50.73	1.015	0.522	1.94	1.06
53	9918	<i>Puliciphora</i>	MEPN_1	p96	2.98	0.06	0.05	1.19	-1.38
54	15082	<i>Puliciphora</i>	MEPN_2	p259	11.58	0.232	0.131	1.77	1.23
55	15078.2	<i>Puliciphora</i>	MEPN_3	p127	9.41	0.188	-0.048	-3.9	1.25
56	9938	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_1	p249	19.34	0.387	0.196	1.97	1.21
57	9921.2	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_1	p268	22.35	0.447	0.209	2.14	1.51
58	9941.2	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_2	p267	4.85	0.097	0.038	2.57	1.24
59	9914.6	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_3	p99	4.74	0.095	0.058	1.62	1.38
60	9914.7	<i>Puliciphora-Commoptera</i>	MEPN_3	p100	5.96	0.119	0.056	2.11	1.3

Nota: Las muestras de ADN cuyo valor de cuantificación y absorbancia se encuentran en blanco, no se reportaron debido a pérdida de la información. Los valores negativos reportados pueden asumirse a muestras residuales en el pedestal del Nanodrop, antes de realizar la medición del blanco, por lo que los espectros de absorbancia de las muestras se reflejan de tal manera (Thermo Fisher Scientific, 2016).

Elaborado por: El autor, 2017.

Anexo 10.

Lista de secuencias consenso, códigos, calidad, tamaño, porcentaje de GC, y resultados del BLASTn, de morfoespecies de la familia Phoridae.

Nº	Código MEPN	Código ADN	Código secuencia	Calidad (%)	Tamaño (pb)	GC (%)	Blast	Accesión	Query cobert (%)	Identidad (%)	Valor E
1	9900	p128	Adelopteromyia_MEPN_1_RB	87.8	704	36.4	<i>Megaselia scalaris</i>	KC192982.1	99	84	0
2	9911.3	p122	Conicera_MEPN_1_LC	95.8	697	31.9	<i>Conicera</i> sp	KR741632.1	94	91	0
3	9912	p257	Conicera_MEPN_1.1_LC	99.1	684	31.9	<i>Conicera</i> sp	KR741632.1	96	91	0
4	9907.2	p124	Conicera_MEPN_2_RB	95.5	691	30.1	<i>Conicera</i> sp	KR741632.1	95	92	0
5	9876	p125	Conicera_MEPN_3_RB	13.1	518	29.9	<i>Conicera</i> sp	KR644368.1	99	92	0
6	15052.2	p130	Cyphocephalus_MEPN_1_MP	98.1	686	41.5	<i>P. semirufa</i>	KX300311.1	84	79	5E-106
7	15055.2	p261	Cyphocephalus_MEPN_2_MP	96.2	713	33.0	<i>R. fugax</i>	AB015867.1	97	83	6E-170
8	15045	p129	Dohrniphora_MEPN_1_LC	97.2	685	32.7	<i>D. nitidula</i>	KT110932.1	95	90	0
9	15065	p270	Dohrniphora_MEPN_2_MP	99.2	664	32.2	<i>Phalacrotophora</i> sp	KR439173.1	98	91	0
10	9957.6	p109	Megaselia_MEPN_1_LC	94.7	679	35.6	<i>Megaselia</i> sp	KR656469.1	96	88	0
11	9882.3	p117	Megaselia_MEPN_2_RB	91.4	683	31.2	<i>Megaselia</i> sp	KP693316.1	96	92	0
12	9882.4	p271	Megaselia_MEPN_2.1_RB	97.9	676	31.4	<i>Megaselia</i> sp	KP693316.1	97	92	0
13	9865	p28	Megaselia_MEPN_3_RB	96.9	681	31.1	<i>Megaselia</i> sp	KR597673.1	96	96	0
14	15093	p31	Megaselia_MEPN_4_MP	96.6	681	31.3	<i>Megaselia</i> sp	KR597673.1	96	96	0
15	15743	p32	Megaselia_MEPN_4.1_MP	93.4	685	31.4	<i>Megaselia</i> sp	KR597673.1	96	96	0
16	15739	p265	Megaselia_MEPN_4.2_RB	96.0	680	31.0	<i>Megaselia</i> sp	KR597673.1	96	96	0
17	9925.7	p81	Megaselia_MEPN_4.3_LC	97.2	683	31.2	<i>Megaselia</i> sp	KR597673.1	96	96	0
18	9925.8	p82	Megaselia_MEPN_4.4_LC	95.4	673	31.1	<i>Megaselia</i> sp	KR597673.1	97	96	0
19	9886.2	p67	Megaselia_MEPN_5_RB	96.6	684	33.3	<i>M. spiracularis</i>	JQ941751.1	98	90	0
20	9860	p252	Megaselia_MEPN_5.1_RB	97.8	680	33.2	<i>Megaselia</i> sp	KR758555.1	96	90	0
21	15263	p76	Megaselia_MEPN_6_MP	89.0	683	32.7	<i>Megaselia</i> sp	KT100688.1	96	92	0

