

ANEXO 2

TUTORIAL PARA USO DEL PROGRAMA MEGA

Para construir y visualizar los árboles obtenidos a través de los análisis de Máxima Verosimilitud y Neighbor Joining se usará el software MEGA el cual se puede descargar de la siguiente página web: <https://www.megasoftware.net/>

Alineamiento de secuencias

1- En este caso trabajaremos con las secuencias descargadas del GenBank sin utilizar una planilla. Abrimos el programa MEGA:

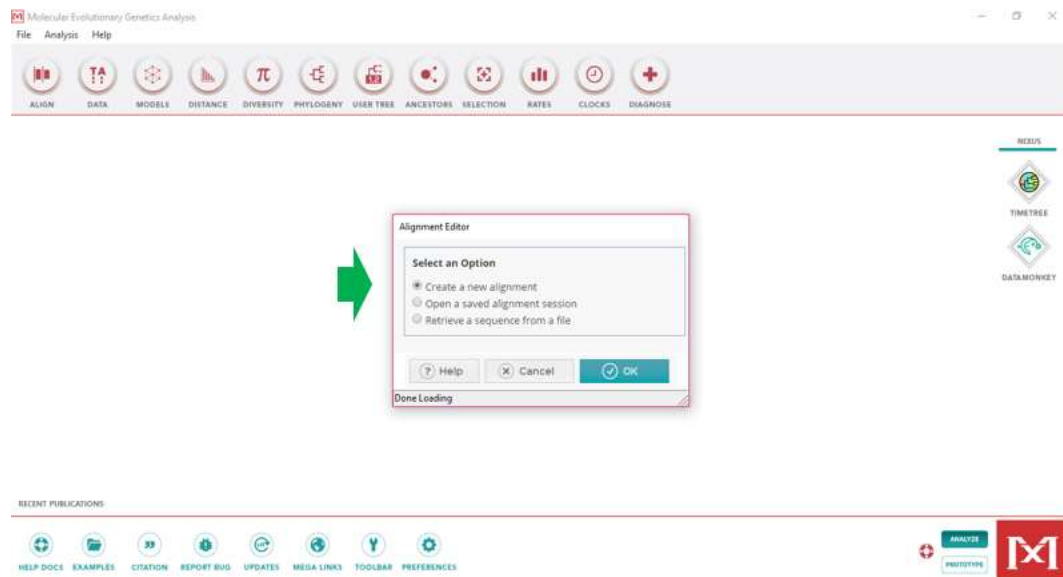
a. Hacer clic en el botón de acceso rápido ALIGN ubicado en el margen superior izquierdo.



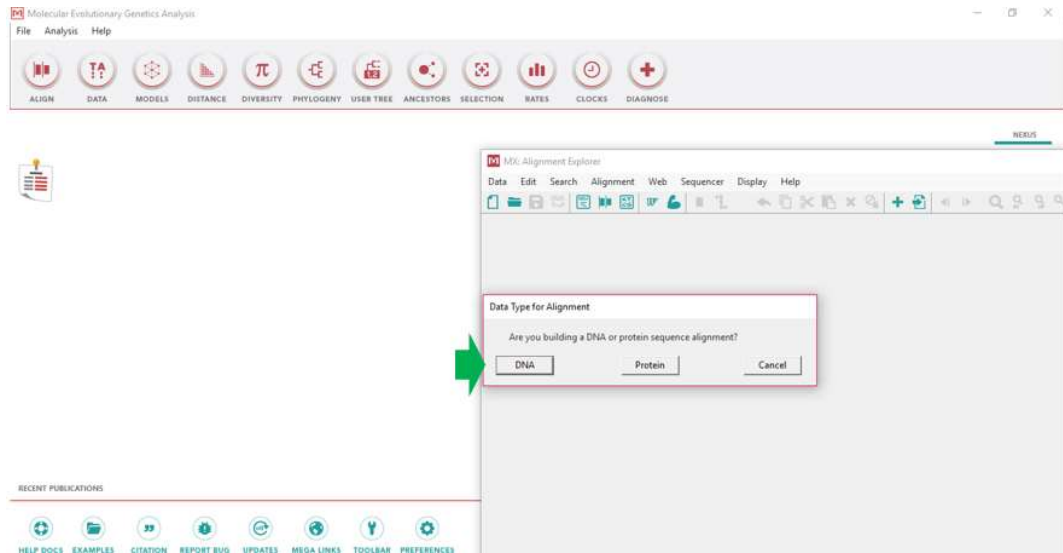
b. Dentro de las opciones en la ventana desplegable hacemos clic en Edit/Build Alignment.



