



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Secuenciación parcial del genoma mitocondrial del cluster buzzatii de Drosophila.

Secuenciación parcial do xenoma mitocondrial do cluster buzzatii de Drosophila.

Partial sequencing of the mitochondrial genoma of the buzzatii cluster of Drosophila.

Manuel González Veiga

Curso 2019-2020. Junio, 2020

Directores Académicos:

Horacio Naveira Fachal, Antón Vila Sanjurjo

ÍNDICE

RESUMEN	1
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. Introducción.....	3
2. Objetivos	6
3. Material y métodos	7
3.1. Extracción de ADN	7
3.2. Amplificación por PCR	7
3.2.1. Amplificación del fragmento 1	10
3.2.2. Amplificación del fragmento 2	10
3.3. Secuenciación y análisis bioinformático	11
4. Resultados	14
4.1. Optimización de las condiciones de PCR.....	14
4.2. Análisis comparativo de las secuencias obtenidas.....	15
5. Discusión	18
5.1. Optimización de las condiciones de PCR.....	18
5.2. Análisis comparativo de las secuencias obtenidas.....	18
6. Conclusiones	21
Bibliografía.....	22

RESUMEN

En una tesis doctoral desarrollada por Luís Rodríguez López (2015) se cruzaron recíprocamente dos cepas diferentes de *Drosophila buzzatii*. La distribución sexual de la descendencia muestra evidencia de inviabilidad parcial de los machos en uno de los dos sentidos de cruzamiento, debido posiblemente a un efecto materno asociado a la transmisión de una variante mitocondrial. En el presente proyecto se amplificó, secuenció y analizó una región determinada de genoma mitocondrial procedente de cada linaje. Contiene parte de los genes ND4 y CYTB, los genes completos ND4L y ND6, y las secuencias tRNA-thr y tRNA-pro. Se pretendía con su análisis la aproximación al origen de las diferencias del genoma mitocondrial causantes de esa inviabilidad, ya sea descartando o hallando distancias nucleotídicas en el fragmento escogido. La región de estudio también se comparó entre las especies del cluster *Drosophila buzzatii*. Se obtuvo así evidencia definitiva de que el genoma mitocondrial de una de las cepas utilizadas en la tesis doctoral anteriormente mencionada se corresponde con el de la especie *D. koepferae*. Revisando bibliográficamente su procedencia se sabe que en el origen de dicha cepa hay un cruzamiento de hembras de la especie *D. koepferae* con machos de la especie *D. buzzatii*. Se concluye entonces que las diferencias que se buscaban no obedecen a un polimorfismo nucleotídico de *D. buzzatii*, sino a que en uno de los linajes se heredó por vía materna el genoma mitocondrial de *D. koepferae*.

Palabras clave: Herencia materna, *koepferae*, cluster, PCR, secuenciación.

RESUMO

Nunha tese doutoral desenvolvida por Luís Rodríguez López (2015) cruzáronse recíprocamente dúas cepas diferentes de *Drosophila buzzatii*. A distribución sexual da descendencia mostra evidencias de inviabilidade parcial dos machos nun dos dous sentidos de cruzamento, debido posiblemente a efecto materno asociado á transmisión dunha variante mitocondrial. No presente proxecto se amplificou, secuenciou e analizou unha rexión determinada de xenoma mitocondrial procedente de cada linaxe. Contén parte dos xenes ND4 e CYTB, os xenes completos ND4L e ND6, e as secuencias de ARNt-thr e ARNt pro. Preténdese coa súa análise a aproximación á orixe das diferenzas do xenoma mitocondrial causantes desta inviabilidade, xa sexa descartando ou atopando

diferencias nucleotídicas no fragmento escollido. A rexión de estudo tamén comparou entre as especies do clúster *Drosophila buzzatii*. Obtívose así evidencia definitiva de que o xenoma mitocondrial dunha das cepas utilizadas na tese doutoral anteriormente mencionada se corresponde co da especie *D. koepferae*. Revisando bibliográficamente a súa procedencia se sabe que na orixe de dita cepa hai un cruzamento de hembras da especie *D. koepferae* con machos da especie *D. buzzatii*. Conclúese entón que as diferenzas que se buscan non obedecen a un polimorfismo nucleotídico de *D. buzzatii*, senón a que nunha das liñas herdouse por vía materna o xenoma mitocondrial de *D. koepferae*.