Anexo 10. (Continuación...)

Nº	Código MEPN	Código ADN	Código secuencia	Calidad (%)	Tamaño (pb)	GC (%)	Blast	Accesión	Query cobert (%)	Identidad (%)	Valor E
22	4080	p254	Megaselia_MEPN_7_RB	97.6	675	31.6	<i>M. rufipes</i>	KT105504.1	97	91	0
23	15035.1	p3	Megaselia_MEPN_7.1_RB	97.3	679	31.8	<i>M. rufipes</i>	KT105504.1	96	91	0
24	15035.2	p251	Megaselia_MEPN_7.2_RB	97.6	677	31.5	<i>M. rufipes</i>	KT105504.1	97	91	0
25	7459	p69	Megaselia_MEPN_8_RB	98.1	675	33.9	<i>Megaselia</i> sp	KR749571.1	97	90	0
26	9961	p250	Megaselia_MEPN_8.1_LC	98.5	686	34.1	<i>Megaselia</i> sp	KR749571.1	95	90	0
27	9927.1	p275	Megaselia_MEPN_9_LC	98.2	681	34.2	<i>Megaselia</i> sp	KR434091.1	96	91	0
28	9890	p269	Megaselia_MEPN_9.1_RB	97.1	683	34.4	<i>Megaselia</i> sp	KR434091.1	96	91	0
29	9888.4	p77	Megaselia_MEPN_10_RB	98.8	677	31.8	<i>Megaselia</i> sp	KR597673.1	97	91	0
30	9888.5	p78	Megaselia_MEPN_10.1_RB	98.2	675	32.1	<i>Megaselia</i> sp	KP040232.1	97	91	0
31	15088.3	p7	Megaselia_MEPN_11_MP	96.3	694	31.0	<i>Megaselia</i> sp	KR750522.1	94	92	0
32	15059.3	p80	Megaselia_MEPN_11.1_MP	97.6	678	31.0	<i>Megaselia</i> sp	KR750522.1	97	92	0
33	9899	p120	Megaselia_MEPN_12_RB	96.2	685	34.0	<i>Megaselia</i> sp	KR470793.1	96	90	0
34	9966	p91	Megaselia_MEPN_13_LC	93.3	550	32.4	<i>Megaselia</i> sp	KR648923.1	99	92	0
35	9925.6	p83	Megaselia_MEPN_14_LC	98.4	676	33.9	<i>Phoridae</i> sp	KM965461.1	97	90	0
36	9903	p12	Megaselia_MEPN_15_RB	96.2	684	32.5	<i>Megaselia</i> sp	KR601442.1	96	91	0
37	9882.5	p230	Megaselia_MEPN_16_RB	87.3	684	33.5	<i>Megaselia</i> sp	KR428818.1	96	89	0
38	9939.3	p118	Megaselia_MEPN_17_LC	95.7	679	33.3	<i>Megaselia</i> sp	KR742607.1	96	91	0
39	15081.2	p2	Megaselia_MEPN_18_MP	98.7	683	32.4	<i>Megaselia</i> sp	KR598223.1	96	91	0
40	15083	p71	Megaselia_MEPN_19_MP	97.0	674	32.3	<i>Megaselia</i> sp	KM938641.1	96	92	0
41	9939.4	p272	Megaselia_MEPN_20_LC	97.8	677	35.7	<i>Megaselia</i> sp	KR471511.1	97	90	0
42	9945	p273	Megaselia_MEPN_21_LC	94.5	696	32.0	<i>Megaselia</i> sp	KM934976.1	94	92	0
43	9914.8	p101	Megaselia_MEPN_22_LC	98.0	683	33.4	<i>Megaselia</i> sp	KR426419.1	96	89	0
44	9909	p253	Megaselia_MEPN_23_LC	97.5	677	31.9	<i>Megaselia</i> sp	KR664094.1	97	91	0

