



## Documento

### **Métodos de reconstrucción filogenética para caracteres morfológicos y moleculares. Guía de pasos metodológicos para principiantes en sistemática filogenética**

Por

**Rodrigo A. Moreno<sup>1,2</sup> & Marco A. Méndez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Santo Tomás, Av. Ejército Libertador 146, Santiago, Chile. E-mail: [ramoreno@gmail.com](mailto:ramoreno@gmail.com)

<sup>2</sup> Laboratorio de Genética y Evolución (GEVOL), Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Las Palmeras 3425, Casilla 653, Ñuñoa, Santiago, Chile. E-mail: [mmendez@u.uchile.cl](mailto:mmendez@u.uchile.cl)

Este documento es propiedad intelectual del Laboratorio de Genética y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

ÍNDICE

Introducción .....	3
Reconstrucción filogenética para caracteres morfológicos .....	4
Análisis Filogenético de Máxima Parsimonia en Software PAUP* .....	5
Reconstrucción filogenética para caracteres moleculares .....	13
Plataforma: CLUSTALX .....	16
Plataforma: BIOEDIT .....	17
Plataforma: DnaSP .....	21
Plataforma: DAMBE .....	23
Plataforma: MEGA .....	28
Análisis Filogenético de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) .....	34
Plataforma: jModelTest2 .....	35
Plataforma: MESQUITE .....	42
Análisis Filogenético de Inferencia Estadística Bayesiana .....	45
Plataforma: MrBayes .....	45
Agradecimientos .....	48

## Introducción

La presente guía que ponemos a disposición como material docente para el curso de postgrado “**Procesos Evolutivos: Métodos de Reconstrucción Filogenética**” de la Universidad de Chile, tiene como objetivo brindar apoyo metodológico a los estudiantes que recién se inician en el estudio de la sistemática filogenética. Hemos querido ejemplificar de forma simple los métodos rutinarios que se aplican en las reconstrucciones filogenéticas para evaluar hipótesis en ecología y evolución. En esta guía se presentan detalladamente los pasos metodológicos y los programas computacionales informáticos *ad hoc* para reconstruir hipótesis filogenéticas basadas en caracteres morfológicos y moleculares (secuencias nucleotídicas).

Esperamos que este material contribuya a desarrollar en términos pedagógicos la habilidad de los estudiantes de comprender el uso adecuado de cada herramienta, sus potencialidades y restricciones metodológicas e interpretativas desde el punto vista biológico y estadístico. Finalmente, entregamos las directrices como realizar análisis filogenéticos utilizando métodos como Neighbor-Joining (método fenético de distancia), Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) e Inferencia Bayesiana en distintas plataformas computacionales en su mayoría de libre distribución.

A continuación se procede a mostrar con ejemplos tipos la forma de iniciar el análisis de los datos en una sección dedicada a caracteres morfológicos y otra a caracteres moleculares.

## 1.- Reconstrucción filogenética para caracteres morfológicos

### Cita

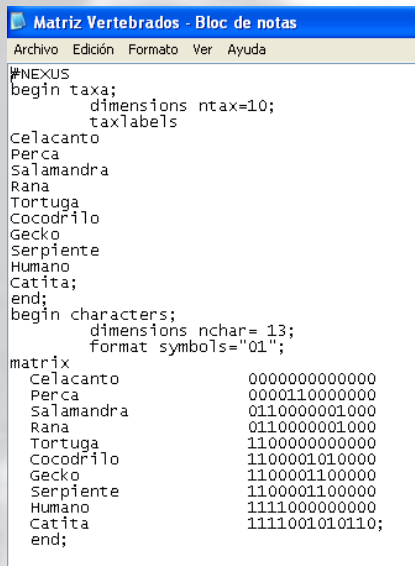
Maddison, D.R., D.L. Swofford & W.P. Maddison. 1997. NEXUS: an extensible file format for systematic information. *Systematic Biology* 46(4): 590-621.

### **Procedimiento**

1.- Abrir bloc de notas

2.- Proceda a crear un archivo (matriz) en lenguaje #Nexus de los caracteres morfológicos con su estado de caracter definido previamente (e.g. binario, multiestado).

### **Ejemplo archivo tipo: Vertebrados**



```
#NEXUS
begin taxa;
  dimensions ntax=10;
  taxlabels
Celacanto
Perca
Salamandra
Rana
Tortuga
Cocodrilo
Gecko
Serpiente
Humano
Catita;
end;
begin characters;
  dimensions nchar= 13;
  format symbols='01';
matrix
Celacanto      0000000000000
Perca          0000110000000
Salamandra     0110000001000
Rana           0110000001000
Tortuga        1100000000000
Cocodrilo      1100001010000
Gecko          1100001100000
Serpiente      1100001100000
Humano         1111000000000
Catita         1111001010110;
end;
```

3.- Defina el grupo externo **“outgroup”** [por convención se puede rellenar con ceros]

4.- Guarde su archivo como **Vertebrados.nex** [extensión Nexus]

5.- Este archivo con extensión Nexus podrá ser utilizado en la plataforma del software PAUP\* [**Phylogenetic Analysis using Parsimony \*and other methods**]

## Análisis Filogenético de Máxima Parsimonia en Software PAUP\*



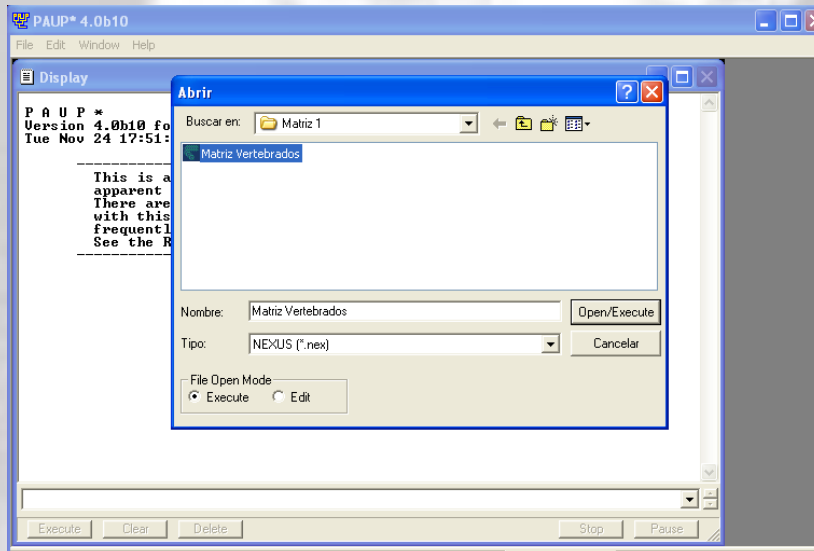
### Citas

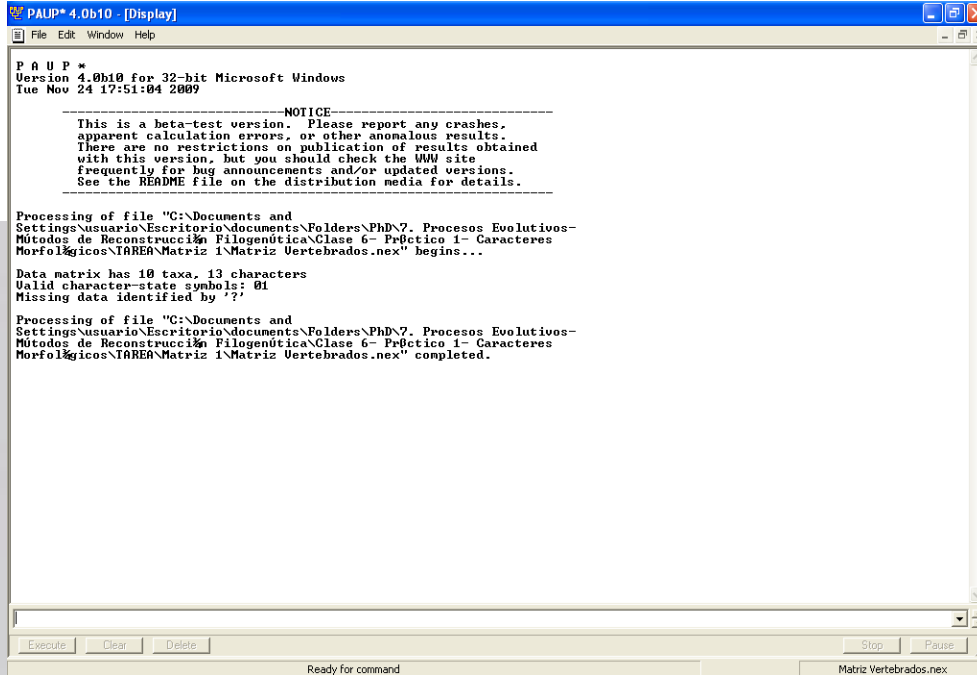
Swofford, D.L. 2002. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

Page, R. 2001. TREEVIEW 1.6.6. Tree drawing software for Apple Macintosh and Windows. Disponible en <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

### **Procedimiento**

- 1.- Abrir PAUP
- 2.- Abra el archivo tipo Vertebrados.nex





3.- Ejecute los siguientes comandos

**Nota:** el símbolo guión bajo representa un espacio entre palabras: \_ = un espacio

3.1. Ejecute el comando `excluye_uninf` [excluye los caracteres no informativos]

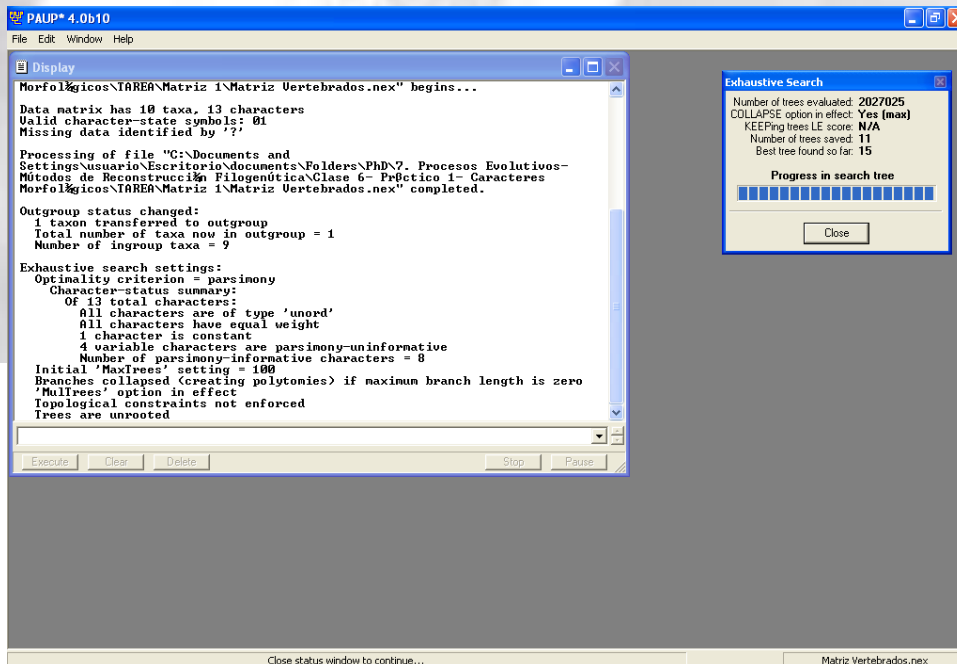
3.2. Defina su tipo de Búsqueda

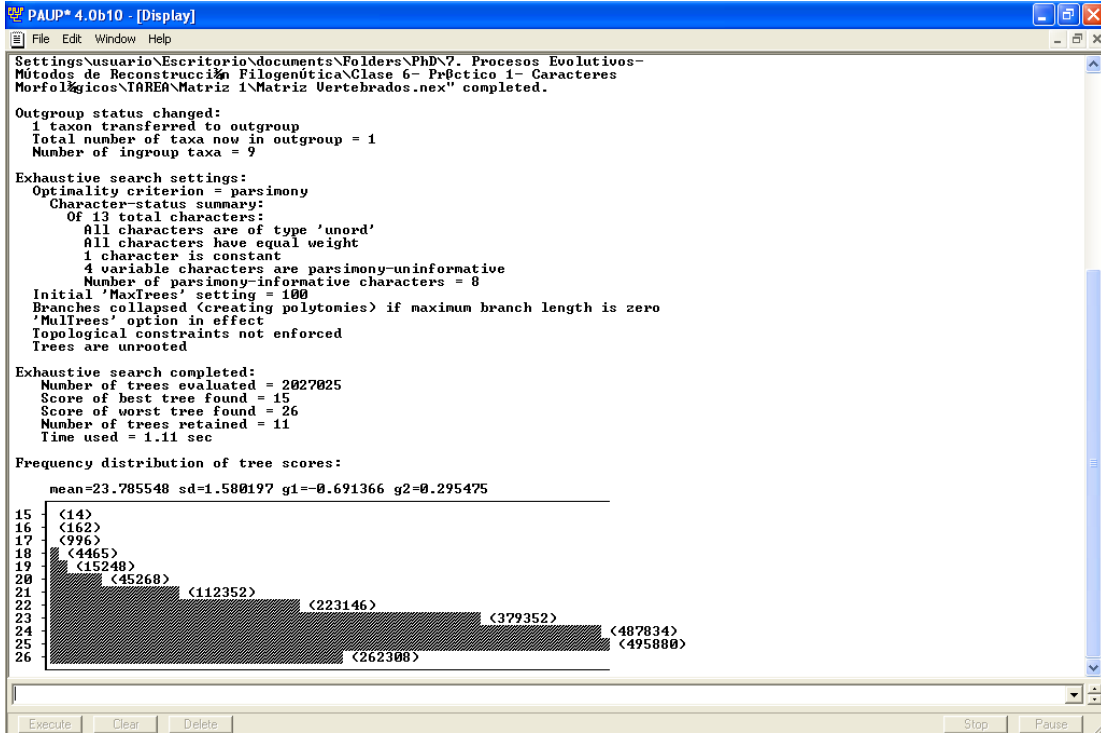
`alltree`            Búsqueda Exhaustiva <12 taxa

`hsearch`           Búsqueda Heurística

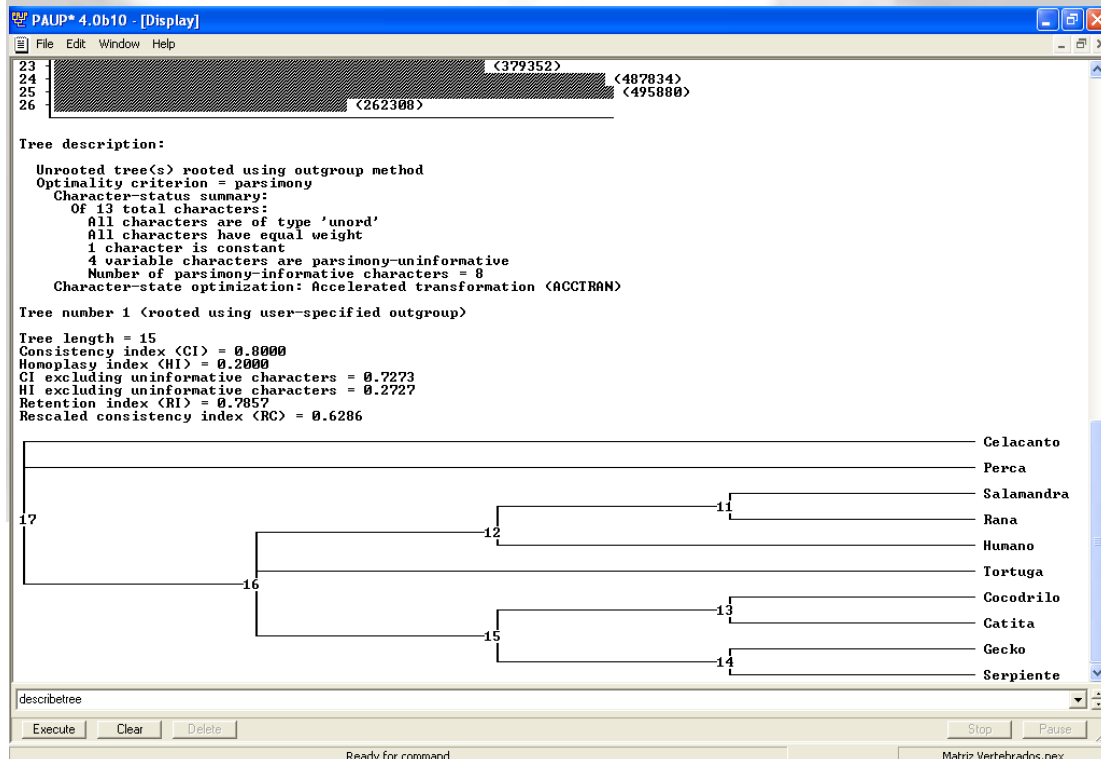
`bandb`            Búsqueda Heurística por Branch and Bound

3.3. `outgroup_celacanto` [definir Outgroup - ver archivo Nexus]





3.4. describetree Descripción de los datos [Estadísticos básicos: Largo del árbol, Índice de Consistencia, Índice de Retención, Índice de Consistencia re-escalado].