Palabras clave: Herencia materna, *koepferae*, cluster, PCR, secuenciación.

ABSTRACT

In a doctoral thesis written by Luis Rodriguez Lopez (2015), were reciprocally crossed two different *Drosophila buzzatii* strains. The sexual distribution of the offspring shows evidence of partial infeasibility of the males in one of the two crossing directions, possibly due to a maternal effect associated with the transmission of a mitochondrial variant. In the present project, a specific region of mitochondrial genome from each lineage has been amplified, sequenced and analyzed. It contains part of the ND4 and CYTB genes, the complete sequence of ND4L and ND6 genes, and the tRNA-thr and tRNA-pro sequences. Analysis intends to approximate the origin of the differences in the mitochondrial genome that caused this infeasibility, either by ruling out or finding nucleotide differences in the chosen fragment. The study region was also compared between the species in the *Drosophila buzzatii* cluster. Thus, it was obtained that mitochondrial genome of one of the strains used in the aforementioned doctoral thesis corresponds to that of the species *D. koepferae*. Bibliographically reviewing its provenance, it is known that at the origin of this strain there is a crossbreeding of females of the species *D. koepferae* with males of the species *D. buzzatii*. It was then concluded that differences were sought were not due to a *D. Buzzatii's* nucleotide polymorphism, but rather that the mitochondrial genome of *D. koepferae* was inherited maternally in one of the lineages.

Keywords: Maternal inheritance, *koepferae*, cluster, PCR, sequencing.

1. Introducción

Al contrario de lo que ocurre con la herencia mendeliana, en la mayoría de metazoos el genoma mitocondrial es transmitido a las generaciones filiales a través de la línea materna (Chen, Zhang & Xu, 2019). Aunque esto no rechaza la posibilidad de que pueda producirse una transmisión mitocondrial por vía paterna (Wolff, Nafisinia, Sutovsky & Ballard, 2013; Luo et al, 2018), en la mayoría de cruzamientos se da una herencia materna estricta (SMI, con las siglas en inglés) (Connallon, Camus, Morrow & Dowling, 2018).

El tamaño del genoma mitocondrial es menor que el del genoma nuclear. En humanos el genoma mitocondrial codifica para 13 proteínas en comparación con los 30.000 genes nucleares que codifican cada uno para 3 proteínas en promedio (NCBI & U.S.NLM, s.f; NIH, s.f). Esto no quita importancia a las funciones que desempeña el ADN mitocondrial. Las proteínas para las que codifica ejercen un papel clave en el funcionamiento de las mitocondrias, imprescindibles en la respiración aerobia en eucariotas. No obstante, también se ha visto que el genoma nuclear ejerce un papel importante en el funcionamiento y mantenimiento de estos orgánulos. Se puede dar una interacción entre los transcritos procedentes de ambos genomas. Un ejemplo es la fosforilación oxidativa (o sistema OXPHOS) de la membrana externa mitocondrial. En este sistema hay complejos proteicos de origen tanto nuclear como mitocondrial que actúan conjuntamente, y además, proteínas de origen nuclear pueden actuar como activadoras de genes mitocondriales (Mai, Chrzanowska-Lightowlers & Lightowlers, 2017; García, 2013; Pon, Vestweber, yang & Schatz, 1989).

El presente trabajo tiene como punto de partida una tesis doctoral desarrollada por Rodríguez (2015). En esta tesis se cruzaron recíprocamente dos cepas diferentes de *Drosophila buzzatii* Patterson y Wheeler, una especie del subgrupo mulleri de *Drosophila* (Rodríguez-Trelles, Alarcón & Fontdevila, 2000), denominadas SL6 y SL101w, como control para realizar una serie de introgresiones. Al cruzar hembras SL101w con machos SL6 se producen aproximadamente la mitad de machos que de hembras. Sin embargo, no ocurre lo mismo al cruzar machos SL101w con hembras SL6 (**Tabla 1**). En las conclusiones de la tesis se recomienda la secuenciación del genoma mitocondrial de ambas cepas. Se pretende así buscar diferencias entre ambas

cepas para comprobar si el origen de dicha inviabilidad relativa de los machos se debe a una interacción entre el genoma nuclear (procedente de ambos padres) y el genoma mitocondrial (aportado tan sólo por la madre).