Anexo 10. (Continuación...)

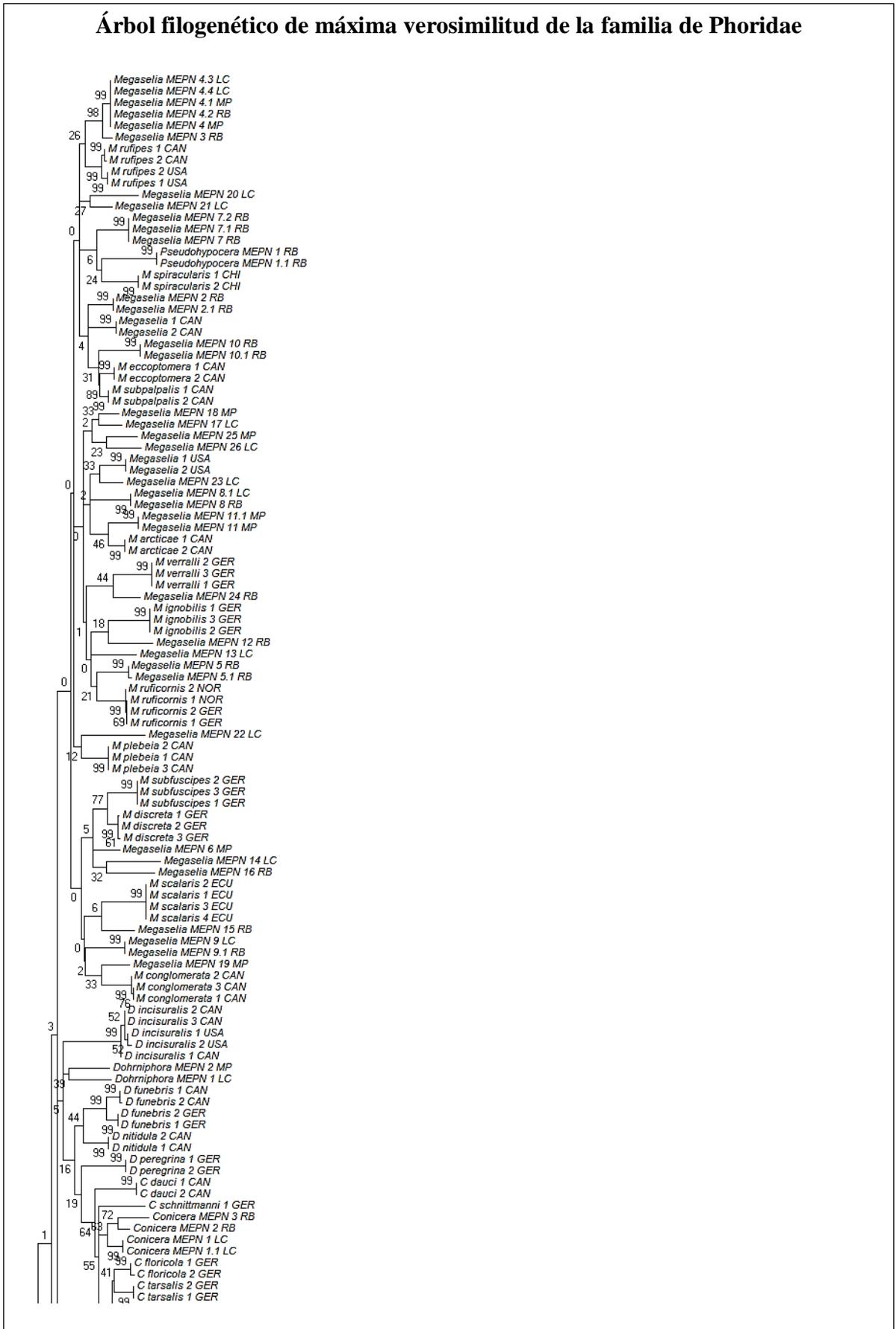
Nº	Código MEPN	Código ADN	Código secuencia	Calidad (%)	Tamaño (pb)	GC (%)	Blast	Accesión	Query cobert (%)	Identidad (%)	Valor E
45	15037	p73	Megaselia_MEPN_24_RB	96.6	678	32.6	<i>Megaselia</i> sp	KR661680.1	96	91	0
46	15091	p75	Megaselia_MEPN_25_MP	97.7	686	31.6	<i>Phoridae</i> sp	KP042629.1	95	91	0
47	9928	p89	Megaselia_MEPN_26_LC	92.6	550	31.1	<i>Megaselia</i> sp	KT116876.1	99	91	0
48	9881.1	p115	Pseudohyocera_MEPN_1_RB	98.1	668	34.3	<i>Megaselia</i> sp	KR429261.1	97	90	0
49	9881.2	p116	Pseudohyocera_MEPN_1.1_RB	96.2	665	34.4	<i>Megaselia</i> sp	KR429261.1	98	90	0
50	9918	p96	Puliciphora_MEPN_1_LC	94.0	684	34.5	<i>A. nigritibiella</i>	EU627708.1	99	82	5E-161
51	15082	p259	Puliciphora_MEPN_2_MP	93.8	681	34.8	<i>Megaselia</i> sp	KP041834.1	96	85	0
52	15078.2	p127	Puliciphora_MEPN_3_MP	94.6	699	37.6	<i>Megaselia</i> sp	KM634815.1	93	86	0
53	9938	p249	Puliciphora-Commoptera_MEPN_1_LC	99.7	668	35.3	<i>Megaselia</i> sp	KR458662.1	97	84	7E-179
54	9921.2	p268	Puliciphora-Commoptera_MEPN_1.1_LC	97.2	670	35.2	<i>Megaselia</i> sp	KR458662.1	97	85	2E-180
55	9941.2	p267	Puliciphora-Commoptera_MEPN_2_LC	94.2	425	33.6	<i>L. peruensis</i>	AB984458.1	99	81	1E-89
56	9914.6	p99	Puliciphora-Commoptera_MEPN_3_LC	98.0	686	32.9	<i>Megaselia</i> sp	KR442558.1	95	80	4E-137
57	9914.7	p100	Puliciphora-Commoptera_MEPN_3.1_LC	96.5	687	33.0	<i>Megaselia</i> sp	KR442558.1	95	80	4E-137