3.5. ACCTRAN

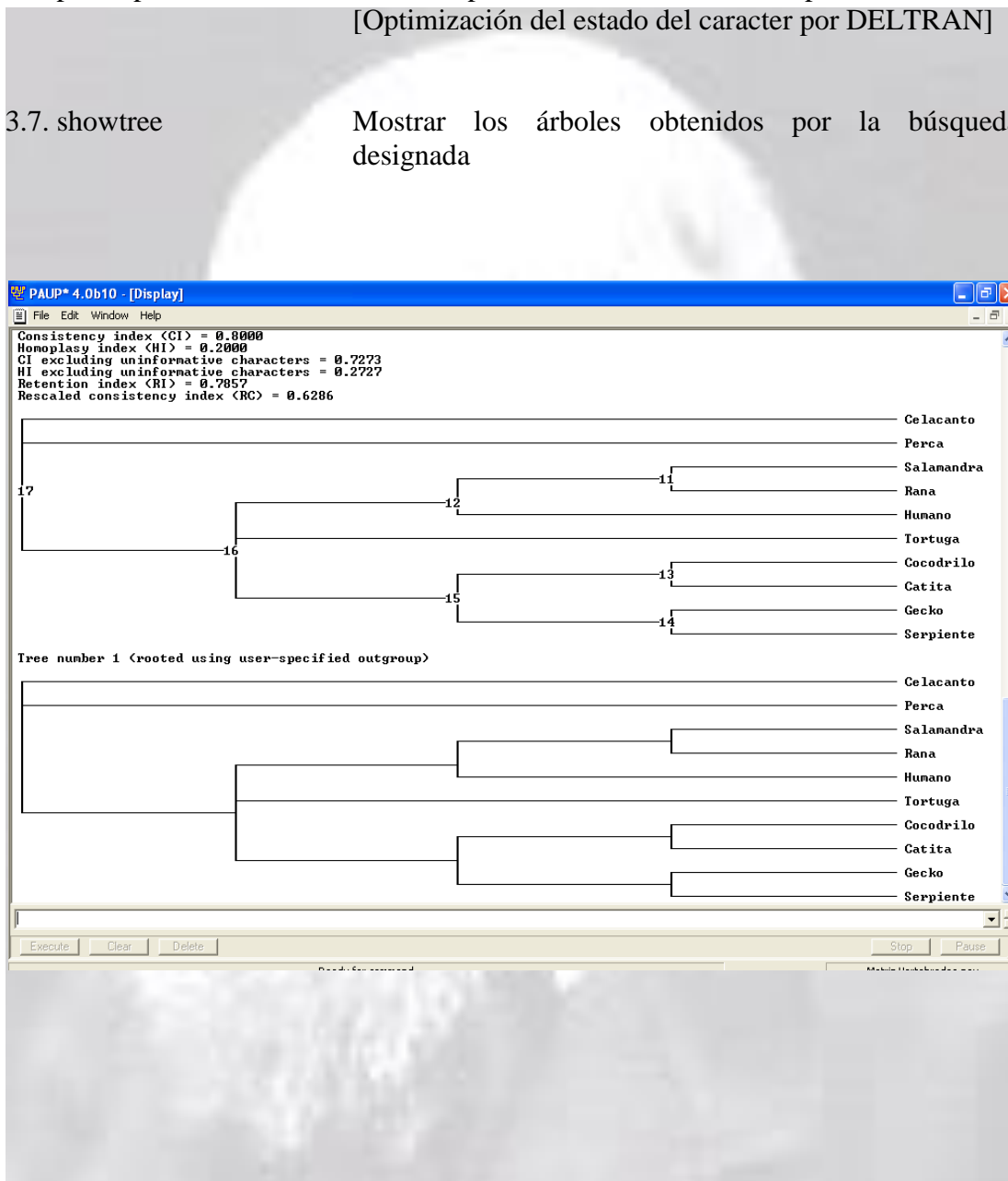
Algoritmo de Optimización del estado del caracter por defecto de PAUP

3.6. pset\_opt=deltran

comando para cambiar el criterio de Optimización [Optimización del estado del caracter por DELTRAN]

3.7. showtree

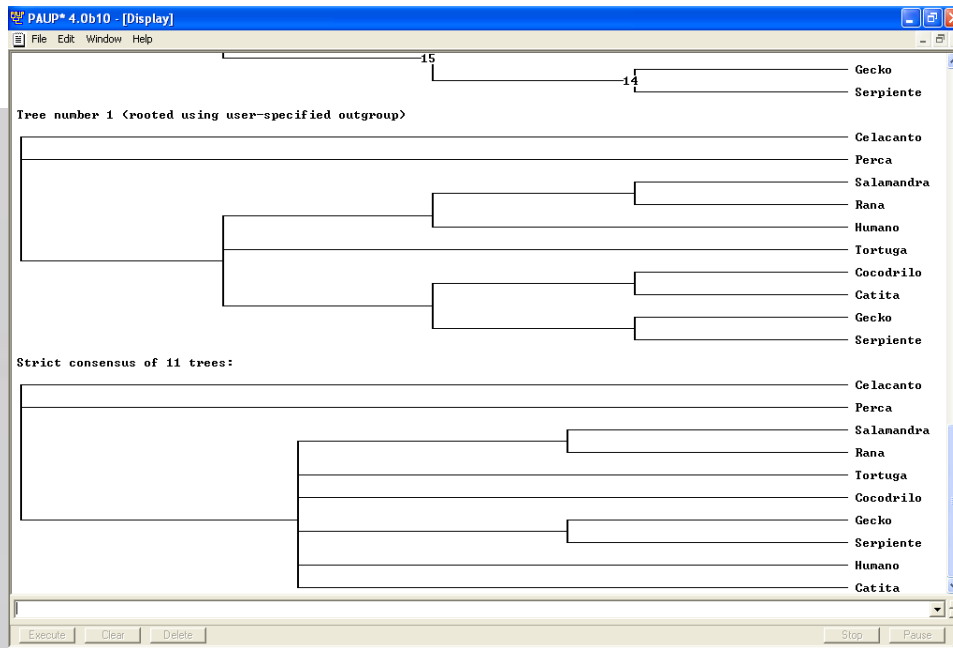
Mostrar los árboles obtenidos por la búsqueda designada





3.8. contree

Árbol de Consenso Estricto

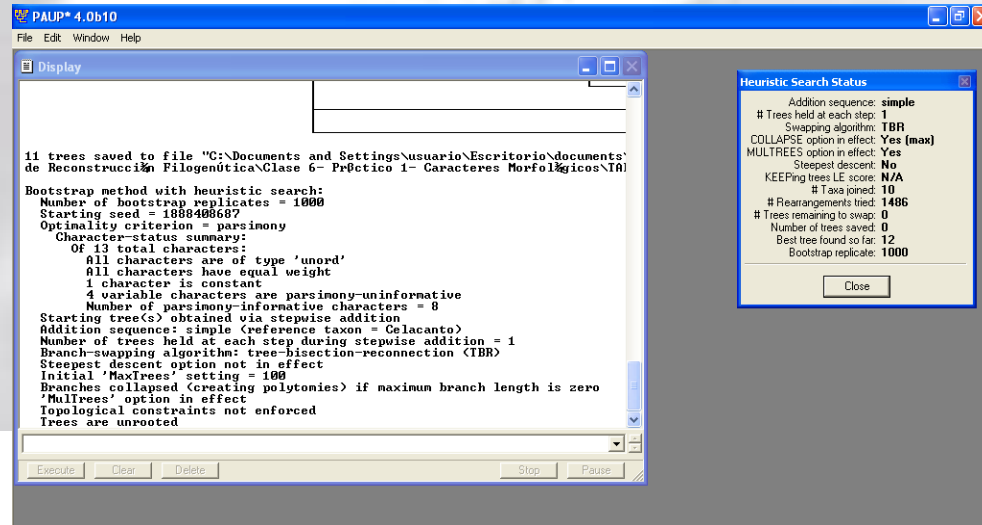


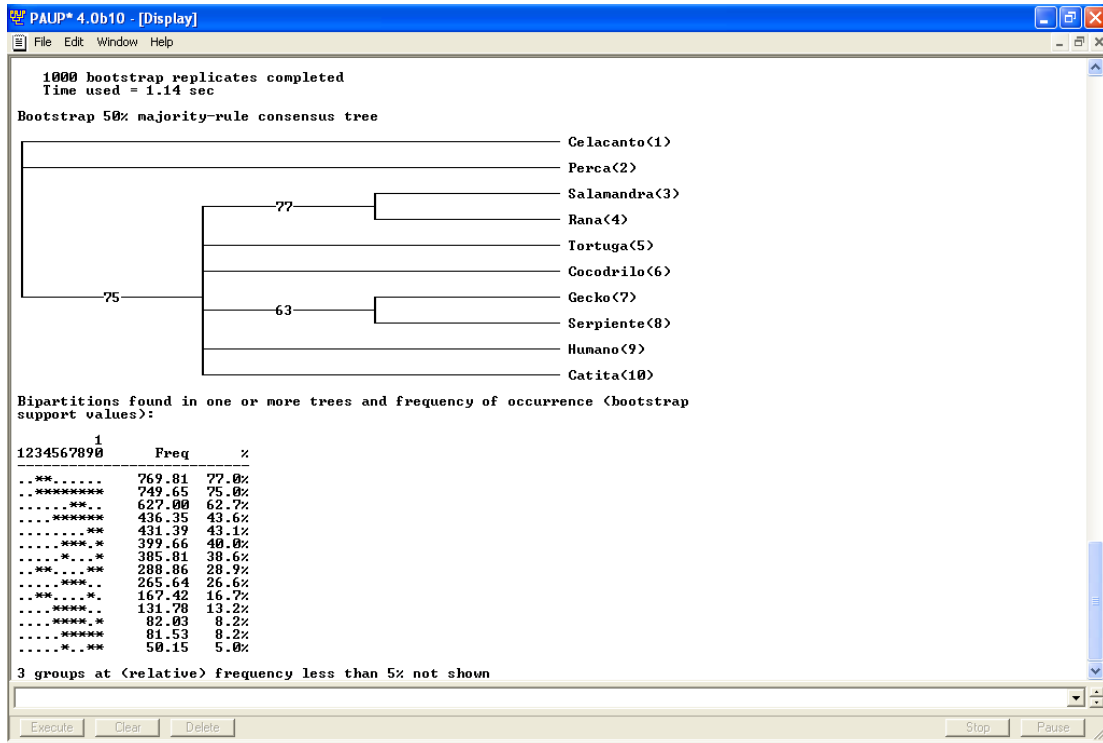
3.9. savetree

Guardar árbol [archivo queda con la extensión **.tre** / en el ejemplo es **Vertebrados.tre** ]

3.10. bootstrap\_nrep=1000

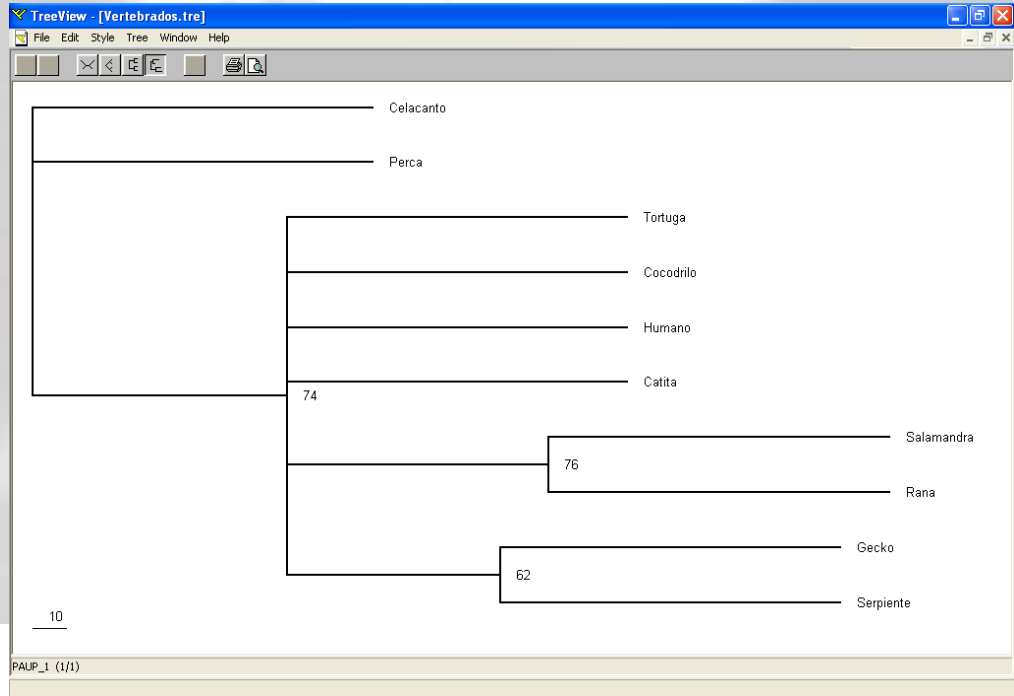
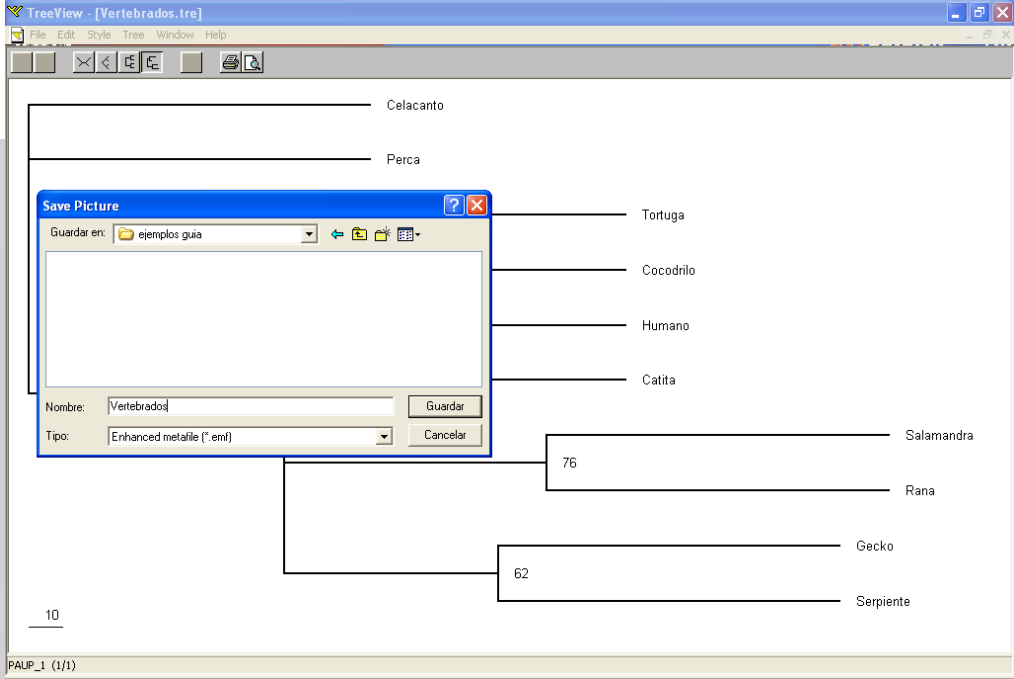
Soporte de los nodos (Árbol de consenso del 50% de la regla de la mayoría)





3.11. savetree\_file= Vertebrados.tre\_from=1\_to=1\_brlens=yes Guardar el árbol como archivo con largo de ramas (filograma)

En su carpeta aparecerá Vertebrados con extensión **.tre** para ser desplegado en el software Treeview. Recuerde ir al menú Tree y seleccione **show internal Edge labels** para que despliegue los valores de soporte de los nodos obtenidos en su análisis de Bootstrap no-paramétrico. Guarde la figura como **Save as Graphics** y seleccione la extensión **Enhanced metafile (emf)**.



### Otros comandos de utilidad

3.12. set_criterion=dist	Cambio de criterio a método de distancia
3.13. nj	Neighbor-Joining [vecino más cercano]
3.14. set_criterion=parsimony	Cambio de criterio a método de Máxima Parsimonia
3.15. includeall	Incluir todos los caracteres
3.16. showmat	Mostrar matriz de datos
3.17. describetree/apolist	Muestra la lista de apomorfías de la matriz

4.- utilice el software TREEVIEW para desplegar gráficamente el(los) árbol(es) recuperados. También puede utilizar el software FIGTREE para visualizar gráficamente los árboles filogenéticos.

Sitio web: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

5.- Cierre PAUP\*.

**Nota:** El procedimiento es similar cuando se utiliza una matriz con secuencias nucleotídicas.

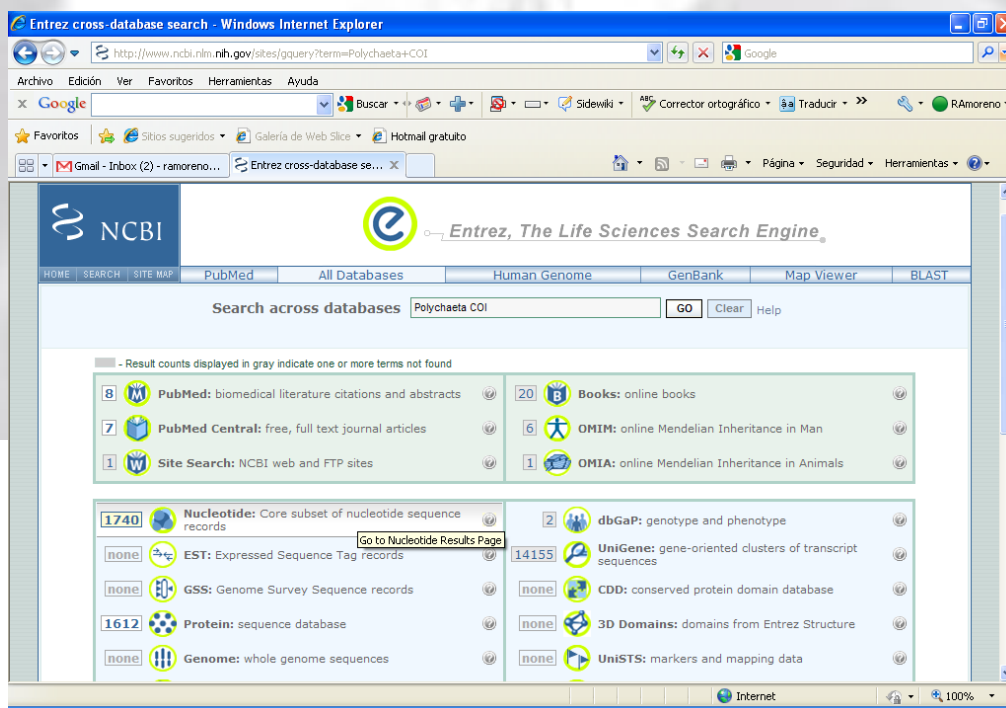
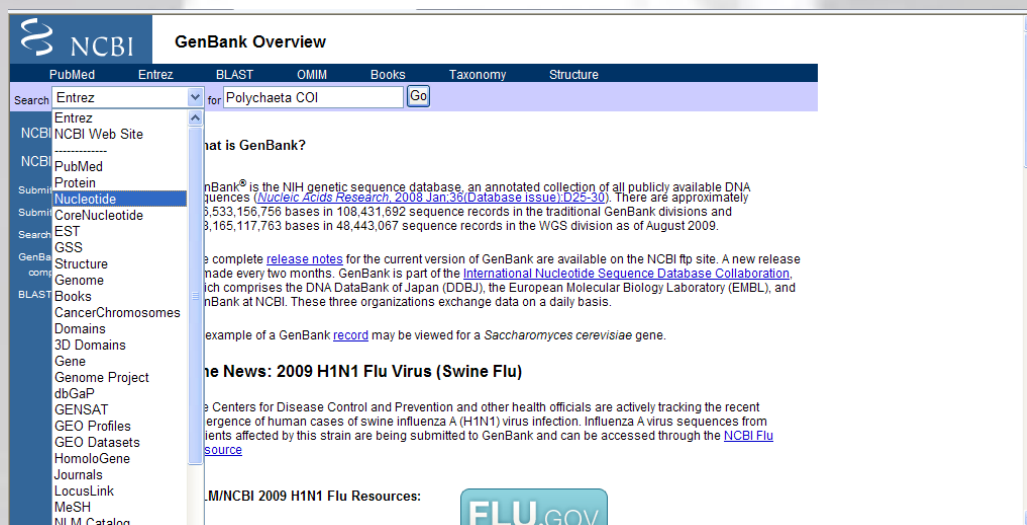
## 2.- Reconstrucción filogenética para caracteres moleculares

### Procedimiento

1.- Para obtener secuencias nucleotídicas utilice la plataforma de Genbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

2.- Seleccione en el menú Search “Nucleotide”

3.- Posteriormente en el buscador “For” coloque el taxón de interés y el tipo de marcador(es) molecular(es). Seleccione “Nucleotide: core subset of nucleotide sequence records” para acceder a las secuencias.



4.- Realice click en el n° de acceso de Genbank y baje “download” la secuencia nucleotídica en formato FASTA

NCBI Nucleotide

Search: Nucleotide for [ ] Go Clear

Format: GenBank FASTA Graphics More Formats

Download Save Links

GenBank: FJ602544.1

**Typhloscolex muelleri voucher UCONN:Po05.1.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial**

Change Region Shown  
Customize View

Sequence Analysis Tools  
BLAST Sequence  
Pick Primers

Recent activity  
Typhloscolex muelleri voucher UCONN:Po05.1.2 cytochrome oxidase subunit  
Polychaeta COI (1740) Nucleotide  
See more...