	macho	hembra	g	Significación
SL6 x SL6	252	264		ns
SL101w x SL101w	202	211		ns
♀ SL101w x ♂ SL6	65	119	0,35***	s
♀ SL6 x ♂ SL101w	201	233		ns

Tabla 1: Cruzamientos de las cepas SL101w y SL6. $g = n^{\circ}$ machos / total. Extraídos de la tesis doctoral de Rodríguez, L. (2015). ns: No significativo. s: Significativo. *** = $P < 0,001$

En concreto, este trabajo se encarga del estudio de dos regiones que no fueron amplificadas correctamente en anteriores Reacciones en Cadena de la Polimerasa, o PCRs (ver en apartado 3.2. Amplificación por PCR), lo cual es necesario antes de su secuenciación.

Es importante explicar el origen de la cepa SL101w antes mencionada. Tiene fijada una mutación *white* recesiva, la cual tiene su origen en una serie de cruzamientos hechos por Horacio Naveira en 1986 (Rodríguez, 2015). En ellos se intentaba introgresar una región del cromosoma X de *D. koepferae* Fontdevila y Wasserman sobre un fondo genético de *D. buzzatii* (**Figura 1**). Es importante resaltar que, debido a motivos mecánicos (la morfología del órgano copulador masculino o aedeagus de *D. koepferae* es incompatible en la cópula con hembras de la especie *D. buzzatii*), en el origen de esta cepa hay un cruzamiento entre hembras *D. koepferae* con machos *D. buzzatii* (Carvajal, Gandarela & Naveira, 1996).

Por último, cabe destacar la sistemática de la especie a analizar. Esta especie pertenece al cluster *D. buzzatii*, formado por 7 especies cactofílicas endémicas de América del Sur: *D. buzzatii*, *D. koepferae*, *D. gouveai* Tidon-Sklorz y Sene, *D. borborema* Vilela y Sene, *D. serido* Vilela y Sene, *D. seriema*

Tidon-Sklorz y Sene y *D. antonietae* Tidon-Sklorz y Sene. Dos estudios basados en el análisis del genoma mitocondrial de las especies de este cluster (Moreyra et al, 2019; Manfrin, De Brito y Sene, 2001) lo dividen en dos grupos: Uno formado por las especies *D. buzzatii* y *D. koepferae*, y otro formado por el resto de taxones. En el presente trabajo también se va a analizar el primer grupo mencionado.