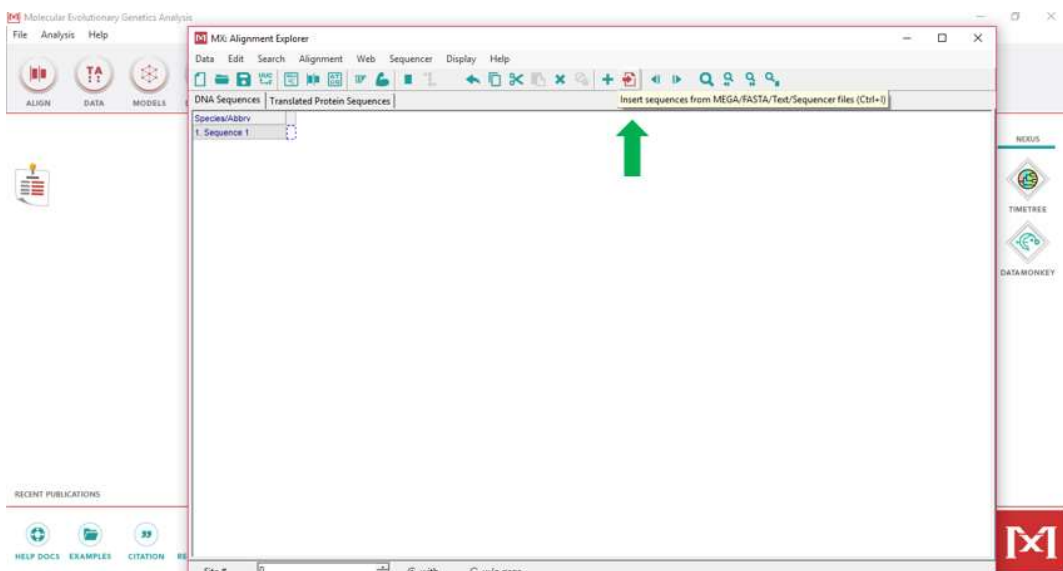
- c. Se abrirá el editor de alineamientos en el cual marcaremos la opción create a new alignment y luego presionaremos el botón OK



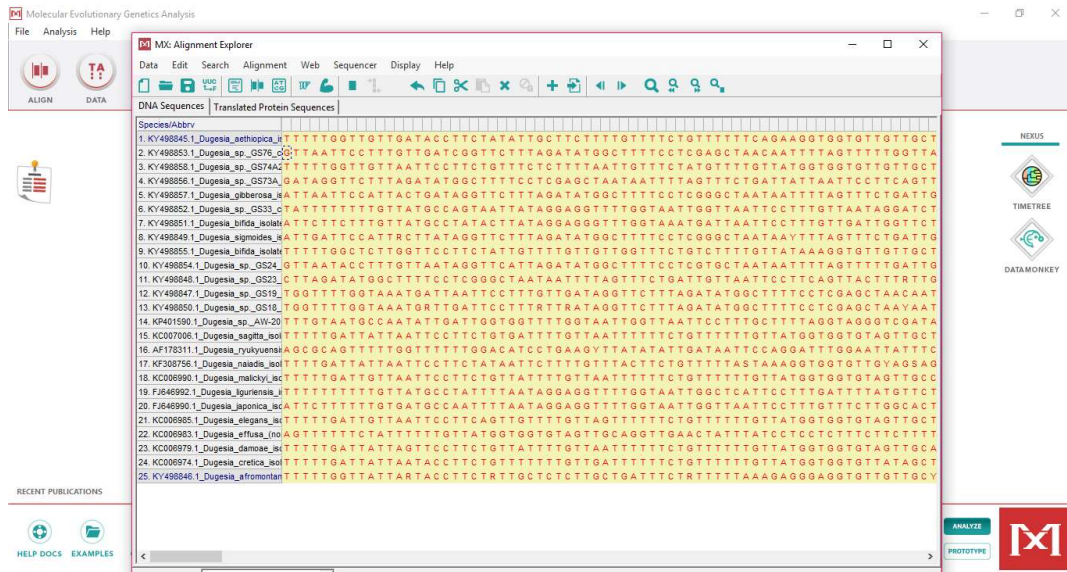
- d. Se abrirá el Explorador de alineamientos en el cual debemos indicar el tipo de secuencias que deseamos analizar, en este caso realizamos clic sobre el botón DNA.