All links from this record

NCBI Nucleotide

Search: Nucleotide for [ ] Go Clear

Format: GenBank FASTA Graphics More Formats

Download Save Links

GenBank: FJ602544.1

**Typhloscolex muelleri voucher UCONN:Po05.1.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial**

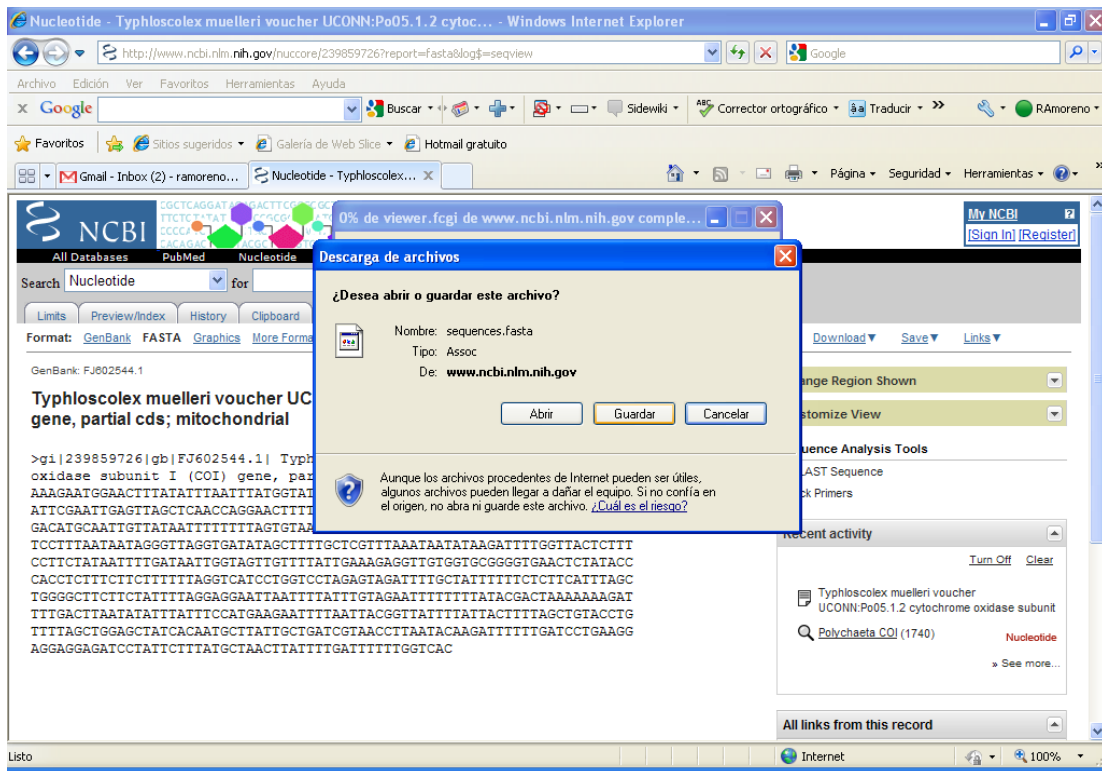
Change Region Shown  
Customize View

Sequence Analysis Tools  
BLAST Sequence  
Pick Primers

Recent activity  
Typhloscolex muelleri voucher UCONN:Po05.1.2 cytochrome oxidase subunit  
Polychaeta COI (1740) Nucleotide  
See more...

All links from this record

>gi|239859726|gb|FJ602544.1| Typhloscolex muelleri voucher UCONN:Po05.1.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial  
AAAGAATGGAACCTTATATTTAATTTATGGTATTGAAGAGGAATTTAGGGGCTAGTCTAAGAAGTTTA  
ATTCGAATTGAGTTAGCTCAACCAGGAACCTTTTGGAAATGAACAATTATATAACTATTGTTACAA  
GACATGCAATTTGATAATTTTTTATGTTAATACCTAATTTAATTTGGTGGGTTTGGAAACTGGTTAGT  
TCCTTAAATAAGSGTTAGGTGATATAGCTTTTGTCTCGTTAATAATAATAAGATTTTGGTTACTCTTT  
CCCTCTAATTTTGATAATTTGGTATTGTTTTATTGAAGAGGTTGGTGGCGGGGTGAACCTCTATACC  
CACCTCTTCTCTCTTTTATGTTCAATCTGCTAGAGTATTTTGTCTATTTTCTCTCTCATTTTAC  
TGGGCTCTCTCTTTTATGAGGAATTAATTTTATGTAATTTTTTATACGACTAATAAAGAT  
TTTACTTAATATTTTATTCATGAAGATTTTAAATACGTTATTTTTTATACCTTTTACCTGTAACCTG  
TTTTACTGAGCTATACCAATGCTTATGCTGATGCTAATCTTAATCAAGATTTTTTGTATCCTGGAAG  
AGGAGGAGATCCTATCTTTATGCTAATCTTTTATGTTTTTGGTAC



5.- Genere una carpeta con las secuencias recuperadas en GenBank

6.- Cierre la página web.

7.- Una vez obtenida las secuencias nucleotídicas se procede a generar una base de secuencias en las plataformas CLUSTALX y BIOEDIT para realizar los alineamientos de secuencias nucleotídicas.

## Plataforma: CLUSTALX

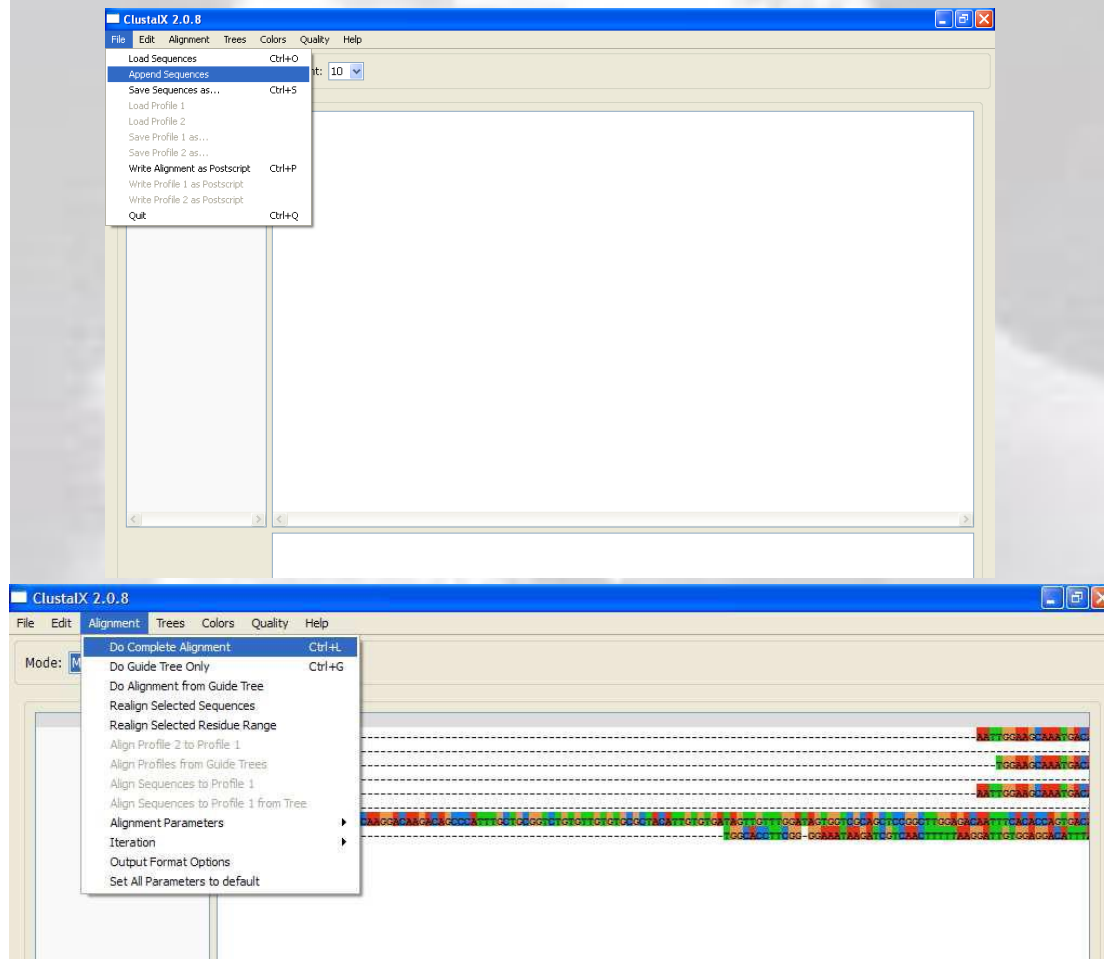
Extensión *.fas* (formato FASTA)

### Cita

Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.

Para cada archivo realizar el siguiente procedimiento:

- 1.- Abrir el Programa CLUSTALX y dentro de éste, abra el archivo de secuencias nucleotídicas con extensión *.fas*
- 2.- Proceder a alinear las secuencias utilizando la opción que viene por defecto **Multiple Alignment Mode** y vaya al menú alignment y ejecute **“Do complete alignment”**.
- 3.- En su carpeta aparecerá el alineamiento efectuado con la extensión *.aln*
- 4.- Cerrar el programa CLUSTALX







**Plataforma: BIOEDIT**

**Cita**

Hall, T.A. 1999, BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

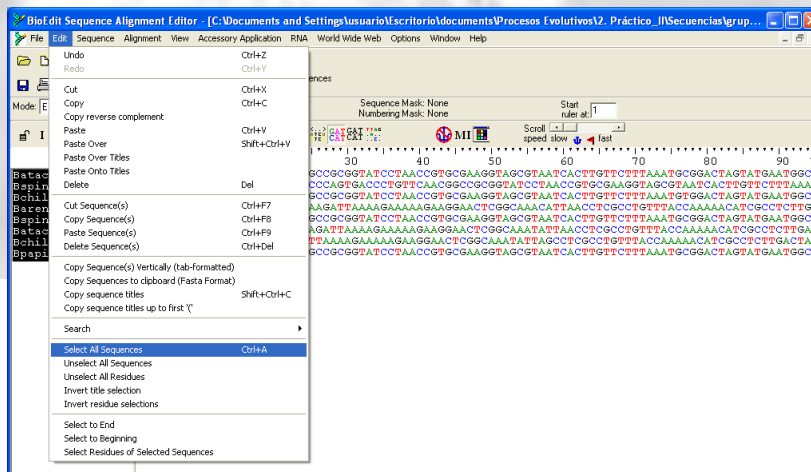
Sitioweb: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

**Ejemplo archivo tipo:** grupo16b [secuencias nucleotídicas del gen mitocondrial citocromo b –cytb- del género de anuros *Bufo*]

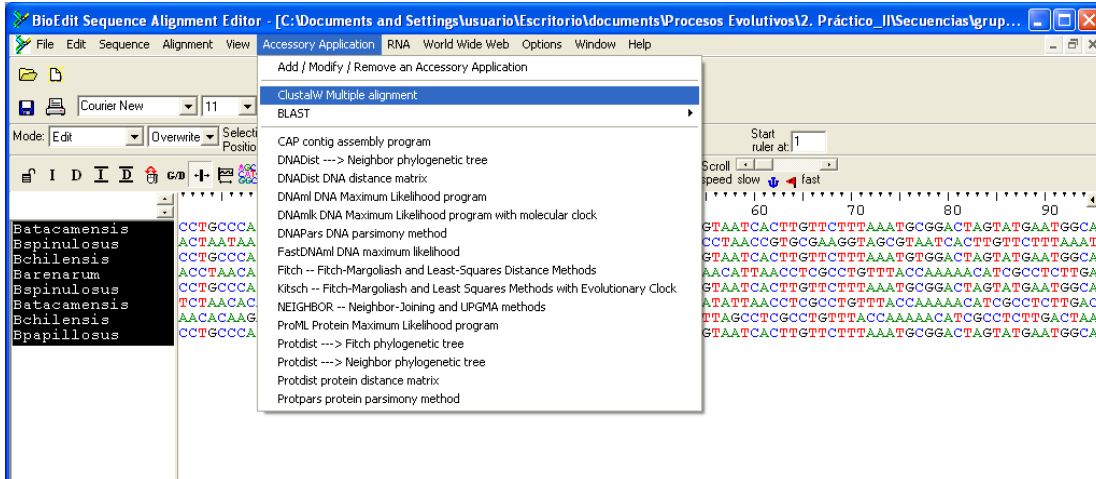
- 1.- Abrir Bioedit
- 2.- Seleccionar Edit para editar las secuencias nucleotídicas
- 3.- Edite el nombre de las secuencias y presione “**Apply and Close**” para ir editando.



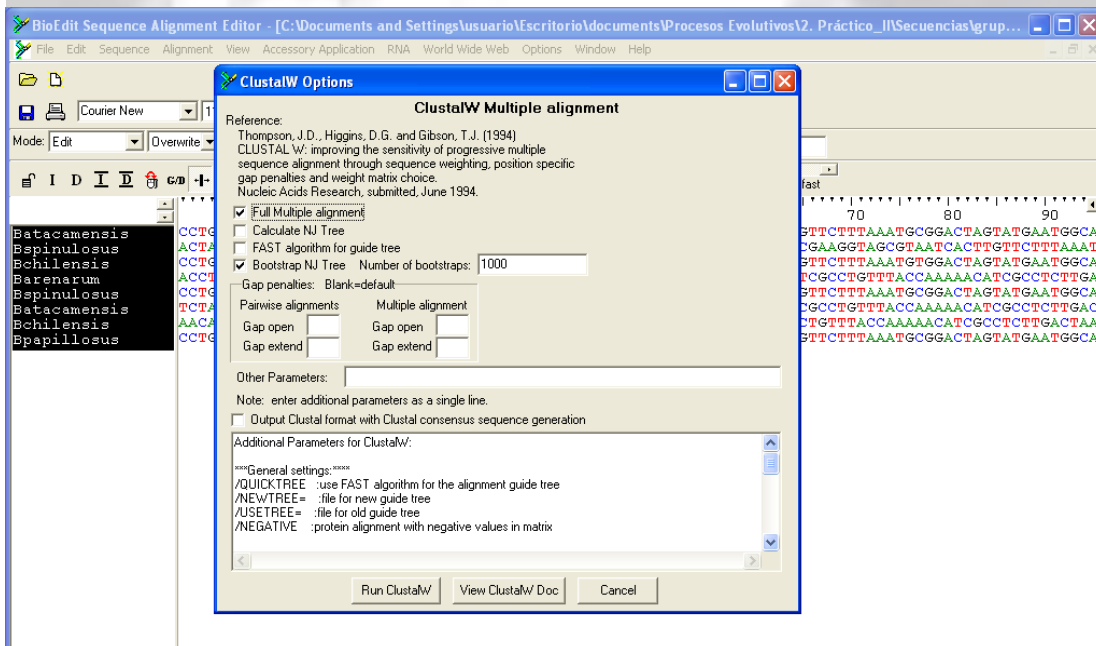
4. Vaya al menú Edit y proceda seleccionar todas las secuencias con “**Select All Sequences**”.

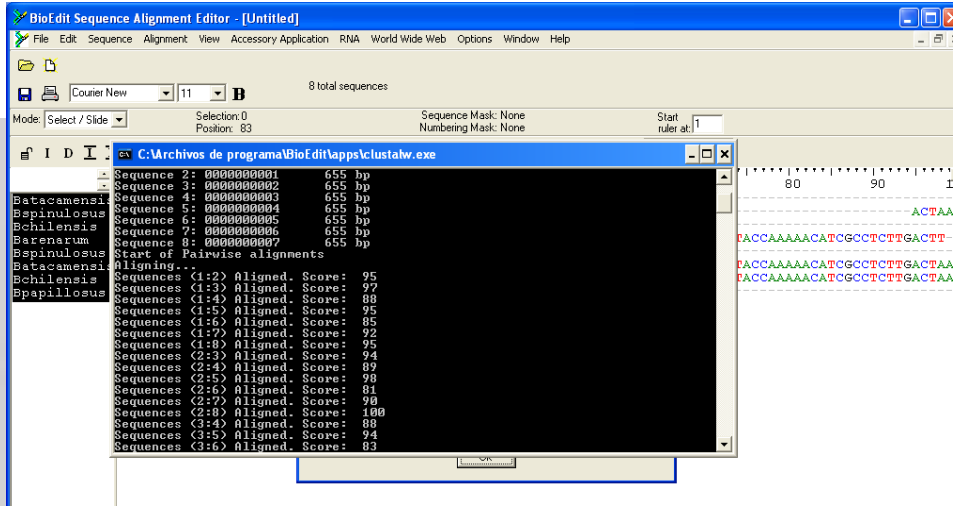


5. Vaya al menú Accessory Application y seleccione “ClustalW Multiple alignment” para efectuar un alineamiento múltiple de sus secuencias nucleotídicas.

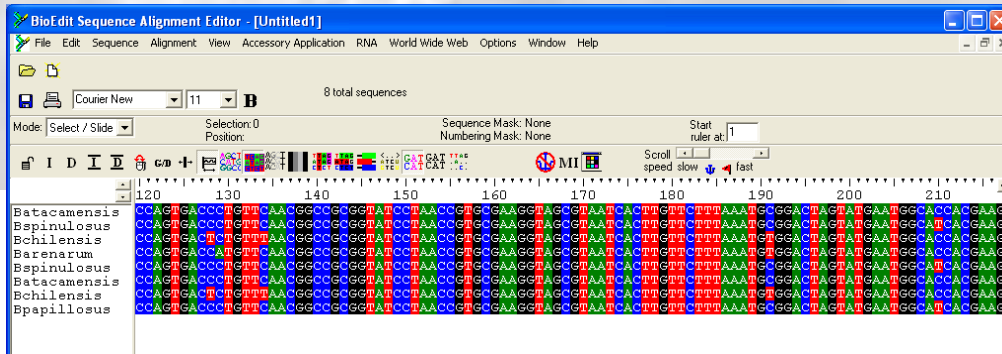
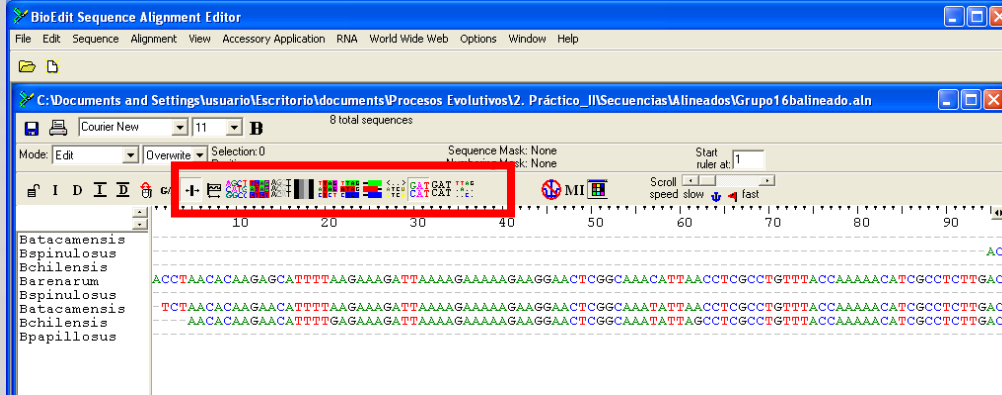


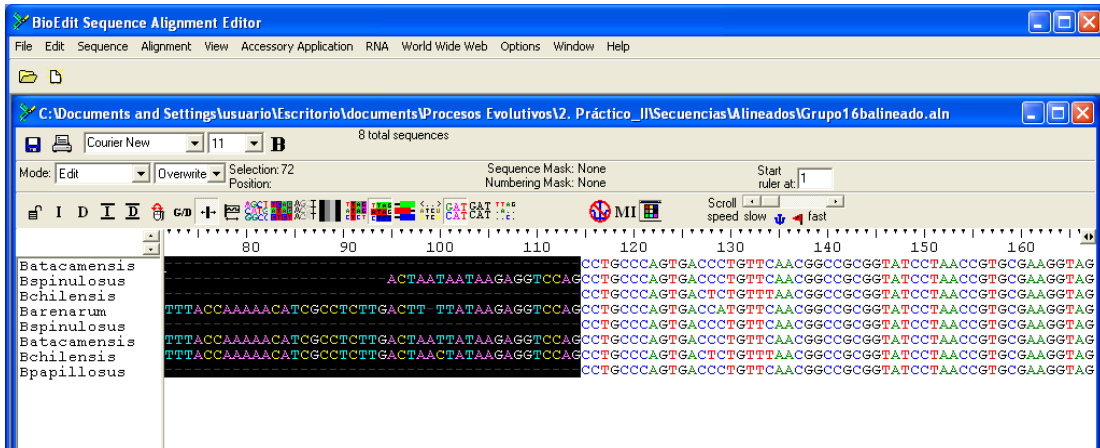
6. Proceda a dejar por defecto los parámetros y presione Run ClustalW para comenzar el alineamiento y la asignación de los scores en la comparación de pares de las secuencias.