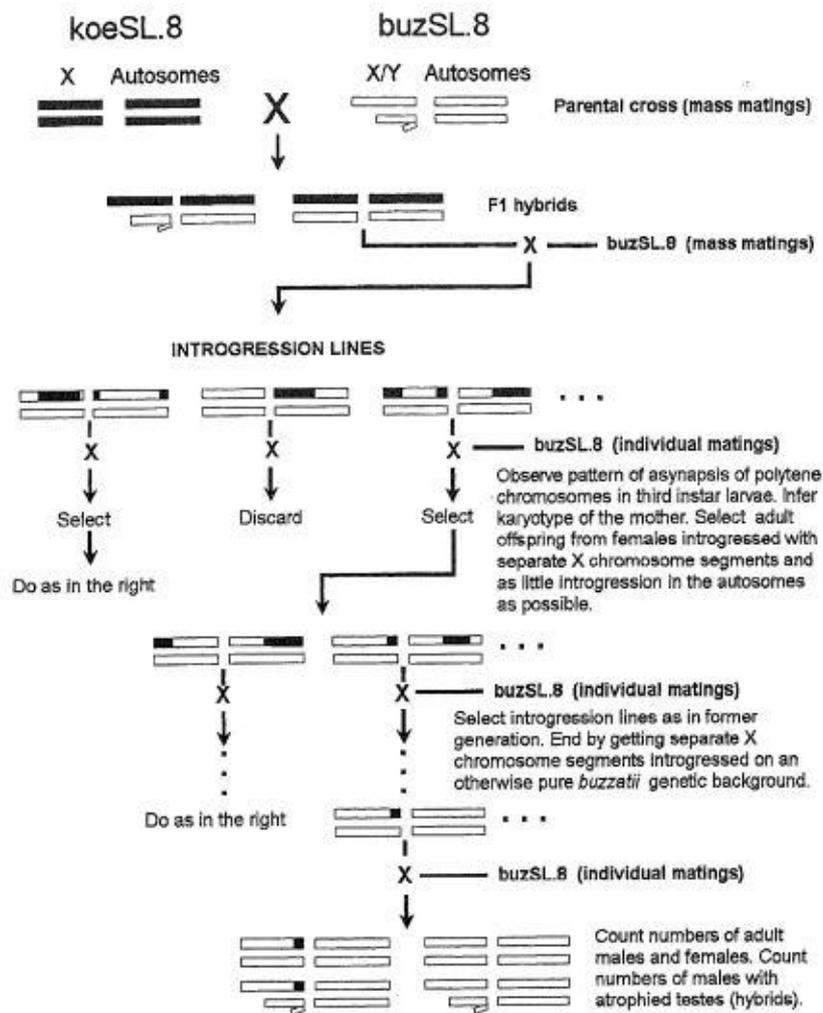


Figura 1: Esquemización de las introgresiones de una región del cromosoma X en *D. buzzatii*. Figura obtenida de Carvajal, A. R., Gandarela, M. R., & Naveira, H. F. (1996).

2. Objetivos

La finalidad de este proyecto es ayudar en la amplificación, secuenciación, análisis y comparación del ADN mitocondrial de 2 cepas diferentes de *D. buzzatii*. Concretamente abarca los siguientes puntos:

1. Encontrar las condiciones óptimas para amplificar mediante PCR dos regiones determinadas del genoma mitocondrial de *D. buzzatii*, empleando cebadores previamente diseñados.
2. Comparar las secuencias obtenidas con las del genoma publicado de *D. buzzatii*.
3. Comparación entre las secuencias de las dos cepas de *D. buzzatii*.
4. Analizar las características y la evolución de cada gen en las regiones secuenciadas.

3. Material y métodos

3.1. Extracción de ADN

Se aisló ADN de las 2 cepas de *D. buzzatii* mencionadas anteriormente (las cepas SL6 y SL101w, a las que para abreviar se les asignó la letra B y W, respectivamente). Se utilizó un kit de extracción *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (NZYTech), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Como material de partida se utilizaron 2 ejemplares por cada cepa. Posteriormente se visualizó la concentración y calidad del ADN extraído mediante un Nanodrop 1000 (Thermo scientific). Se obtuvieron dos concentraciones diferentes por cepa: 17,5 ng/μL y 27,5 ng/μL para *D. buzzatii* W, y 16,3 ng/μL y 15 ng/μL para *D. buzzatii* B.