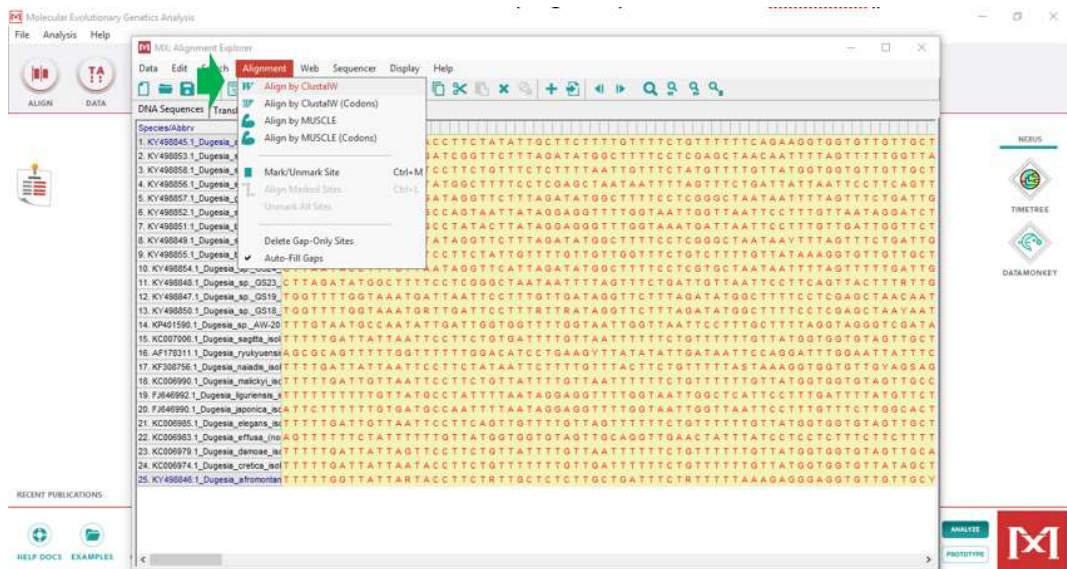
- e. Para cargar las secuencias de interés presionamos en el botón de acceso rápido Insert Sequences from MEGA/FASTA/Text/Sequencer Files.