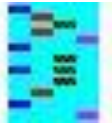
7.- Aparecerán las secuencias alineadas. Puede editarlas y analizarlas con los botones que se indican en la figura sobre el número que indica el largo de las secuencias (ver recuadro). Adicionalmente puede cortar las secuencias seleccionando los lugares y después suprima.





8.- Proceda a guardar y cerrar Bioedit.

Nota: Para cambiar de extensión use DnaSP (ejemplo de Fasta a Nexus).



Plataforma: DnaSP

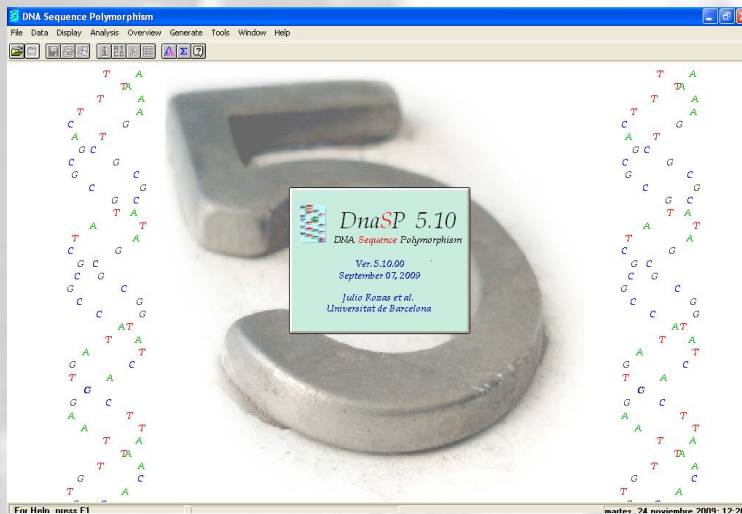
### Citas

Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP V5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

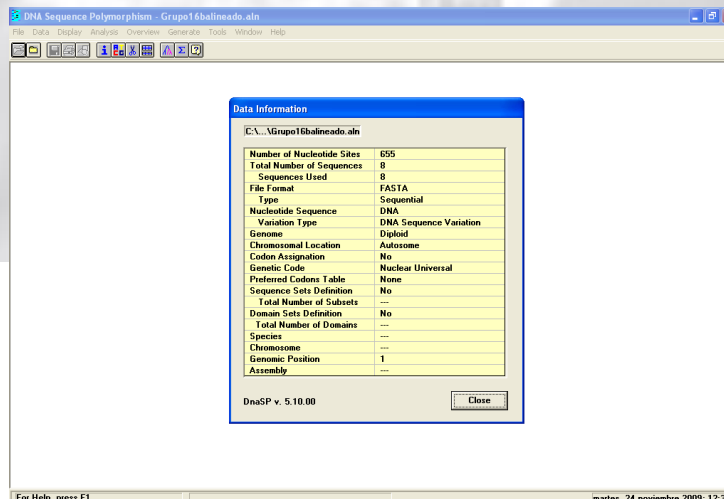
Rozas, J., P. Librado, J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer & R. Rozas. 2010. DnaSP version 5.10.1. (4 de marzo de 2010).

Disponible en el sitio Web: <http://www.ub.edu/dnasp>

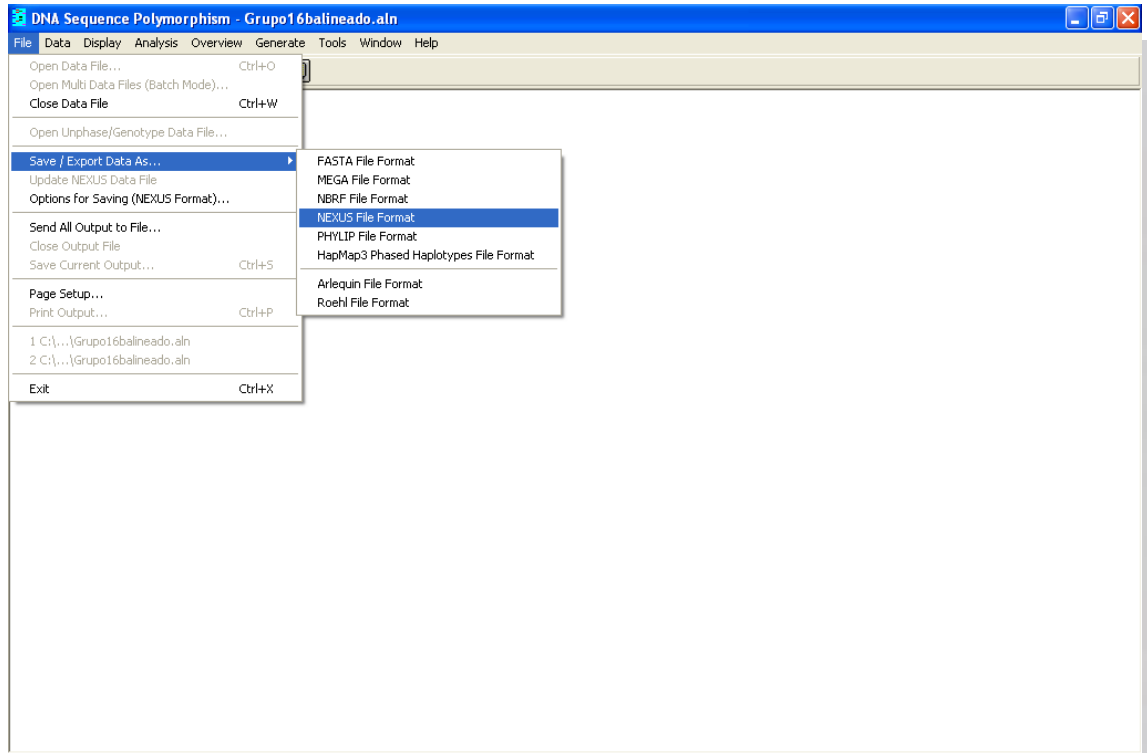
### 1.- Abra DnaSP



### 2.- Abra su archivo con las secuencias alineadas



3.- Vaya a file y transforme sus secuencias fasta a formato Nexus y grabe su nuevo archivo.



Para evaluar el grado de saturación de las secuencias nucleotídicas utilice el software Data Analysis in Molecular Biology and Evolution (DAMBE).



## Plataforma: DAMBE

### Citas

Xia, X. & Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.

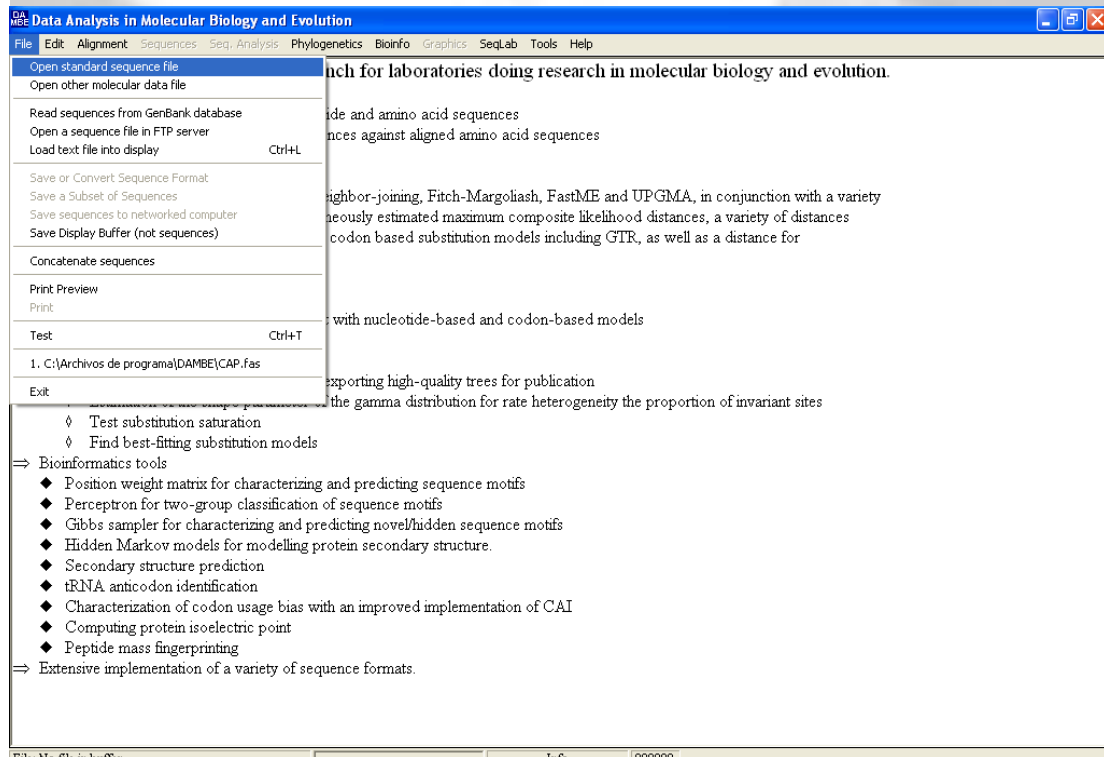
Xia, X., Z. Xie, M. Salemi, L. Chen & Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26:1-7.

Xia, X. 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30(7): 1720-1728 doi:10.1093/molbev/mst064.

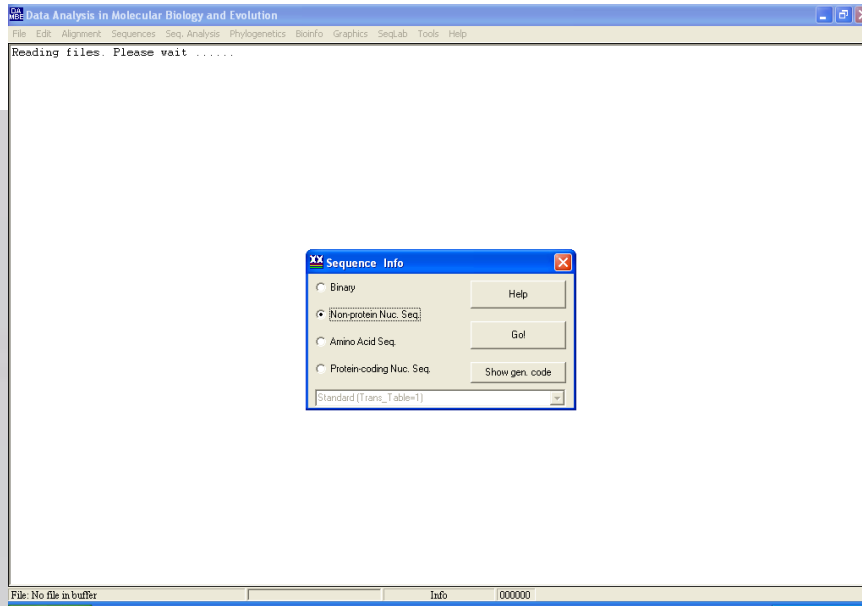
Sitio Web: <http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>

1.- Abra DAMBE

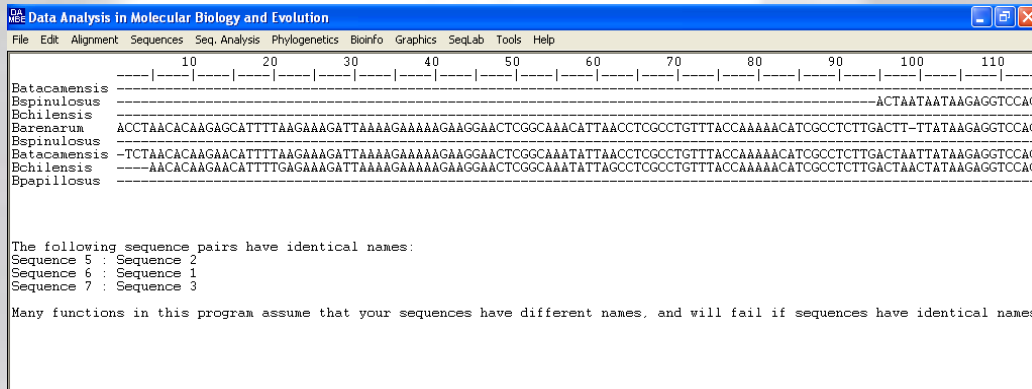
2.- Abra su archivo de secuencias nucleotídicas alineadas en el archivo File “Open standard sequence file”.



3. - Indique la información pertinente a sus secuencias nucleotídicas

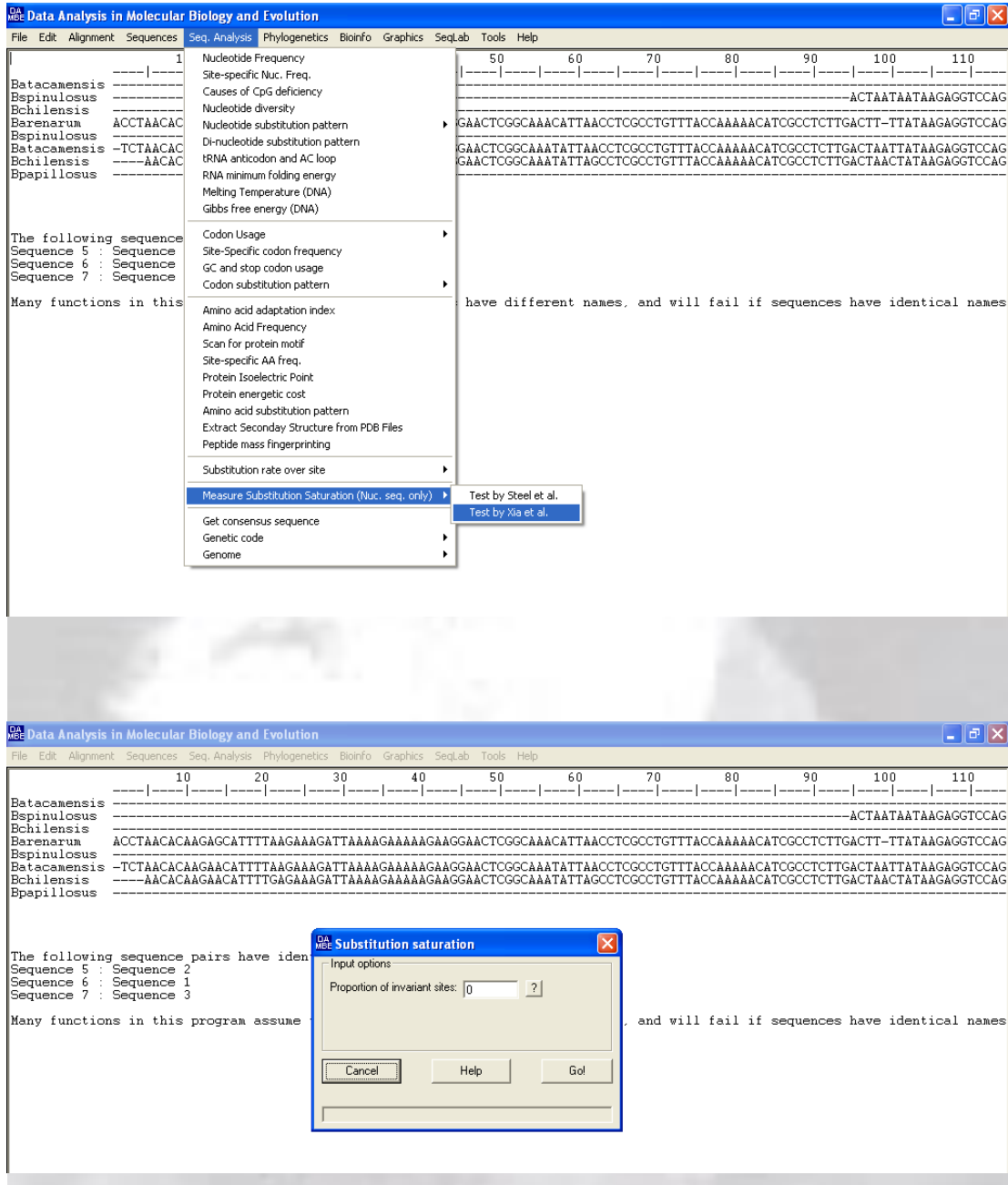


4.- Aparece la información de sus secuencias nucleotídicas

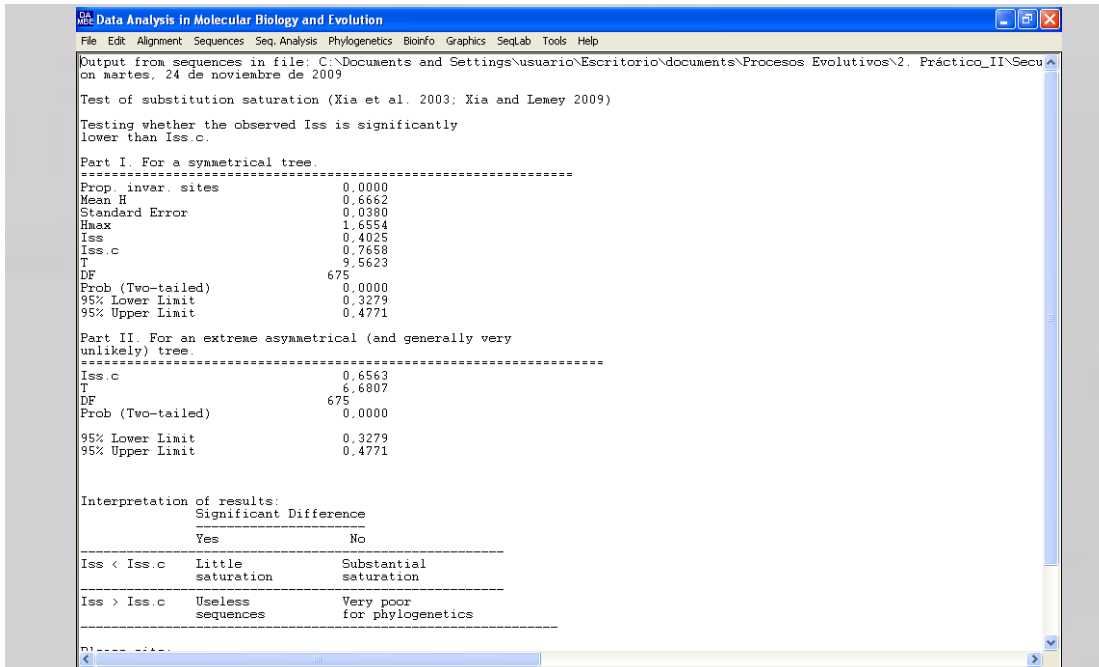




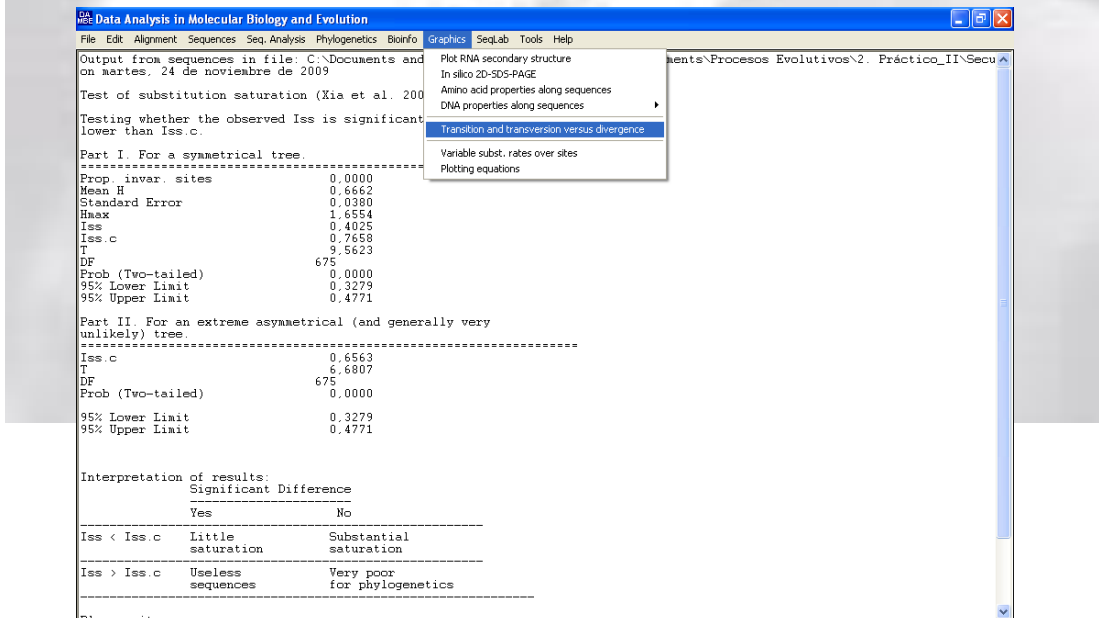
5.- Vaya al menú Seq. Analysis y elija “Measure Substitution Saturation” y seleccione el Test de Xia et al. (2001).