Nota: Los códigos de la secuencia son los correspondientes para la construcción de los árboles filogenéticos.

Elaborado por: El autor, 2017.

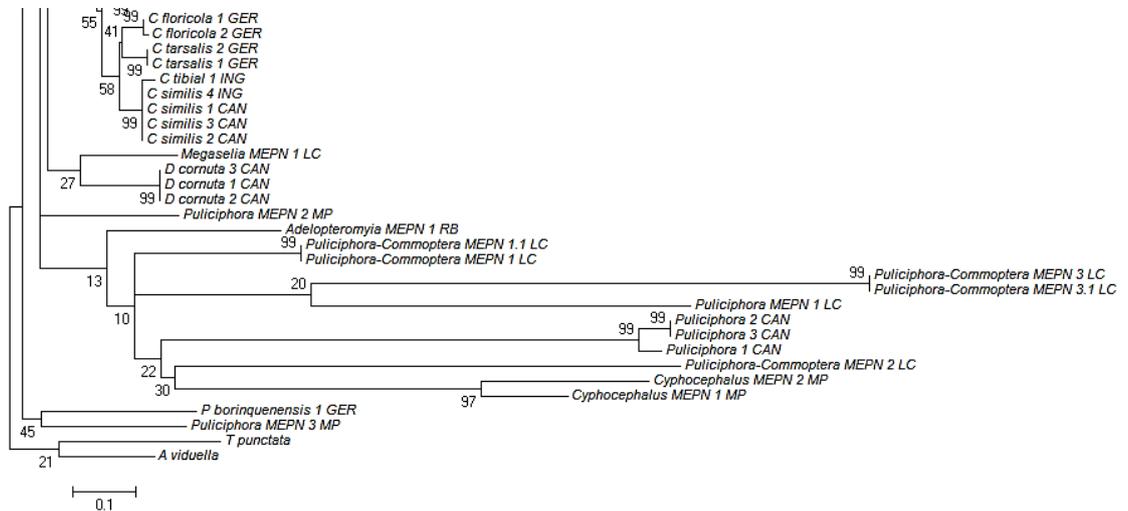
Anexo 11.

Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la familia de Phoridae



Anexo 11. (Continuación...)

Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la familia de Phoridae
(Continuación...)



Anexo 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud. Modelo GTR+I+G y Bootstrap con 500 réplicas. Presencia de ramas más largas (*Puliciphora*, *Adelopteromyia*, *Puliciphora-Commoptera* y *Cyphocephalus*) en comparación a las ramas de los grupos externos (*T. punctata* y *A.viduella*).

Fuente: Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Anexo 12.

Lista de especímenes de Phoridae propuestos como códigos de barras moleculares.

N°	Código MEPN	Morfoespecie	Localidad General	Localidad Específica	Calidad (%)	Tamaño (pb)
1	9900	<i>Adelopteromyia</i> MEPN 1	Mindo	Río Bravo, Estación 2	87.8	704
2	9911.3	<i>Conicera</i> MEPN 1	Los Cedros	Sendero Inca	95.8	697
3	9912	<i>Conicera</i> MEPN 1	Los Cedros	Sendero Inca	99.1	684
4	9907.2	<i>Conicera</i> MEPN 2	Mindo	Río Bravo, Estación 2	95.5	691
5	15052.2	<i>Cyphocephalus</i> MEPN 1	Maquipucuna-Pahuma	Maquipucuna Sur	98.1	686
6	15055.2	<i>Cyphocephalus</i> MEPN 2	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos	96.2	713
7	15045	<i>Dohrniphora</i> MEPN 1	Los Cedros	Sendero Inca	97.2	685
8	15065	<i>Dohrniphora</i> MEPN 2	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Principal	99.2	664
9	9957.6	<i>Megaselia</i> MEPN 1	Los Cedros	Sendero Inca	94.7	679
10	9882.3	<i>Megaselia</i> MEPN 2	Mindo	Río Bravo, Estación 2	91.4	683
11	9882.4	<i>Megaselia</i> MEPN 2	Mindo	Río Bravo, Estación 2	97.9	676
12	9865	<i>Megaselia</i> MEPN 3	Mindo	Río Bravo, Estación 3	96.9	681
13	15093	<i>Megaselia</i> MEPN 4	Maquipucuna-Pahuma	Maquipucuna Sur	96.6	681