3.2. Amplificación por PCR

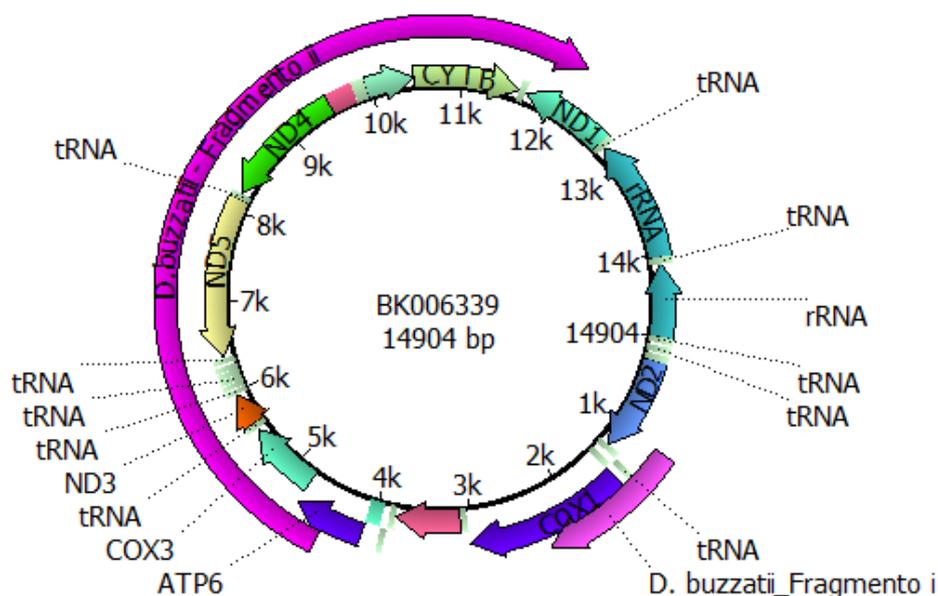


Figura 2: Mapa circular del genoma mitocondrial de *D. mojavensis* utilizado en el diseño de primers. Flechas de color malva: Regiones alineadas entre el genoma mitocondrial de *D. buzzatii* y el genoma mitocondrial de *D. mojavensis*. El resto de flechas representan los componentes del genoma. Región i: Comprendida entre las posiciones 1.040 y 2.321. Región ii: Comprendida entre las posiciones 4.436 y 12.131. Hay una parte sin secuenciar de aproximadamente 8 kb (entre la posición 12.131 y la posición 1.040, contando la región control del cromosoma mitocondrial, la cual falta en el genoma de *D. mojavensis*), y otra de aproximadamente 2 kb (entre la posición 2.321 y la 4.436).

En primer lugar, se amplificaron las muestras para ser posteriormente secuenciadas. Para ello el equipo diseñó previamente unos cebadores complementarios a una cadena de ADN mitocondrial de *D. buzzatii* ensamblada a partir de *scaffolds* del proyecto genoma de esta especie (<https://dbuz.uab.cat/>). Se diseñaron a partir de unos *primers* ya publicados de *D. melanogaster* (<http://billb.babs.unsw.edu.au/mtDNAprimers.htm>).

Posteriormente se alineó el genoma mitocondrial de *D. melanogaster* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_024511.2) con el de *D. mojavensis* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BK006339.1>), y se escogieron los cebadores alineados. El mismo procedimiento se realizó entre el genoma mitocondrial de *D. mojavensis* y el de *D. buzzatii*. En la cadena de *D. buzzatii* utilizada en el diseño de cebadores faltaban dos grandes fragmentos de su secuencia (**Figura 2**). Se ha de añadir que los cebadores se diseñaron cuando solo se había conseguido reconstruir el genoma mitocondrial de *D. buzzatii* a partir de *scaffolds* del proyecto genoma de esta especie. Como se comenta más adelante, durante la elaboración de este trabajo fueron publicadas 5 secuencias completas del cluster *D. buzzatii* por Moreyra et al (2019), entre ellas la de *D. buzzatii*. Sin embargo, hasta entonces *D. mojavensis* era la especie más próxima a *D. buzzatii* con un ADN mitocondrial completamente secuenciado. Es por ello que para el diseño de cebadores se utilizase la secuencia del genoma mitocondrial de *D. mojavensis* como guía.

Las secuencias de los *primers* utilizados se muestran en la **Tabla 2**. Los cebadores se emparejaron de la siguiente forma:

- 1F - 1R: Flanquean un fragmento de 1.482 nucleótidos, el cual será llamado fragmento 1.
- 2F - 2R: El producto que flanquean es desconocido. Se calcula que es de aproximadamente 6.000 nucleótidos. En este trabajo se denominará fragmento 2.

Primers	<i>D. buzzatii</i>		<i>D. mojavensis</i>		Secuencia en <i>D. buzzatii</i>	Tm(°C)
	X ₀	X _n	X ₀	X _n		
1F	6.392	6.416	9.065	9.087	CTTGTAACGCT CTGGTTGATACCC	52,5
2F	9.407	9.435	11.962	11.982	CCTCCTCTTCTAT ATTCTACATTAACCC	54,5
1R	7.874	7.850	10.592	10.575	CCTAAAAGAGAT CCAAAATTTTCATC	50,5
2R	441	414	1.078	1.061	GAAATGCATACA TATAATTAATTAATTG	46,8

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. En la nomenclatura de los primers, los números 1 y 2 corresponden a los nombres de las parejas de cebadores que se han asignado en este trabajo. Las letras F y R corresponden a los cebadores Forward y Reverse, respectivamente. X₀: Primera posición del cebador. X_n: Última posición del cebador. Tm: Temperatura de Melting.

Para todas las PCRs se fijó un volumen total de 15 µL por muestra, y se añadió 0,75 µL de cada cebador a 10 mM y 7,5 µL de un preparado comercial *NZYTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl₂* (NZYTech), el cual contiene una ADN polimerasa *Taq* modificada. Las concentraciones finales de MgCl₂ y los volúmenes añadidos de ADN variaron según las condiciones de PCR requeridas. El volumen restante por cada muestra se rellenó con H₂O milli-Q de tipo I. La preparación de cada tubo control se realizó sustituyendo el ADN molde por H₂O milli-Q de tipo I.