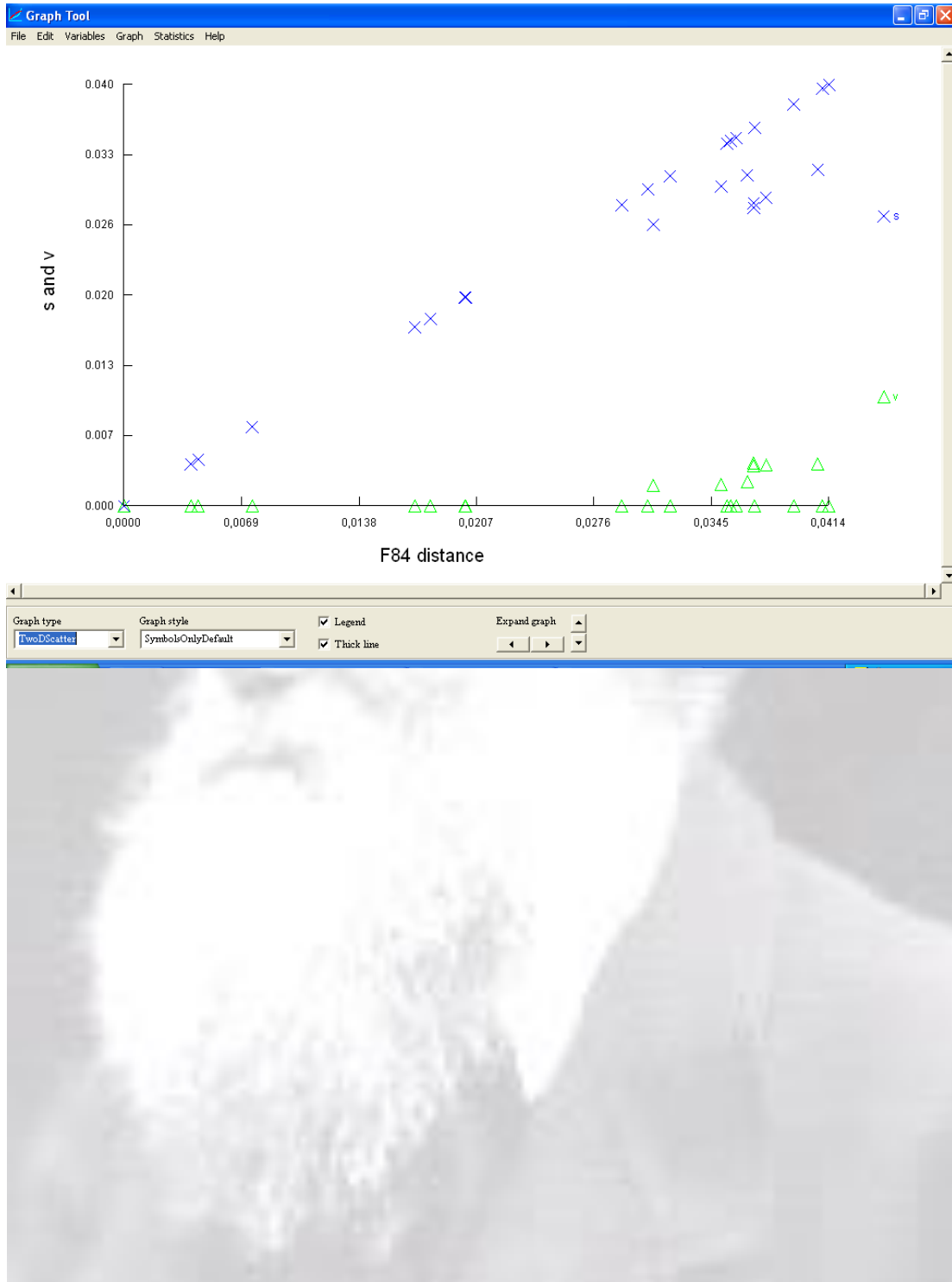


6.- Evalúe el grado de saturación (e.g. pequeña, substancial) de sus secuencias mediante la interpretación de los resultados para un árbol simétrico. Iss<Iss.c indica poca saturación.



7.- Vaya al menú Graphics y procede a graficar “Transition and Transversion versus divergence”. Seleccione el modelo de distancia (Por defecto en DAMBE es F84 distance).





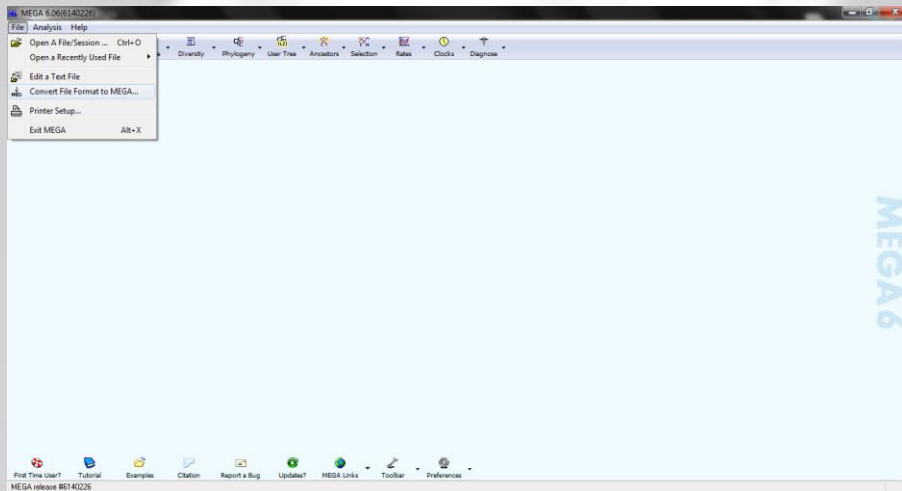


## Plataforma: MEGA

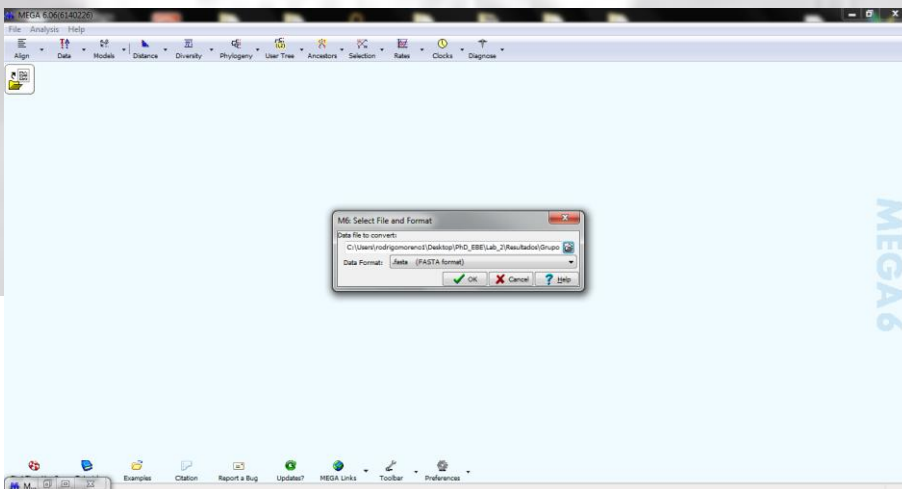
### Cita

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipiski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

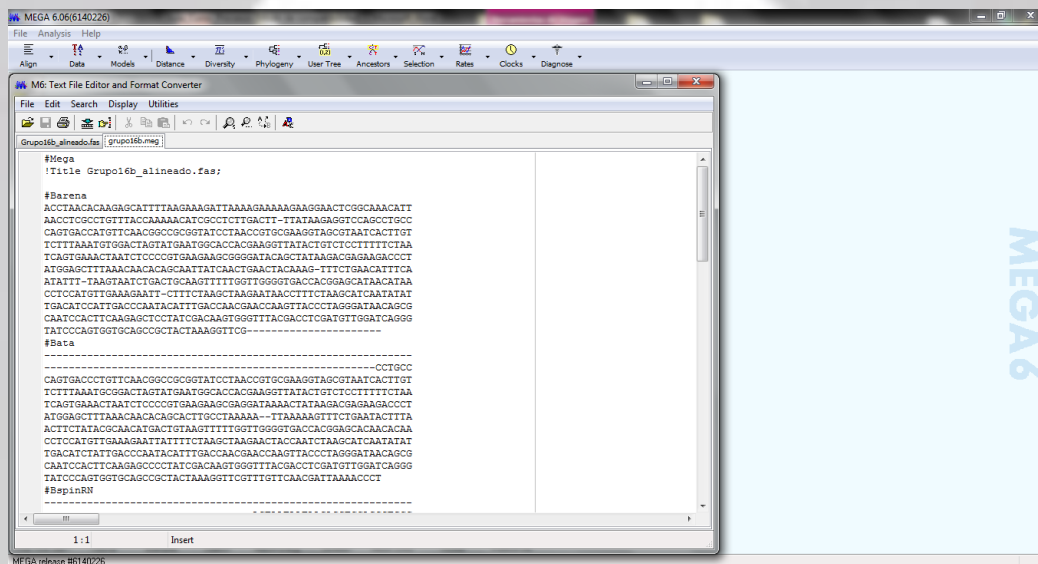
- 1.- Abrir el Programa MEGA6
- 2.- En el menú **File** elegir la opción **Convert To MEGA Format**. Esta opción permite convertir el archivo **.fas** en un archivo **.meg**



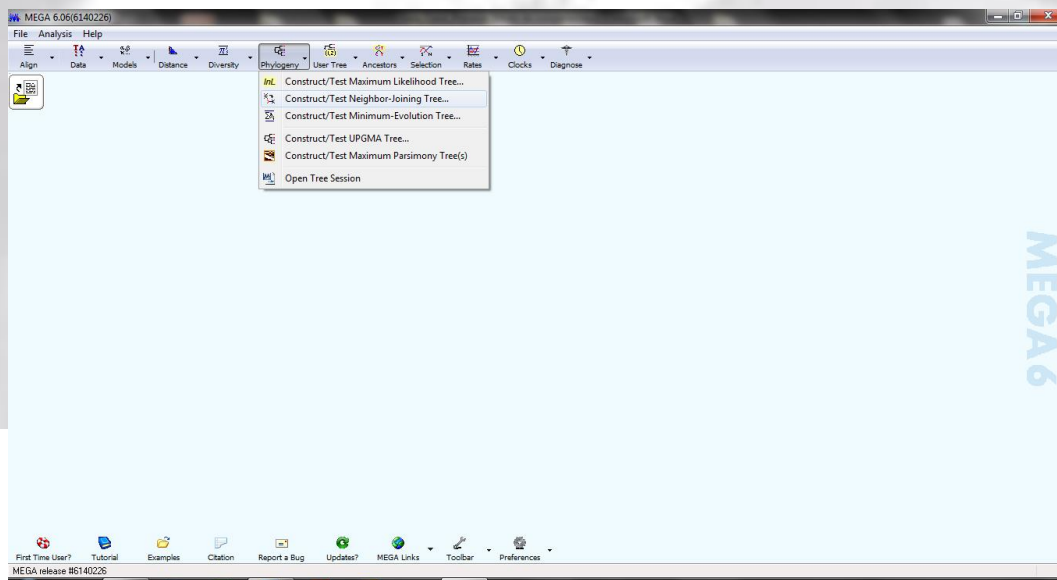
- 3.- Vaya a su carpeta donde guardo el archivo **.fas** y presione OK. Proporcione un nombre a su archivo **.meg**



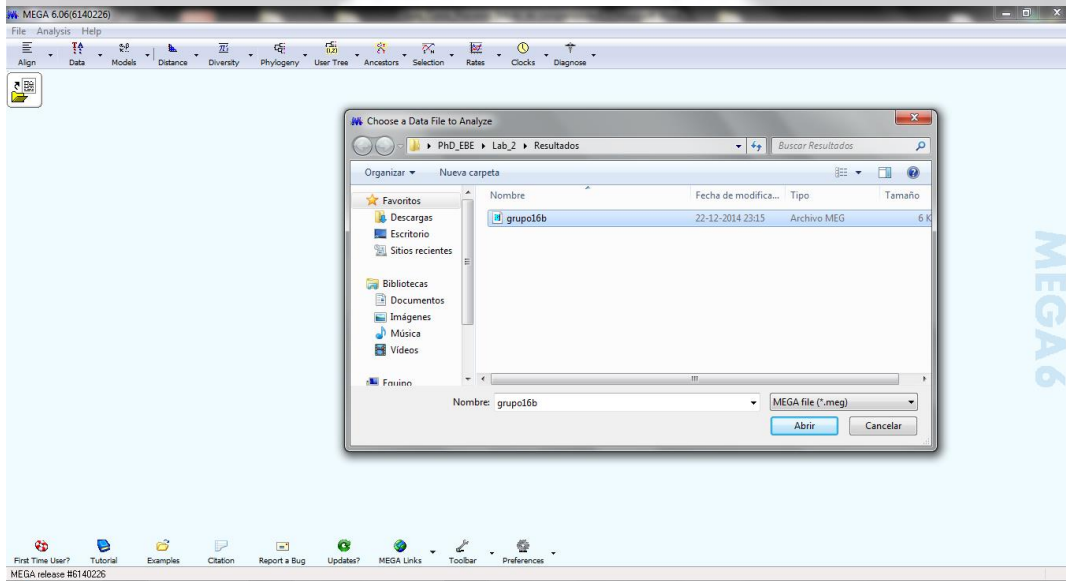
4.- Una vez finalizado el paso anterior, se desplegará una pantalla donde podrá visualizar sus secuencias alineadas de su archivo grupo16b en formato *.meg*



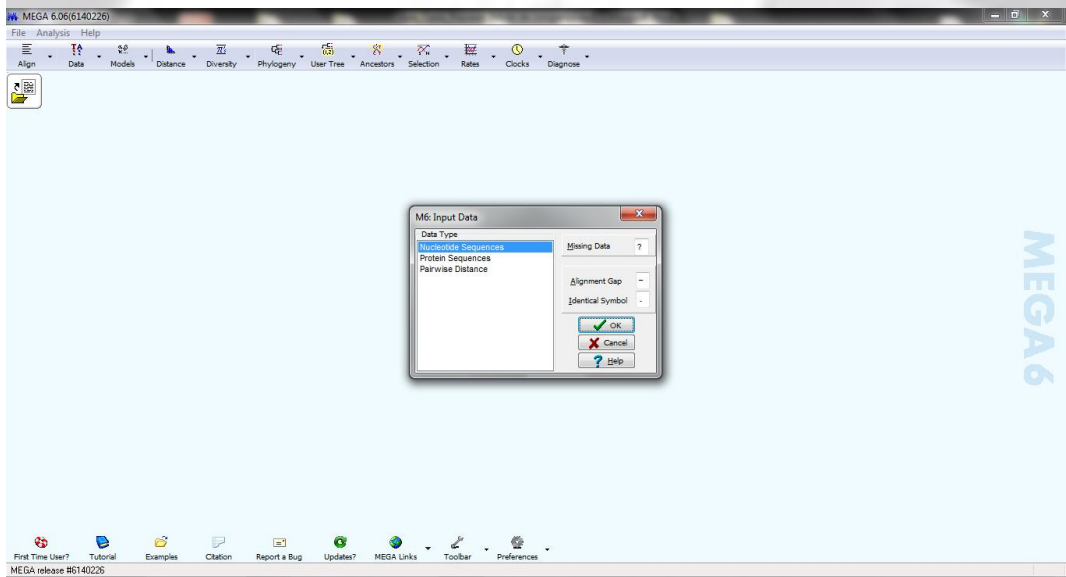
5.- Vaya al menú **Phylogeny** y ocupe la opción **Construct/Test Neighbor-Joining Tree**



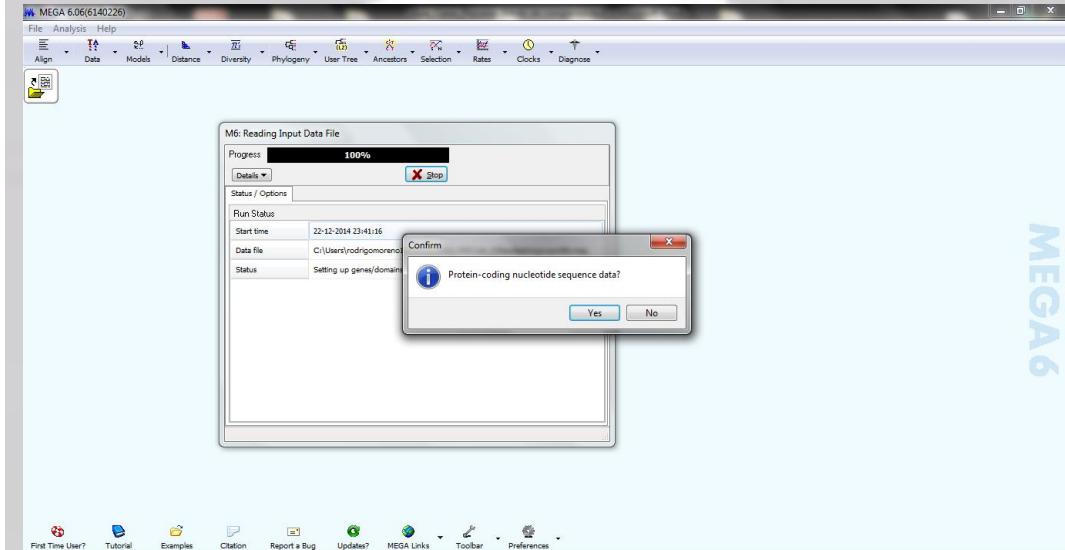
6.- Abra y seleccione su archivo grupo16b .meg