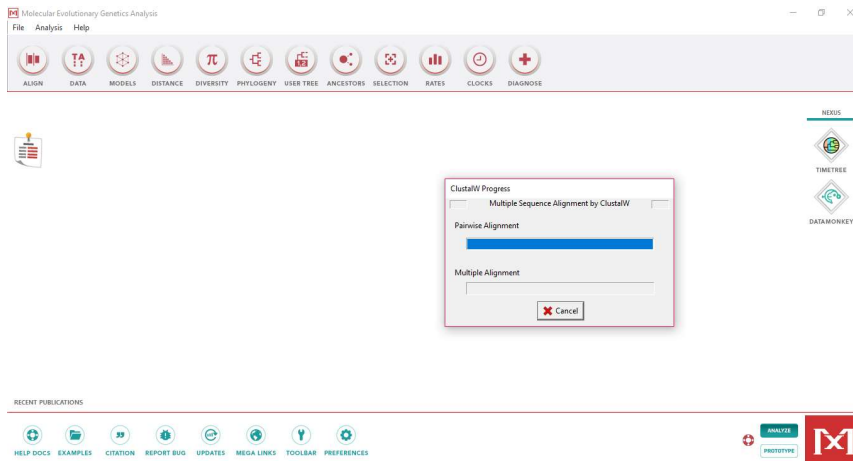
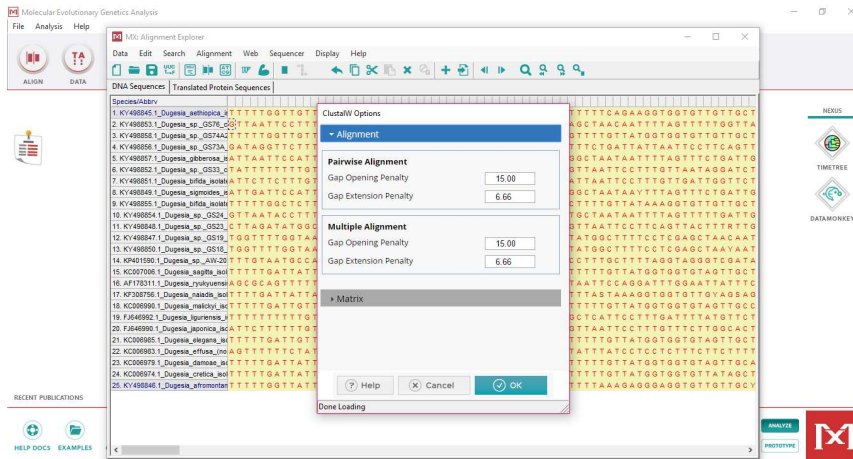
- f. Seleccionamos las secuencias que deseamos alinear (todas las de la lista) y presionamos el botón Abrir



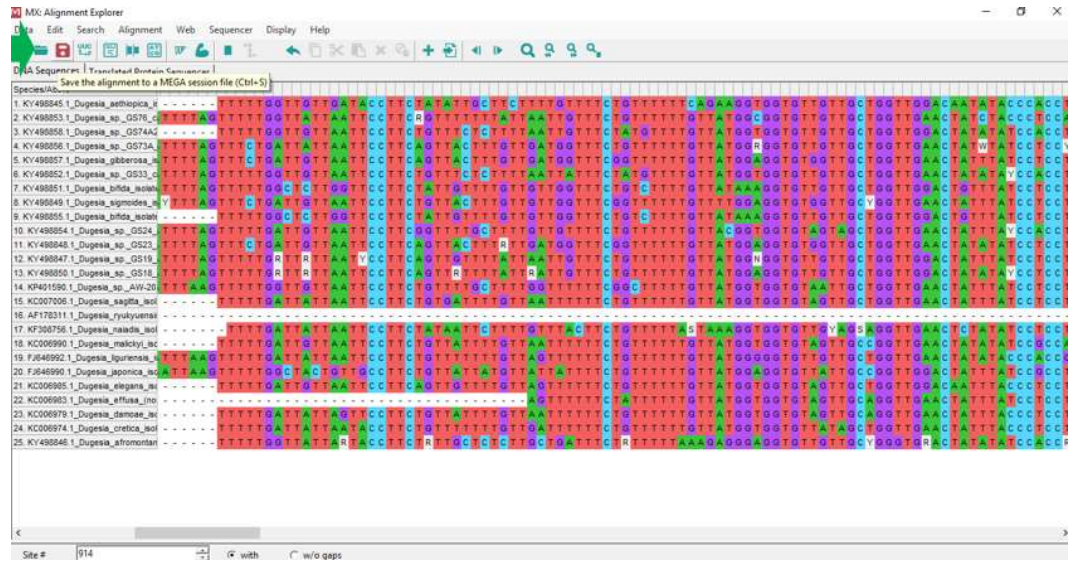
- h. Una vez seleccionadas presionamos sobre el botón Alignment y seleccionamos el método de alineamiento. En la ventana desplegable presionamos ClustaW



- i. Se abrirá una pestaña en la cual podremos asignar diferentes penalidades a los gap de apertura y de extensión, en este caso presionamos OK y dejamos los valores por default



- j. Una vez obtenido el alineamiento procedemos a guardarlo presionando el botón DATA > EXPORT ALIGNMENT > MEGA FORMAT
- k. Luego de nombrar el archivo, se abrirá una pestaña en donde debemos indicar si los datos provienen de secuencias codificantes o no. Luego de seleccionar lo que corresponda, presionar OK.