En todas las reacciones se utilizó un termociclador *My Cycler* de BIO-RAD. Se establecieron 30 ciclos de 30 s de desnaturalización a 95 °C, 30 s de anillamiento y una fase de elongación a 72 °C. También se estableció una desnaturalización inicial durante 5 min a 95 °C y una elongación final durante 5 min a 72 °C. La duración de la etapa de elongación depende del tamaño de los fragmentos a amplificar. La velocidad de elongación de la polimerasa *Taq* utilizada es de 60 s/kb (NZYTech). Por tanto, durante la elongación, para amplificar el fragmento 1 se necesitan 89 segundos por ciclo, los cuales se redondearon a 120 s, y para amplificar el fragmento 2 se necesitan 6 minutos por

ciclo. La temperatura de alineamiento se ajustó según la temperatura de Meltin de los cebadores utilizados.

La posterior visualización de los productos de PCR se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa (NZYTech), utilizando como referencia de tamaños moleculares un marcador *3kb + 1.5kb + 1kb DNA Ladder*.

3.2.1. Amplificación del fragmento 1

Para optimizar las condiciones de la PCR realizada en la cepa mutante se emplearon 4 temperaturas distintas de anillamiento y 3 concentraciones de MgCl₂. El gradiente de temperaturas utilizado fue de 40 °C, 45,5 °C, 51,9 °C y 55 °C, mientras que el de concentraciones fue de 0 mM 0,1 mM y 2,5 mM de MgCl₂. También se añadió 1,26 µL de ADN molde a 27 ng/µL. En total se prepararon 12 tubos, junto con otros 3 controles sometidos a 45,5 °C durante el anillamiento. Para la preparación de los controles se aplicó el mismo gradiente de concentraciones utilizado en los tubos problema.

En la cepa B se utilizaron las condiciones que resultaron óptimas en la anterior amplificación. Se preparó un total de 3 muestras: un control sin ADN, una muestra con 2 µL de ADN a 16,3 ng/µL y otra muestra con 2 µL de ADN a 15 ng/µL. La temperatura de anillamiento fue de 51,1 °C, y la duración de la etapa de elongación fue de 120 s. La amplificación de esta cepa se realizó 2 veces. El motivo de su repetición fue la ausencia de resultados en la primera PCR. No obstante, ambas PCRs se realizaron bajo las mismas condiciones.

3.2.2. Amplificación del fragmento 2

Se realizó en la cepa W y debido a la ausencia de material genético amplificado se procedió a una segunda reacción. En la primera PCR se utilizaron 3 concentraciones distintas de MgCl₂, las cuales fueron de 1,5 mM, 2,5 mM y 3,5 mM. También se añadieron 1,26 µL de ADN a 27 ng/µL por muestra. Se estableció una temperatura de anillamiento de 51,9 °C. En la segunda reacción, las muestras fueron sometidas al mismo gradiente de concentraciones de MgCl₂ y se añadió la misma cantidad de ADN molde. A diferencia de la PCR anterior, las muestras se sometieron a un gradiente de 4 temperaturas diferentes en la

fase de anillamiento. Estas temperaturas fueron de 42 °C, 43,4 °C, 46,8 °C y 50 °C.

No se realizó una PCR en la cepa B debido a la ausencia de resultados de las reacciones anteriores.

3.3. Secuenciación y análisis bioinformático

Se realizó una secuenciación Sanger en los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI), de la Universidade da Coruña. Se secuenció el producto flanqueado por la pareja 1F-1R de cebadores con un analizador genético 3130xl de *Applied Biosystems*.

Las secuencias recibidas se analizaron mediante el paquete UGENE (Okonechnikov, Golosova, Fursov & Ugene Team, 2012). Este incluye funciones tales como el alineamiento múltiple de secuencias y la visualización del genoma mitocondrial, necesarias para el análisis realizado en este proyecto. También se utilizó el paquete MEGA X v10.1.8 (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018) para la elaboración de un árbol filogenético y la realización de pruebas estadísticas que ayuden a analizar las fuerzas selectivas entre las distintas especies.