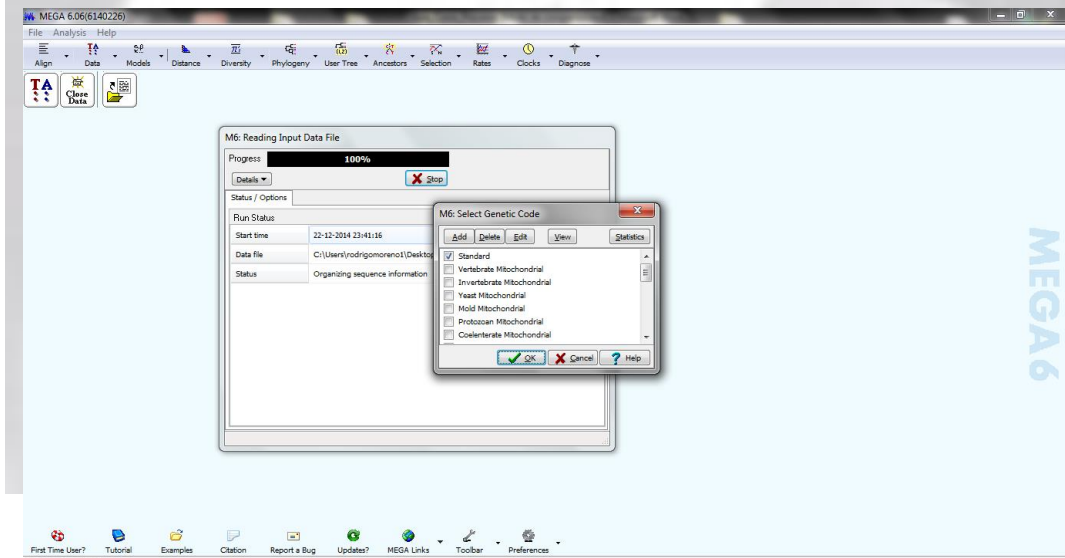
7.- Seleccione el tipo de dato: Nucleotide Sequences



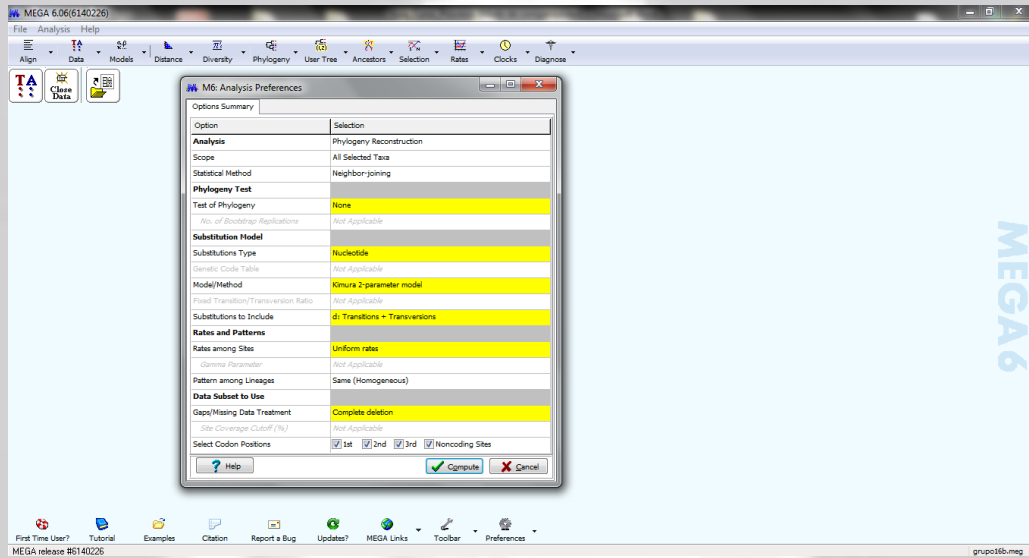
8.- Para confirmar, MEGA le preguntará si sus datos son secuencias nucleotídicas.



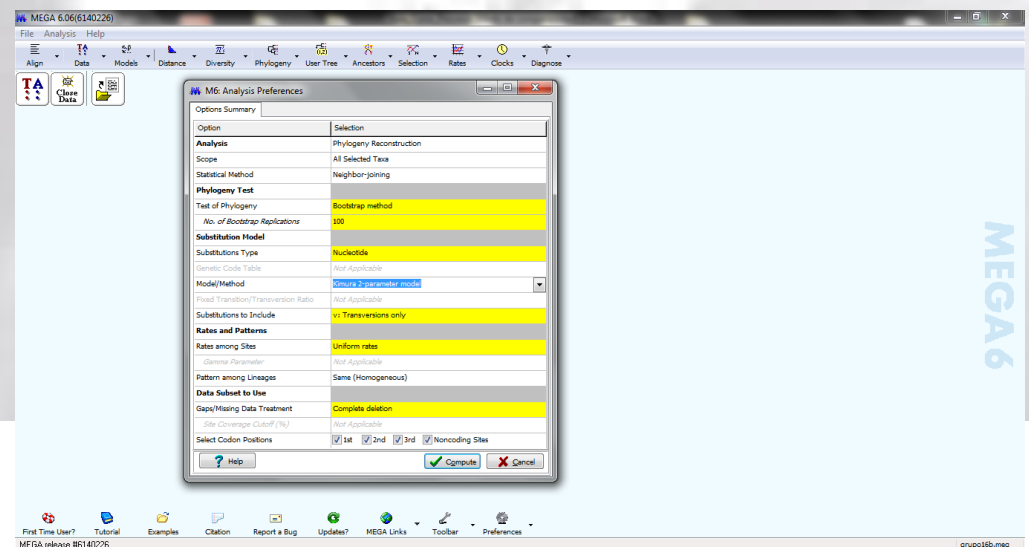
9.- Seleccione el código genético: **Standard**



10.- Se desplegará una pantalla que indica: **Analysis Preferences**

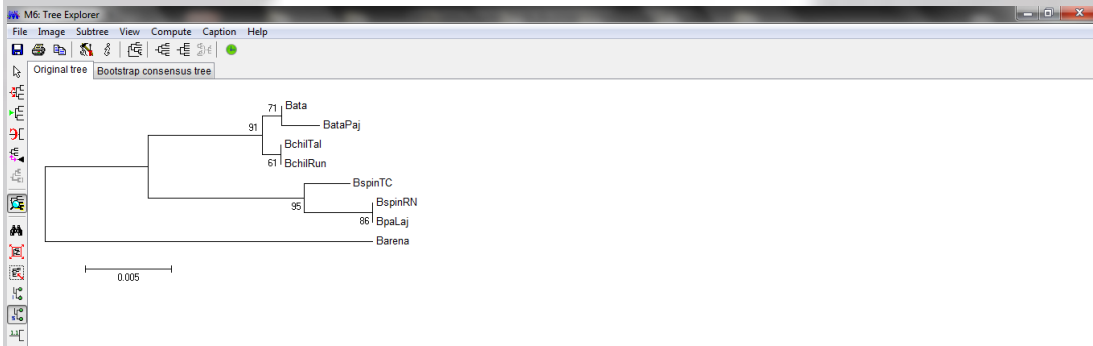


11.- Seleccione en la opción **Test Phylogeny: Bootstrap method** como medida de soporte estadístico. Asigne el n° de réplicas, el tipo de sustitución (**Nucleotide/Syn-Nonsynonymous, Amino acid**), el modelo/método (i.e. **Kimura 2-parameter model**), y sustituciones (**d: Transitions+Transversions / s: Transitions only / v: Transversions only**).

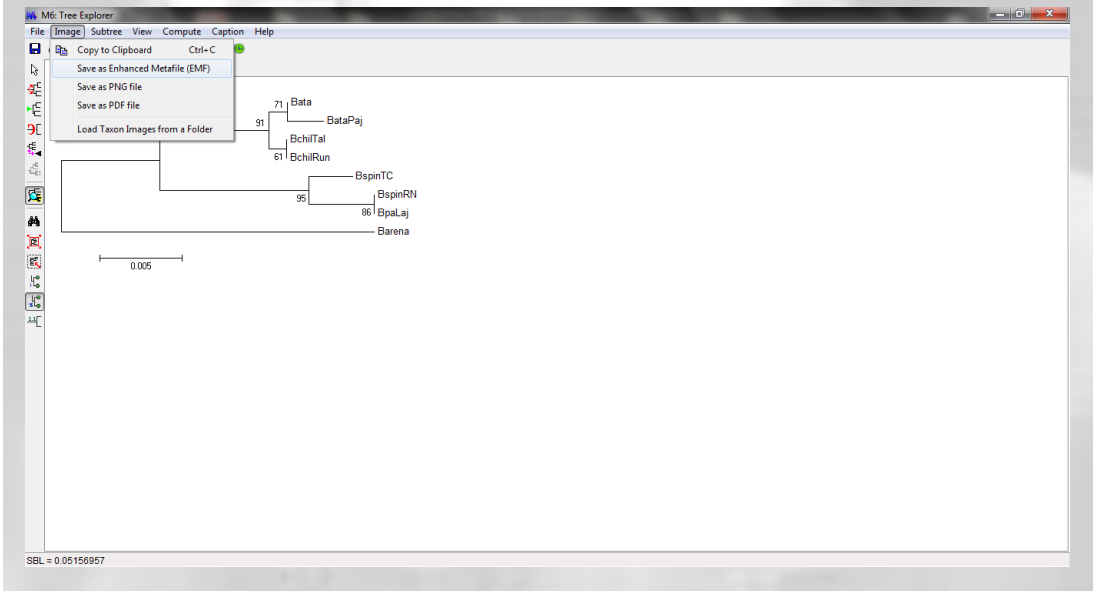




12.- Árbol de distancia de **Neighbor-Joining** con las medidas de soporte estadístico del método **Bootstrap**.



13.- Guarde la figura correspondiente. Vaya al menú **“Image”** y seleccione **“Save as Enhanced Metafile (EMF)”**.



**Software PAUP\* (Phylogenetic Analysis using Parsimony \*and other methods)**

**1.- Análisis Filogenético de Máxima Parsimonia en Software PAUP (idem a página 5)**

**2.- Análisis Filogenético de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood)**



**Citas**

Posada, D. & K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.

Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

Darriba, D., G.L. Taboada, R Doallo & D. Posada. 2012. jModeltest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.

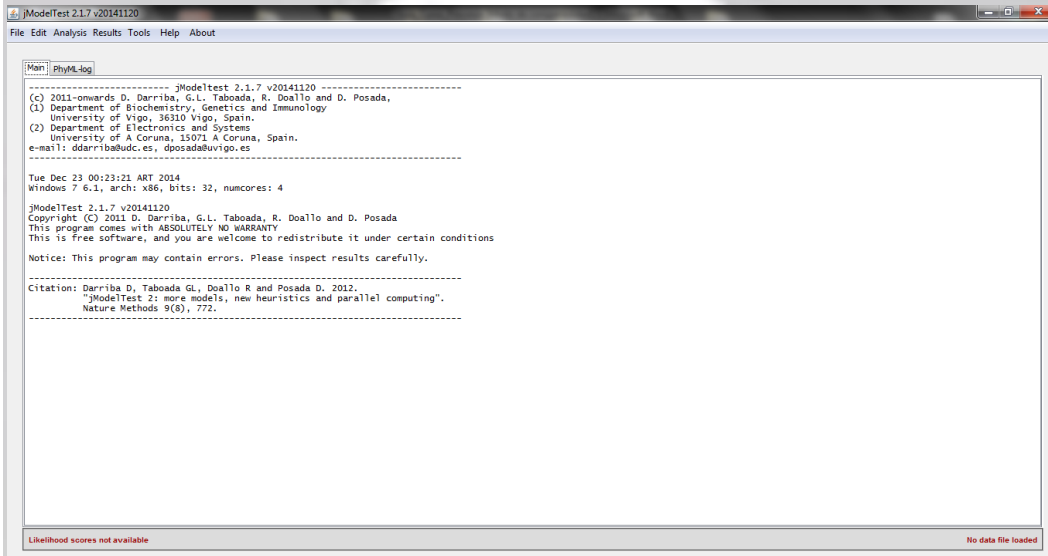
Sitio web: <https://code.google.com/p/jmodeltest2/>

**Archivo Tipo:** Grupo 16b

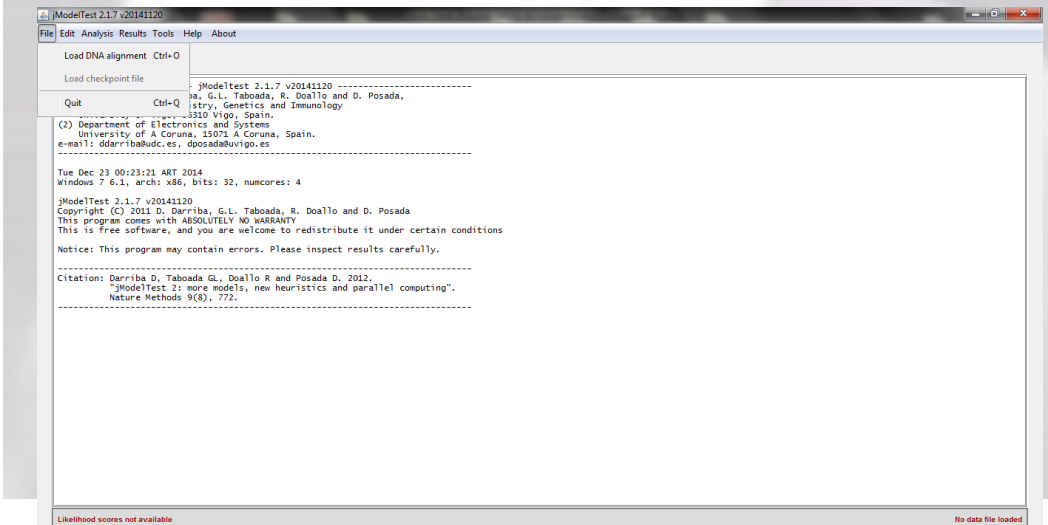
**Procedimiento**

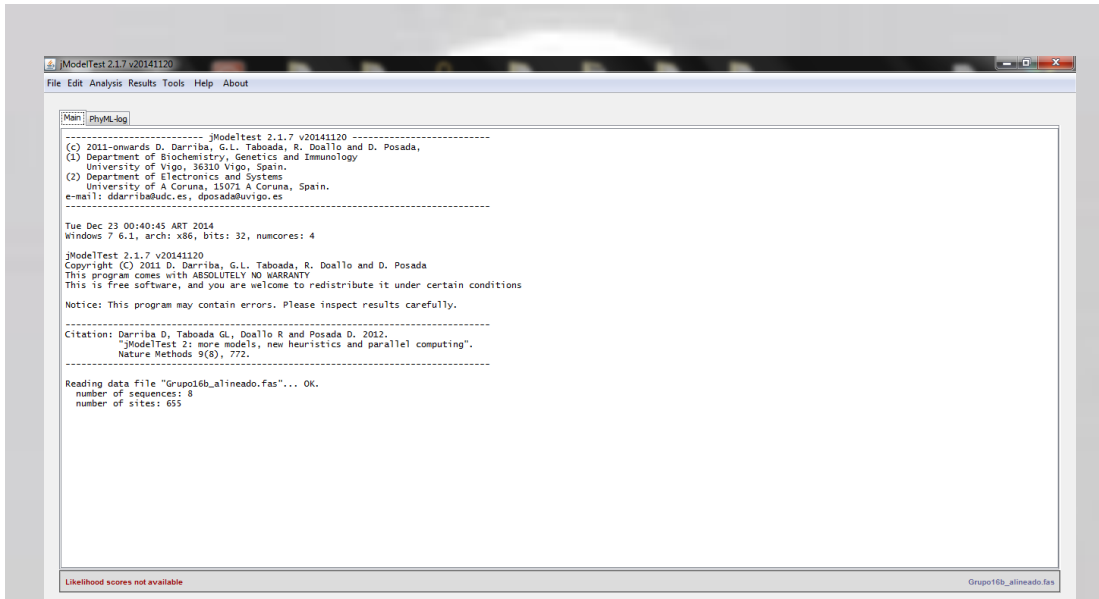
Buscar el mejor modelo de sustitución nucleotídica que se ajusta a los datos.

1.- Abra la consola de jModelTest2

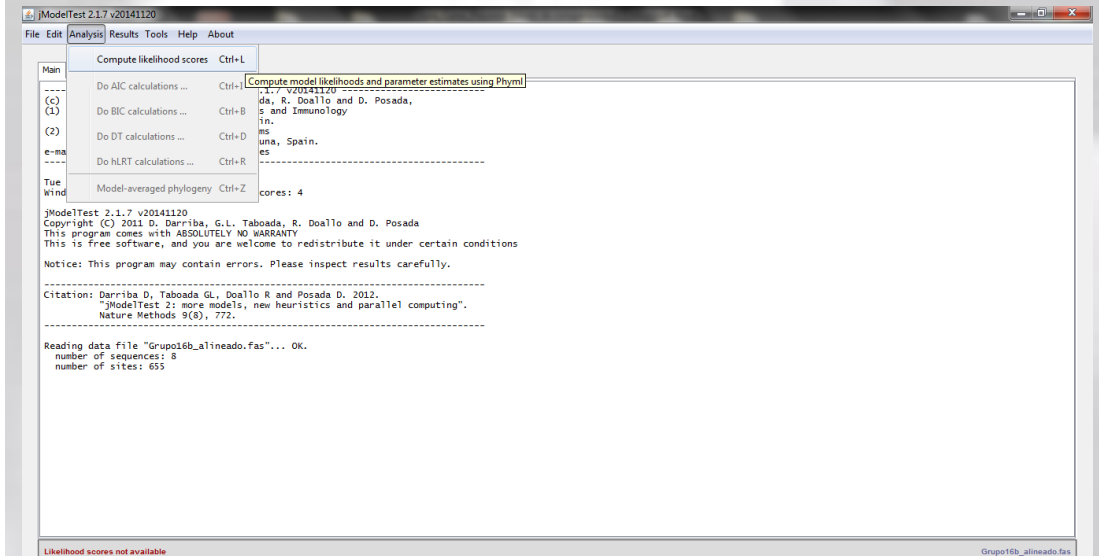


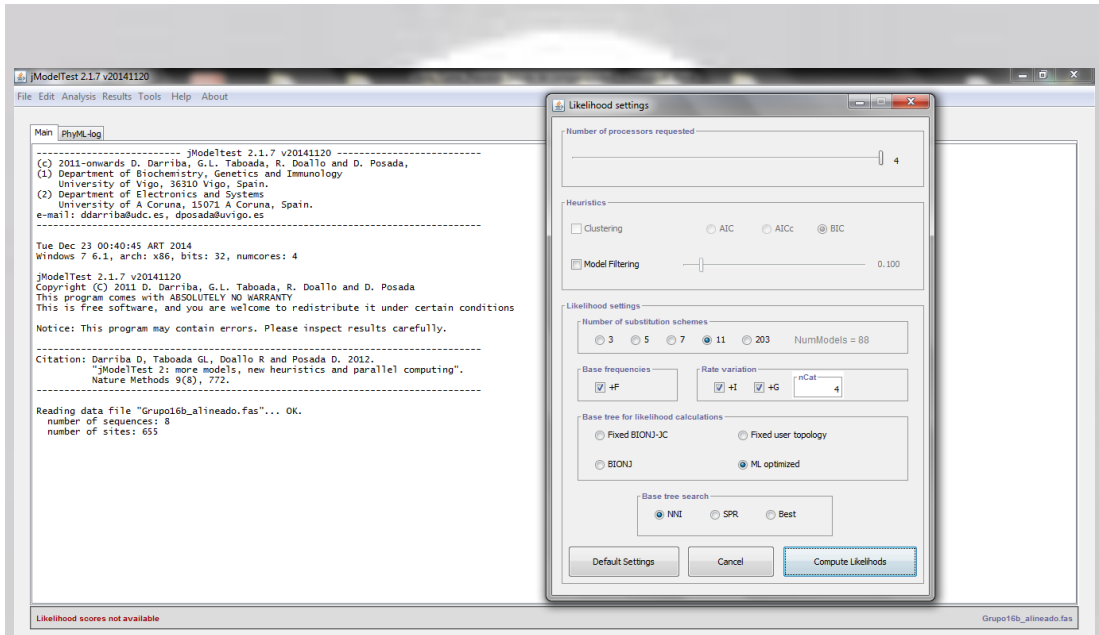
2.- Vaya al menú file y cargue su archivo con sus secuencias alineadas en formato .fas