Análisis de Máxima Verosimilitud

- 1- Abrir el programa MEGA-X.
- 2- En los iconos de acceso rápido hacer click sobre “PHYLOGENY”. Se abre un desplegable y hay que seleccionar: “Construct/Test Maximum Likelihood tree”. Se abrirá el buscador de archivos. Seleccionar y abrir la matriz previamente alineada y guardada.
- 3- Se abrirá una pestaña nombrada “Input Data Options” y le damos OK.
- 4- En caso de aparecer la pestaña “¿Protein-coding nucleotide secuencia data?”, seleccionar yes.
- 5- En la siguiente ventana “(MX: Select Genetic code)” buscar y seleccionar el código correspondiente. Por ejemplo, para secuencias provenientes de mitocondrias de planarias se debería seleccionar: “Flatworm Mitochondrial”.
- 6- Se abrirá una ventana para setear preferencias del análisis. En este caso como está indicado en el enunciado hay que modificar:
 - a) Test of Phylogeny: Bootstrap method
 - b) No. Of Bootstrap Replications (100)
 - c) Model/Method: General Time Reversible model
 - d) Rates among Sites: Gamma Distributed (G)
- 7- El resto se deja por default y presionar OK con lo cual comenzará a correr el análisis.
- 8- Cuando finalice se abrirá el “Tree Explorer”. En los botones de acceso ubicados en el lado izquierdo de la ventana buscar el icono “Root the tree on the selected

Branch” y presionar. Ir a la rama que tiene como taxa terminal el outgroup y presionarla.

- 9- Para guardar el árbol como imagen en las pestañas del margen superior ir a “Image” y seleccionar “Save as Tiff File”. Seleccionar en el explorador la carpeta en donde se quiere guardar el archivo, nombrarlo presionar Guardar y luego OK.

Análisis de Neighbor Joining

- 1- Abrir el programa MEGA-X.
- 2- En los iconos de acceso rápido hacer click sobre “PHYLOGENY”. Se abre un desplegable y hay que seleccionar: “Construct/Test Neighbor Joining tree”. Se abrirá el buscador de archivos. Seleccionar y abrir la matriz previamente alineada y guardada.
- 3- Se abrirá una pestaña nombrada “Input Data Options” y le damos OK.
- 4- En caso de aparecer la pestaña “¿Protein-coding nucleotide sequence data?”, seleccionar yes.
- 5- En la siguiente ventana “(MX: Select Genetic code)” buscar y seleccionar el código correspondiente. Por ejemplo, para secuencias de origen vegetal plastídico se debería seleccionar: “Plant Plastid”.
- 6- Se abrirá una ventana para setear preferencias del análisis. En este caso como está indicado en el enunciado hay que modificar:
 - a)Test of Phylogeny: Bootstrap method
 - b)No. Of Bootstrap Replications (500)
 - c)Model/Method: Maximum Composite Likelihood
 - d)Rates among Sites: Gamma Distributed (G)
- 7- El resto se deja por default y presionar OK con lo cual comenzará a correr el análisis.
- 8- Cuando finalice se abrirá el “Tree Explorer”. En los botones de acceso ubicados en el lado izquierdo de la ventana buscar el icono “Root the tree on the selected Branch” y presionar. Ir a la rama que tiene como taxa terminal el outgroup y presionarla.
- 9- Para guardar el árbol como imagen en las pestañas del margen superior ir a “Image” y seleccionar “Save as Tiff File”. Seleccionar en el explorador la carpeta en donde se quiere guardar el archivo, nombrarlo presionar Guardar y luego OK.