14	15743	<i>Megaselia</i> MEPN 4	Maquipucuna-Pahuma	Maquipucuna Sur	93.4	685
15	15739	<i>Megaselia</i> MEPN 4	Mindo	Río Bravo, Estación 2	96.0	680
16	9925.7	<i>Megaselia</i> MEPN 4	Los Cedros	Sendero Inca	97.2	683
17	9925.8	<i>Megaselia</i> MEPN 4	Los Cedros	Sendero Inca	95.4	673
18	9886.2	<i>Megaselia</i> MEPN 5	Mindo	Río Bravo, Estación 3	96.6	684
19	9860	<i>Megaselia</i> MEPN 5	Mindo	Río Bravo, Estación 3	97.8	680
20	15263	<i>Megaselia</i> MEPN 6	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos	89.0	683
21	4080	<i>Megaselia</i> MEPN 7	Mindo	Río Bravo, Estación 1	97.6	675
22	15035.1	<i>Megaselia</i> MEPN 7	Mindo	Río Bravo, Estación 1	97.3	679
23	15035.2	<i>Megaselia</i> MEPN 7	Mindo	Río Bravo, Estación 1	97.6	677
24	7459	<i>Megaselia</i> MEPN 8	Mindo	Río Bravo, Estación 1	98.1	675
25	9961	<i>Megaselia</i> MEPN 8	Los Cedros	Sendero Oso	98.5	686
26	9927.1	<i>Megaselia</i> MEPN 9	Los Cedros	Sendero Inca	98.2	681
27	9890	<i>Megaselia</i> MEPN 9	Mindo	Río Bravo, Estación 2	97.1	683
28	9888.4	<i>Megaselia</i> MEPN 10	Mindo	Río Bravo, Estación 3	98.8	677
29	9888.5	<i>Megaselia</i> MEPN 10	Mindo	Río Bravo, Estación 3	98.2	675
30	15088.3	<i>Megaselia</i> MEPN 11	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos	96.3	694
31	15059.3	<i>Megaselia</i> MEPN 11	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos	97.6	678
32	9966	<i>Megaselia</i> MEPN 13	Los Cedros	Sendero Cascada	93.3	550
33	9925.6	<i>Megaselia</i> MEPN 14	Los Cedros	Sendero Inca	98.4	676
34	9903	<i>Megaselia</i> MEPN 15	Mindo	Río Bravo, Estación 2	96.2	684
35	9882.5	<i>Megaselia</i> MEPN 16	Mindo	Río Bravo, Estación 2	87.3	684
36	9939.3	<i>Megaselia</i> MEPN 17	Los Cedros	Sendero Inca	95.7	679
37	15081.2	<i>Megaselia</i> MEPN 18	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos	98.7	683
38	15083	<i>Megaselia</i> MEPN 19	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos	97.0	674