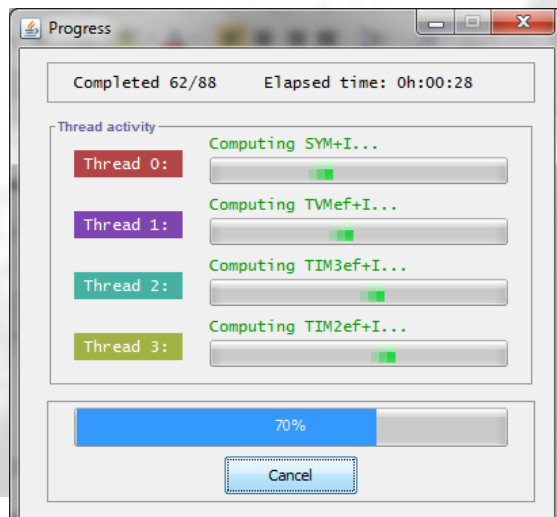


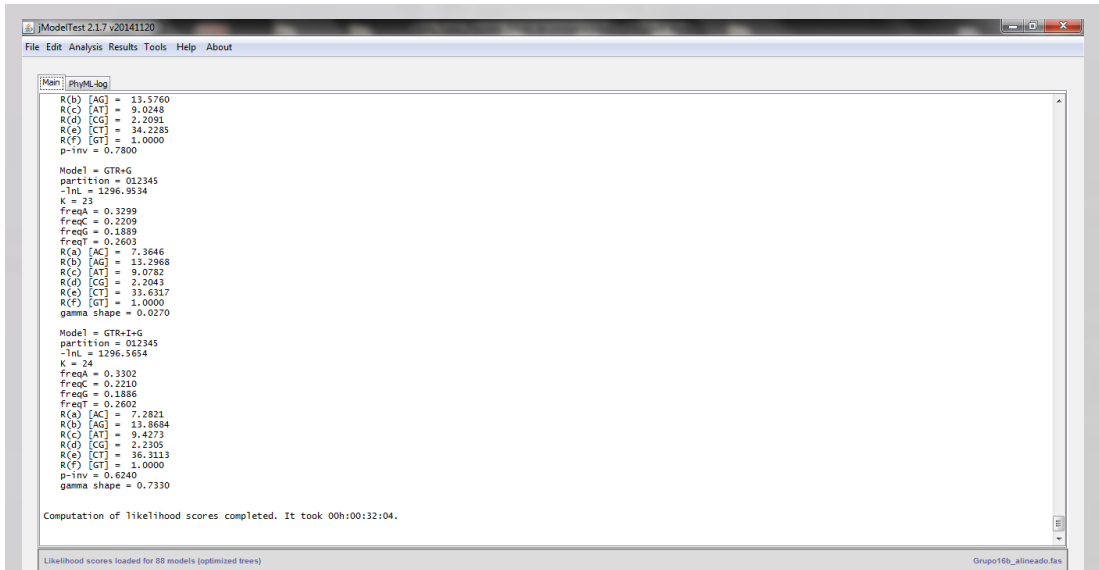
3.- En la ventana desplegada en jModelTest2 vaya al menú “**Analysis**” seleccione “**compute likelihood scores**” deje los parámetros por defecto y ejecute el análisis.



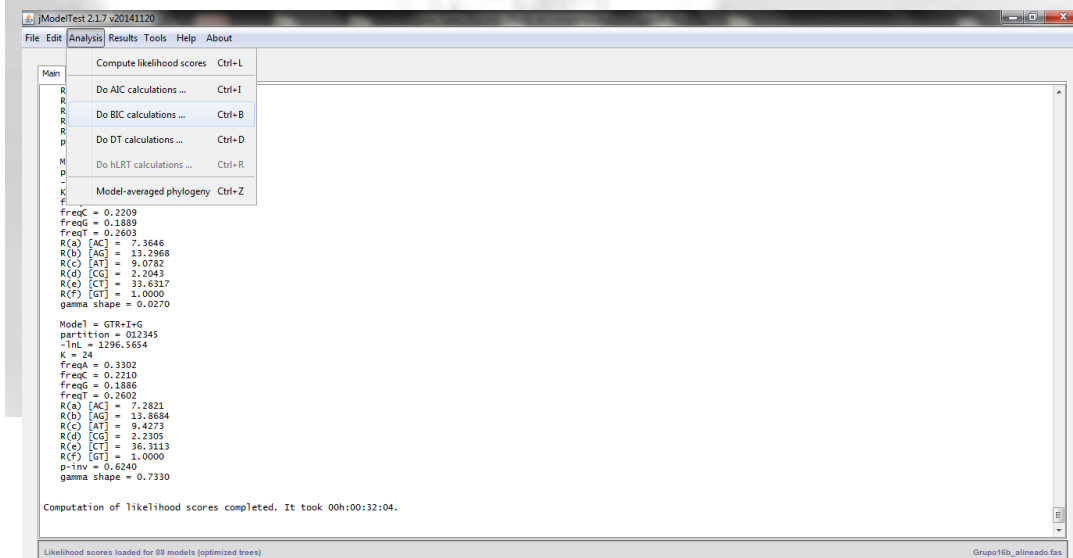


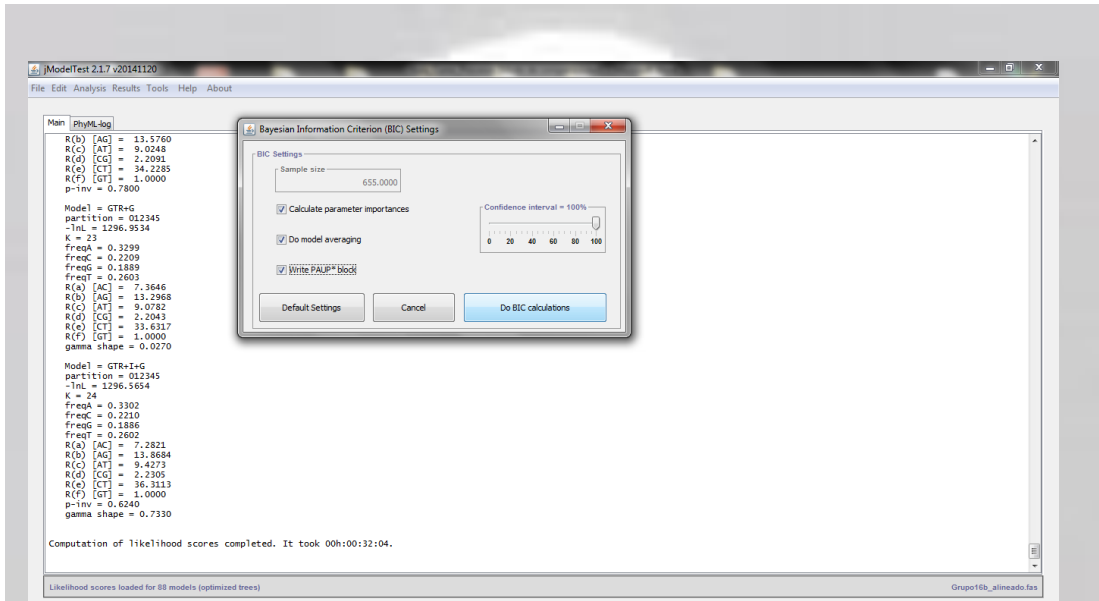
4.- Una vez terminado el análisis debe cerciorarse que aparezca “computation of likelihoods scores completed”.



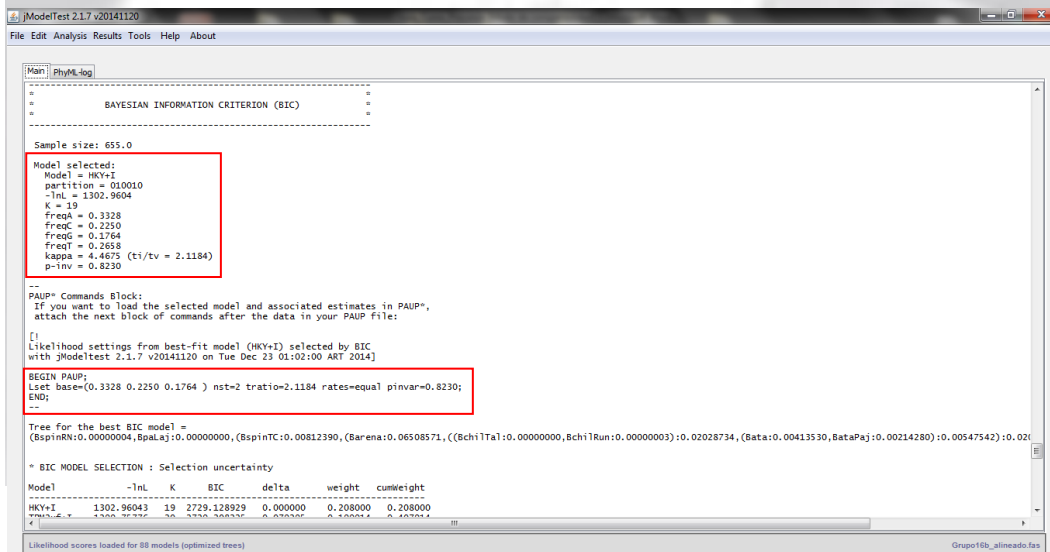


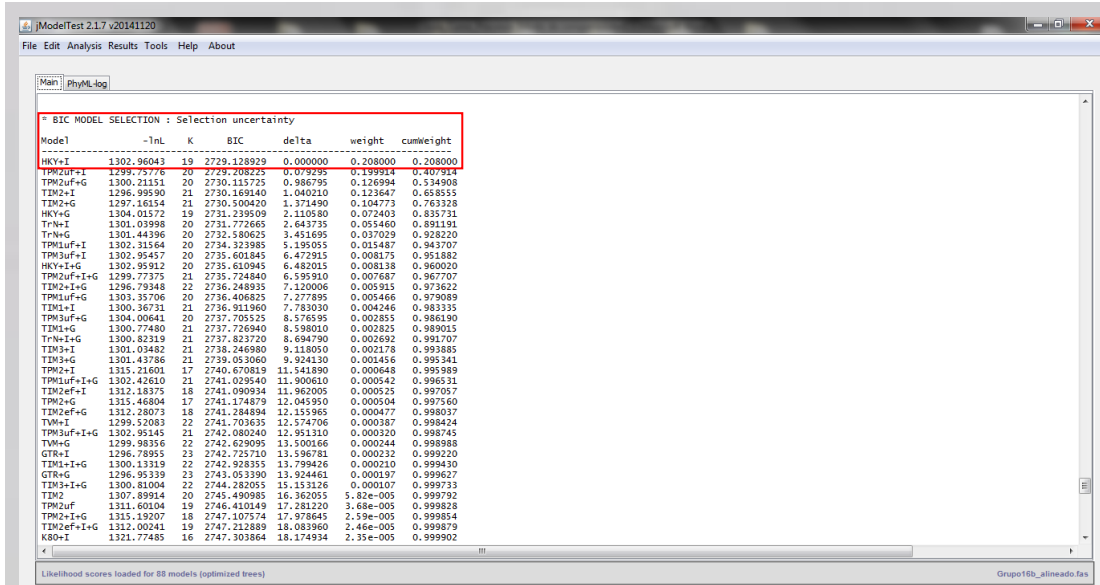
5.- Vaya al menú **“Analysis”** y ejecute un criterio de información disponibles en jModelTest2: Criterio de Akaike (AIC), Bayesian Information Criterion (BIC), Decision Theory (DT), hLRT, Model-average phylogeny. Adicionalmente, seleccione **“Write PAUP Block”** para obtener las líneas de comandos que serán adicionadas posteriormente en el archivo Nexus original para ejecutar en el análisis de Maxima Verosimilitud en la plataforma PAUP.



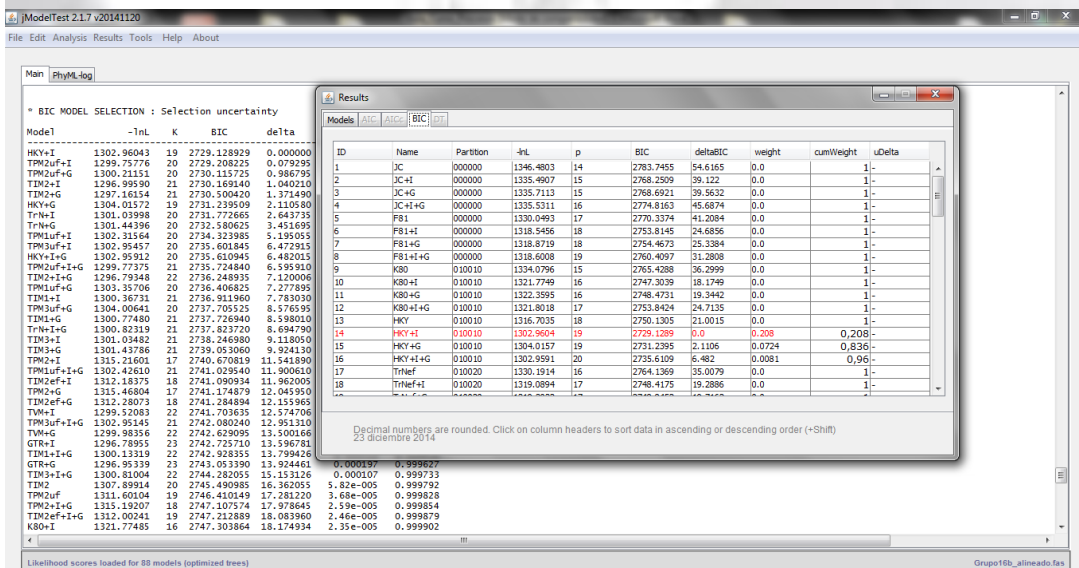


6.- Fíjese en los recuadros de color rojo las indicaciones mencionadas en el punto anterior. En este ejemplo se utilizó el modelo BIC.





7. Vaya al menú “Results” y ejecute “Show results table” donde jModelTest2 desplegará una tabla con los modelos de sustitución donde debe seleccionar el modelo con menor “likelihood scores”. Ejecute doble click en la tabla, seleccione el criterio elegido (i.e. BIC) y automáticamente le arrojará en color rojo el mejor modelo seleccionado y sus parámetros obtenidos en el análisis (en el ejemplo: HKY+I) .





8. Cierre jModelTest2 y proceda a abrir su archivo Nexus y copie al final las líneas de comandos obtenidas en jModelTest2 (copie de la consola con ctrl+c) bajo un criterio de información (i.e. BIC) para realizar el análisis de Máxima Verosimilitud.

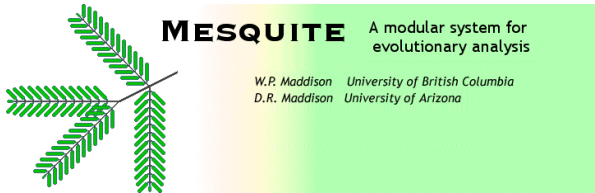
```

grupo16b.nex: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
.....CT...AA.....T...
.....G.....C...
-----
bch1run ----A.....G.....T.....G.....
.....AAC.....TC.....T.....
.....C.....A.....A.....A.....
.....G.....T.....A.....A.....
.....T.....CT.C.G..C.C..CA.....T.....C.....
.....TTC.....T.....AA.....A.....C.....
.....C.....
-----
bpalaj
.....C.....T.....
.....G.....C.....T.....A.....
.....TCC..AT..CT.C.A..GA..A.....T.....G.....
.....AT.....T.....A.....T.....
.....TTTGTTCAACGATTAAACCT
;
END;
BEGIN CODONS;
  CODESET = UNTITLED = universal: all;
END;
BEGIN CODONUSAGE;
END;
BEGIN dnasp;
  genome= Diploid;
  chromosomeLocation= autosome;
  variationType= DNA_seq_Pol;
  Species= ---;
  chromosomeName= ---;
  genomicPosition= 1;
  genomicAssembly= ---;
  dnaspVersion= ver. 5.10.01;
END;
BEGIN PAUP;
  Lset base=(0.3328 0.2250 0.1764 ) nst=2 tratio=2.1184 rates=equal pinvar=0.8230;
END;

```

9. Ejecutar el archivo Nexus modificado en PAUP\*; cambie el criterio a *likelihood* y realizar una búsqueda exhaustiva o heurística y un bootstrap no-paramétrico. Guarde las salidas (outputs) y cierre PAUP\*. Recuerde de seguir los mismos pasos que se utilizaron para la reconstrucción por Máxima Parsimonia y grabe su árbol el cuál aparecerá en su carpeta como grupo 16b con extensión *.tre* para ser desplegado en el software Treeview. Recuerde ir al menú Tree y seleccione **show internal Edge labels** para que despliegue los valores de soporte de los nodos obtenidos en su análisis de Bootstrap no-paramétrico.

set\_criterion=likelihood [Cambio de criterio a método de Máxima Verosimilitud].

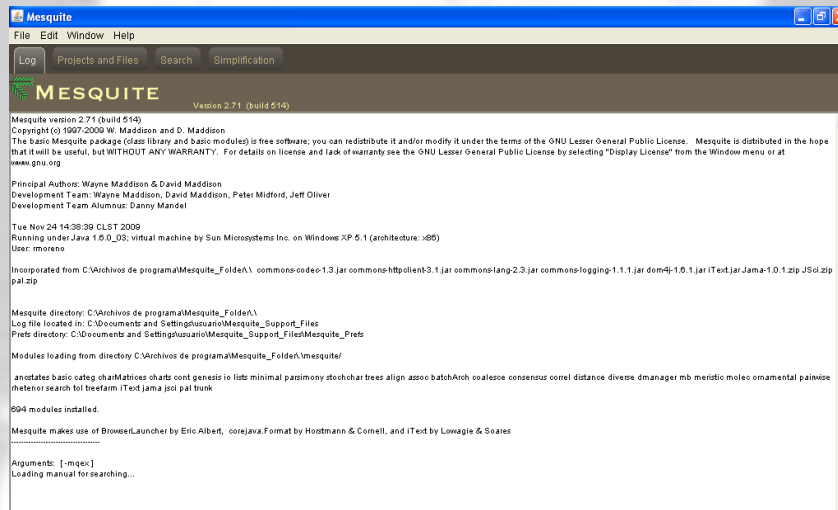


**Nota:** Para preparar su archivo Nexus para el análisis en MrBayes utilice MESQUITE.

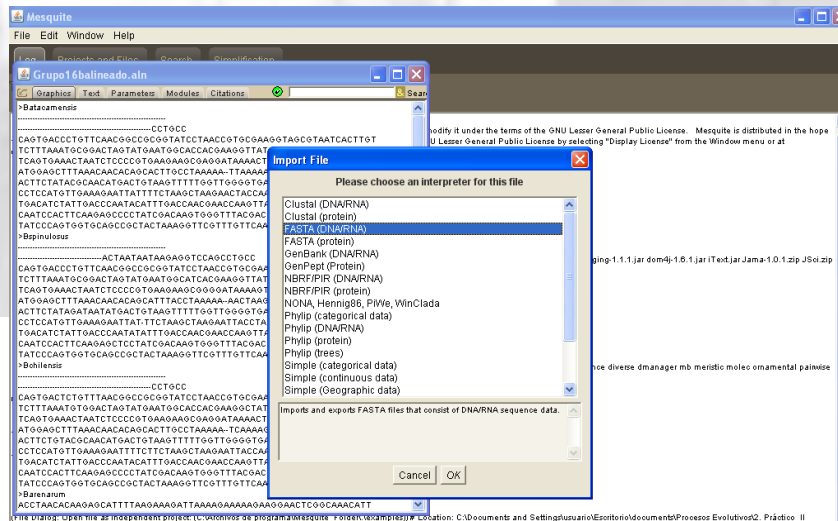
**Plataforma:** MESQUITE (A modular system for evolutionary analysis)

Sitio web: <http://mesquiteproject.wikispaces.com>

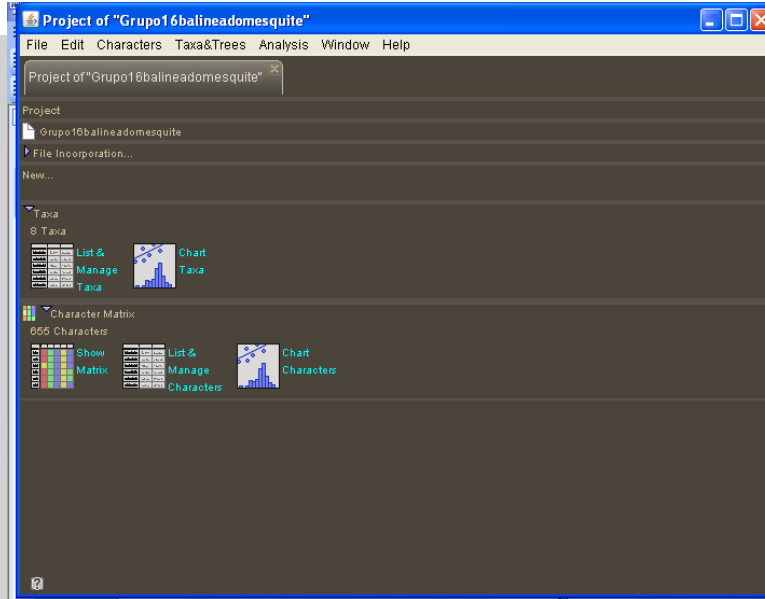
1.- Abra el software MESQUITE



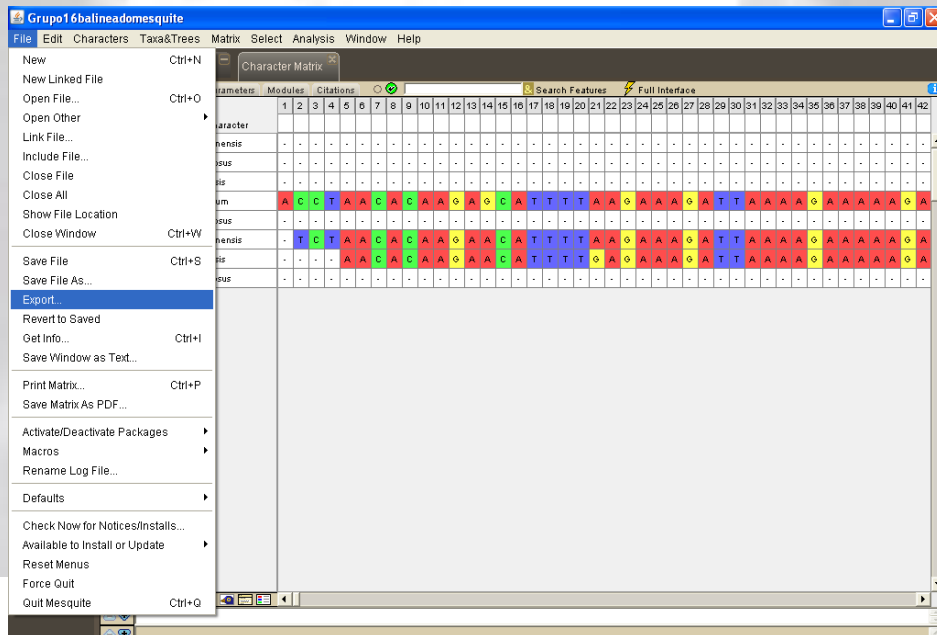
2.- Proceda a abrir sus secuencias alineadas previamente seleccionando FASTA DNA/RNA.



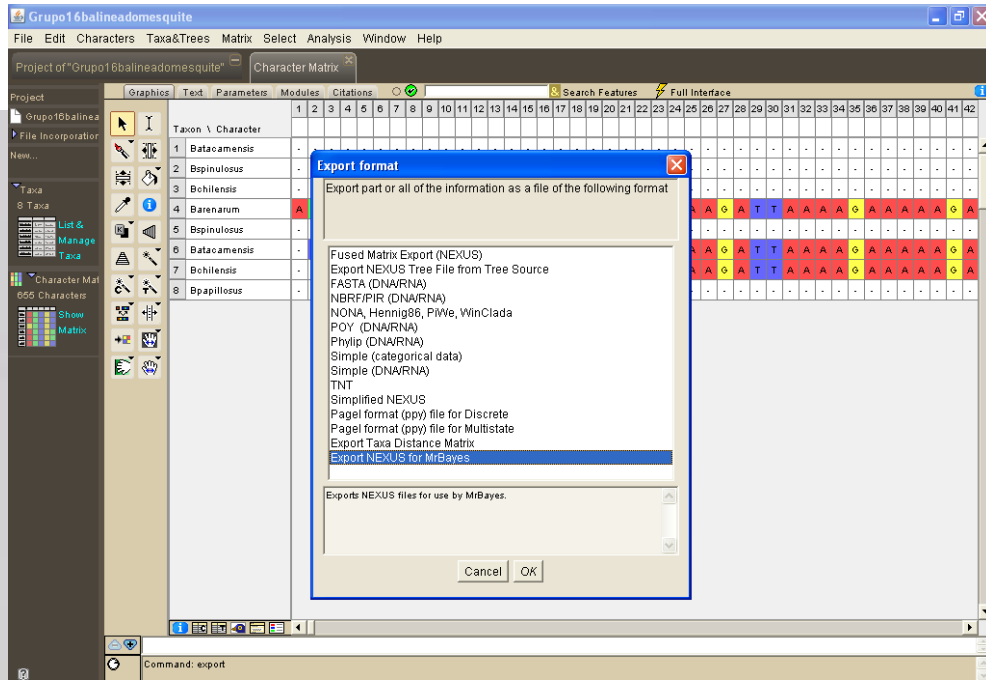
3.- Guarde su archivo con un nuevo nombre y ejecute “**Show Matrix**” donde se desplegará la matriz de sus secuencias nucleotídicas.



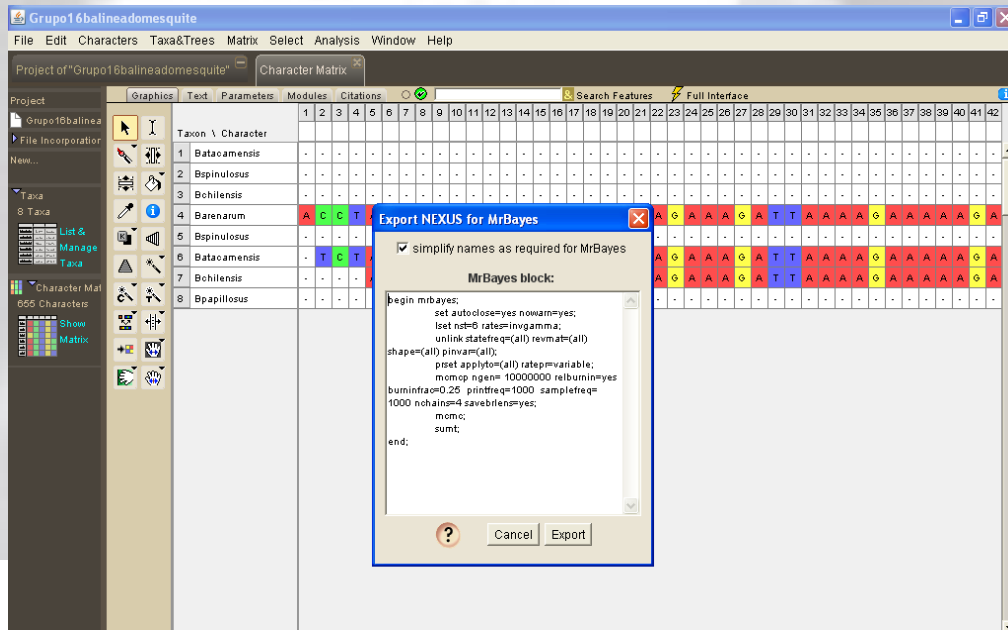
4.- Vaya al menú file y ejecute “**Export**”.



5.- Seleccione “Export Nexus for MrBayes”.



6.- MESQUITE le proporcionará el block para ejecutar directamente los parámetros y el modelo de evolución molecular para MrBayes.



7.- Ejecute “Export” y proceda a guardar su archivo con extensión Nexus. Cierre MESQUITE.

## Análisis Filogenético de Inferencia Estadística Bayesiana



### Plataforma: MrBayes

#### Citas

Huelsenbeck, J.P. & F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.

Ronquist, F. & J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Sitio web: <http://mrbayes.sourceforge.net>

#### **Procedimiento**

1.- Copie el archivo Nexus obtenido del procedimiento anterior en MESQUITE y trasládalo a la carpeta de MrBayes. Proceda a ejecutar los comandos que se indican más abajo.

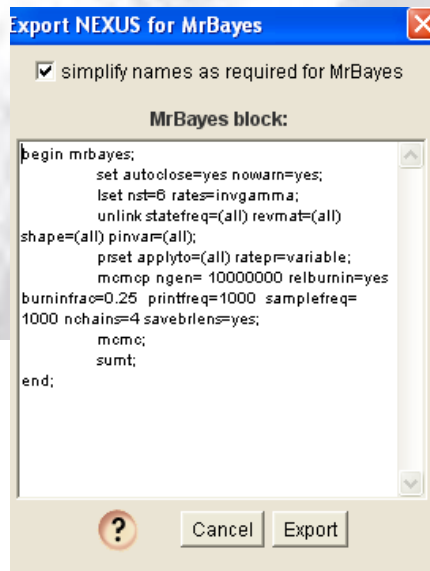
#### **Ejemplo archivo Tipo: grupo16b**

2.- Ejecute:                                    exe\_grupo16b.nex

3.- Empezará a ejecutarse automáticamente el análisis con los parámetros y el modelo de evolución molecular seleccionado previamente en MESQUITE.

La estructura del modelo: lset\_nst=6\_rates=invgamma.

Parámetros: mcmcp\_ngen=10000000\_samplefreq=1000\_nchains=4\_savebrlens=yes  
Burnin=sumt



```

C:\Documents and Settings\usuario\Escritorio\documentos\Procesos Evolutivos\2. Práctico_II\Demostración MrBayes\mrbayes-3.1.2\mrbayes.exe
6 -- Prior = All topologies equally probable a priori
   Parameter = Brlens
   Prior = Branch lengths are Unconstrained:Exponential(10.0)

Number of taxa = 8
Number of characters = 655
Compressing data matrix for division 1
Division 1 has 71 unique site patterns
The MCMC sampler will use the following moves:
With prob. Chain will change
 4.17 % param. 1 (reumat) with Dirichlet proposal
 4.17 % param. 2 (state frequencies) with Dirichlet proposal
 4.17 % param. 3 (gamma shape) with multiplier
 4.17 % param. 4 (prop. invar. sites) with sliding window
 62.50 % param. 5 (topology and branch lengths) with extending TBR
 20.83 % param. 5 (topology and branch lengths) with LOCAL
Creating parsimony (bitset) matrix for division 1
Initializing conditional likelihoods for terminals
Initializing invariable-site conditional likelihoods
Initializing conditional likelihoods for internal nodes
Initial log likelihoods for run 1:
Chain 1 -- -1751.086105
Chain 2 -- -1700.182238
Chain 3 -- -1742.934293
Chain 4 -- -1654.596459
Initial log likelihoods for run 2:
Chain 1 -- -1721.512347
Chain 2 -- -1714.807558
Chain 3 -- -1713.546920
Chain 4 -- -1720.411452

Chain results:

1 -- (-1751.086) (-1700.182) (-1742.934) [-1654.596] * [-1721.512] (-1717.511) (-1713.547) (-1720.411)
1000 -- (-1329.999) (-1322.053) [-1319.995] (-1320.910) * (-1323.691) [-1320.165] (-1337.529) (-1320.566) -- 0:01:39
Average standard deviation of split frequencies: 0.326357

2000 -- (-1316.079) (-1320.656) (-1314.547) [-1311.446] * [-1313.304] (-1314.080) (-1323.546) (-1326.361) -- 0:01:38
Average standard deviation of split frequencies: 0.217571

3000 -- (-1313.106) (-1309.871) [-1307.137] (-1323.424) * [-1310.545] (-1311.671) (-1319.482) (-1310.548) -- 0:01:37
Average standard deviation of split frequencies: 0.078567

4000 -- (-1310.395) (-1317.380) [-1311.038] (-1323.262) * (-1310.846) (-1326.971) (-1320.249) [-1307.642] -- 0:01:36
Average standard deviation of split frequencies: 0.117851

5000 -- (-1309.369) [-1307.007] (-1324.558) (-1322.025) * (-1310.022) (-1336.596) (-1309.113) [-1310.520] -- 0:01:35
Average standard deviation of split frequencies: 0.141421
    
```

4.- Seleccione los valores de los intervalos de credibilidad que contienen los árboles (e.g. 95% contiene 3 árboles).

```

C:\Documents and Settings\usuario\Escritorio\documentos\Procesos Evolutivos\2. Práctico_II\Demostración MrBayes\mrbayes-3.1.2\mrbayes.exe
13 -- .****.* 139 0.688119 0.091014 0.008349 0.000035 1.102 2
14 -- .*.***. 41 0.202770 0.063010 0.003203 0.000006 1.048 2
15 -- *.***.* 17 0.004150 0.035005 0.001643 0.000001 1.131 2

Clade credibility values:

----- Batacamensis (1)
|
|----- Batacamensis2 (6)
|
|----- Bspinulosus (2)
|
|----- Bpapillosus (8)
|
|----- Bspinulosus2 (5)
|
|----- Barenarum (4)
|
|----- Bchilensis (3)
|
|----- Bchilensis2 (7)

Phylogram:

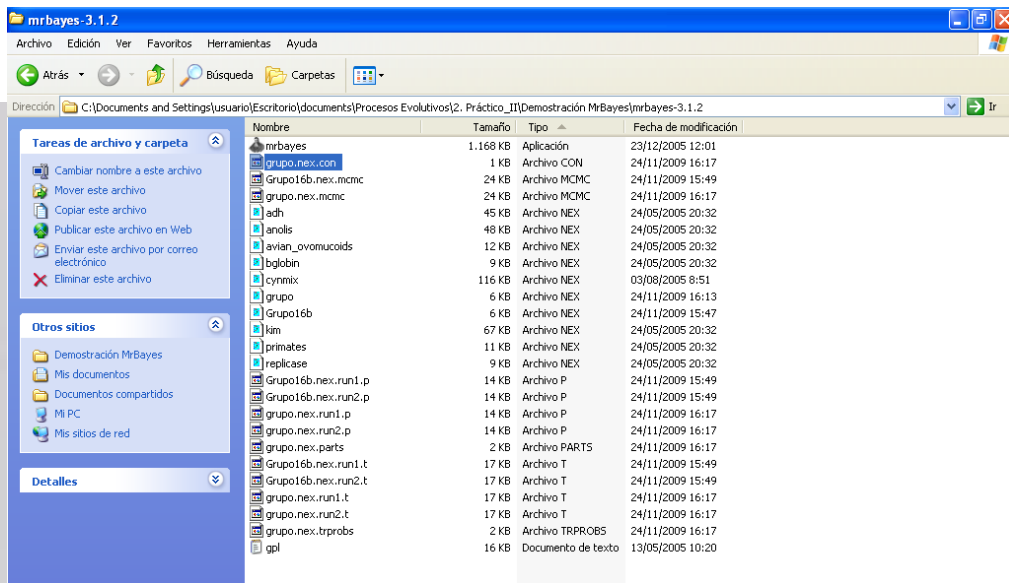
----- Batacamensis (1)
|
|----- Batacamensis2 (6)
|
|----- Bspinulosus (2)
|
|----- Bpapillosus (8)
|
|----- Bspinulosus2 (5)
|
|----- Barenarum (4)
|
|----- Bchilensis (3)
|
|----- Bchilensis2 (7)

!-----! 0.020 expected changes per site

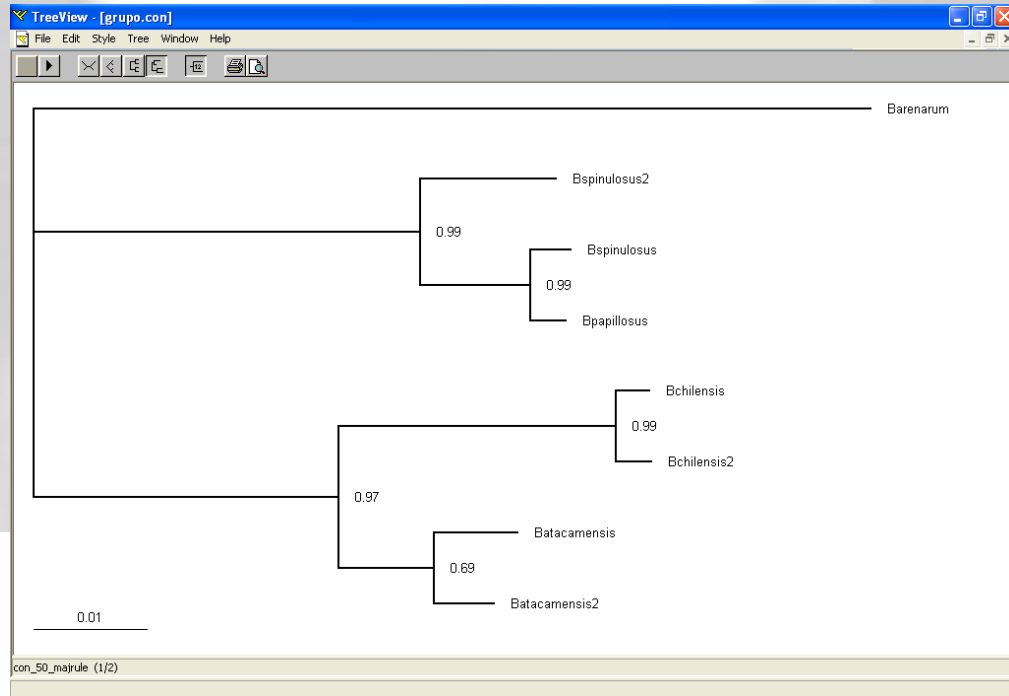
Calculating tree probabilities...

Credible sets of trees (10 trees sampled):
90 % credible set contains 3 trees
95 % credible set contains 3 trees
99 % credible set contains 8 trees
Exiting MrBayes block
Reached end of file
MrBayes >
    
```

5.- Ir a la carpeta de MrBayes y seleccionar el archivo **CON**



6.- Visualizar el árbol de consenso del 50% de la regla de la mayoría desplegado en Treeview donde se observan las probabilidades condicionales *a posteriori*. En Treeview recuerde ir al menú Tree y proceda a definir y enraizar el filograma obtenido con el outgroup seleccionado (*Barenarum*).



**Agradecimientos**

Expresamos nuestros agradecimientos a todos los estudiantes del curso de Procesos Evolutivos que desde el año 2009 han sometido a prueba esta guía y nos han proporcionado sus valiosos comentarios para seguir mejorándola.



*-Última actualización diciembre 2014-*