Anexo 12. (Continuación...)

N°	Código MEPN	Morfoespecie	Localidad General	Localidad Específica	Calidad (%)	Tamaño (pb)
39	9939.4	<i>Megaselia</i> MEPN 20	Los Cedros	Sendero Inca	97.8	677
40	15037	<i>Megaselia</i> MEPN 24	Mindo	Río Bravo, Estación 2	96.6	678
41	15091	<i>Megaselia</i> MEPN 25	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Principal	97.7	686
42	9928	<i>Megaselia</i> MEPN 26	Los Cedros	Sendero Inca	92.6	550
43	9881.1	<i>Pseudohypocera</i> MEPN 1	Mindo	Río Bravo, Estación 2	98.1	668
44	9881.2	<i>Pseudohypocera</i> MEPN 1	Mindo	Río Bravo, Estación 2	96.2	665
45	9918	<i>Puliciphora</i> MEPN 1	Los Cedros	Sendero Inca	94.0	684
46	15082	<i>Puliciphora</i> MEPN 2	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Oso de anteojos	93.8	681
47	15078.2	<i>Puliciphora</i> MEPN 3	Maquipucuna-Pahuma	Sendero Principal	94.6	699
48	9938	<i>Puliciphora-Commoptera</i> MEPN 1	Los Cedros	Sendero del Río	99.7	668
49	9921.2	<i>Puliciphora-Commoptera</i> MEPN 1	Los Cedros	Sendero del Río	97.2	670
50	9941.2	<i>Puliciphora-Commoptera</i> MEPN 2	Los Cedros	Sendero Inca	94.2	425
51	9914.6	<i>Puliciphora-Commoptera</i> MEPN 3	Los Cedros	Sendero Oso	98.0	686
52	9914.7	<i>Puliciphora-Commoptera</i> MEPN 3	Los Cedros	Sendero Oso	96.5	687

Elaborado por: El autor, 2017.