El algoritmo utilizado para proceder con el primer alineamiento fue Clustal Omega (Sievers et al, 2011). Posteriormente a la secuenciación del fragmento 1, el equipo de Moreyra et al (2019) publicó la secuencia completa del genoma mitocondrial de *Drosophila buzzatii*, excepto su región control (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN551232.1>). Se incorporó esta nueva cadena a los alineamientos realizados en este proyecto. Dicha secuencia se utilizó como guía para comparar los fragmentos. La secuencia del genoma mitocondrial de *D. buzzatii* con la que se diseñaron los cebadores, ensamblada a partir de los scaffolds del proyecto genoma de *D. buzzatii*, fue descartada debido a las dos regiones que se perdieron, ya que reducían su fiabilidad. Las discrepancias se visualizaron en un editor de texto y fueron analizadas. Se tuvo en cuenta el número de discrepancias individuales y compartidas por el resto de secuencias. También se tuvieron en cuenta las regiones iniciales y terminales de las cadenas a analizar, ya que en esas zonas la calidad de la secuenciación es

menor. Las secuencias fueron ensambladas para obtener una única cadena por cepa y se alinearon por segunda vez. Para su ensamblaje se descartaron las zonas de menor calidad, reduciendo el tamaño por los extremos de las cuatro cadenas, teniendo así una longitud de 1.348 nucleótidos. A este nuevo alineamiento se incorporaron el genoma mitocondrial de *D. koepferae* y el genoma mitocondrial de *D. mojavenensis*, además del genoma mitocondrial de *D. buzzatii* utilizado como guía.

Posteriormente, en MEGA X, se procedió a la elaboración de un árbol a partir de este último alinamiento. Se realizó con el método Neighbour Joining, un algoritmo paramétrico basado en el cálculo de distancias, con el objetivo de poder observarlas de manera visual. En él la distancia que hay entre dos secuencias es igual a la suma de las distancias de las ramas del árbol que las separan (Saitou & Nei, 1987). Como no se pretendía obtener el mejor árbol en términos de cladística, no se realizó ninguna réplica, y se utilizó una matriz de distancias Jukes y Cantor para su ejecución. Es decir, se asume que la tasa de cambio es igual para cada nucleótido (Yang, 2006). Una vez obtenido se comprobó que estaba desactivada la casilla “*only topology*” para poder visualizar las distancias a partir de la longitud de las distintas ramas. También se comprobó que estaba enraizado con la secuencia de *D. mojavenensis*, utilizada como grupo externo.

Otra de las aplicaciones del *software* MEGA X en este proyecto fue proceder con los distintos tests sobre sustituciones sinónimas y no sinónimas. El motivo es comprobar la presión selectiva en cada gen de estudio por separado, sirviéndonos de apoyo para desarrollar conclusiones sobre sus tasas de evolución. Para proceder se aisló cada gen por separado y se cambió el orden de aquellos que estuviesen en dirección opuesta a la que viene por defecto en Mega X. Para ello se volvió a utilizar Ugene. Posteriormente se definió el código genético y se estableció la pauta de lectura para la realización de un test estadístico Z basado en codones. Esta prueba permite conocer si hay algún tipo de selección mediante el estudio de sustituciones sinónimas y no sinónimas, denotadas como dS y dN, respectivamente (Goldman & Yang, 1994). Se hizo un test Z para cada una de las siguientes hipótesis alternativas:

- $dN > dS$: Nos encontramos ante una selección positiva, ya que el número de sustituciones no sinónimas por sitio es significativamente mayor al de sustituciones sinónimas por sitio.
- $dN < dS$: Nos encontramos ante una selección purificadora, ya que el número de sustituciones no sinónimas por sitio es significativamente menor al de sustituciones sinónimas por sitio.

En caso de aceptar la hipótesis nula, es decir, que el número de sustituciones por sitio sea igual para el número de sustituciones no sinónimas y sinónimas ($dN = dS$), se hablaría de un pseudogen. Un pseudogen es un gen inactivo que no sufre ningún tipo de selección. Para la realización del test Z se utilizó el método de sustitución Kumar (Kimura2), y se estableció un nivel de significación de $\alpha = 0,05$.

4. Resultados

4.1. Optimización de las condiciones de PCR

Las dos reacciones realizadas en la cepa B en las que se utilizaron los *primers* 2F-2R fueron descartadas debido a la ausencia de amplificación (**Figura 3.a**).

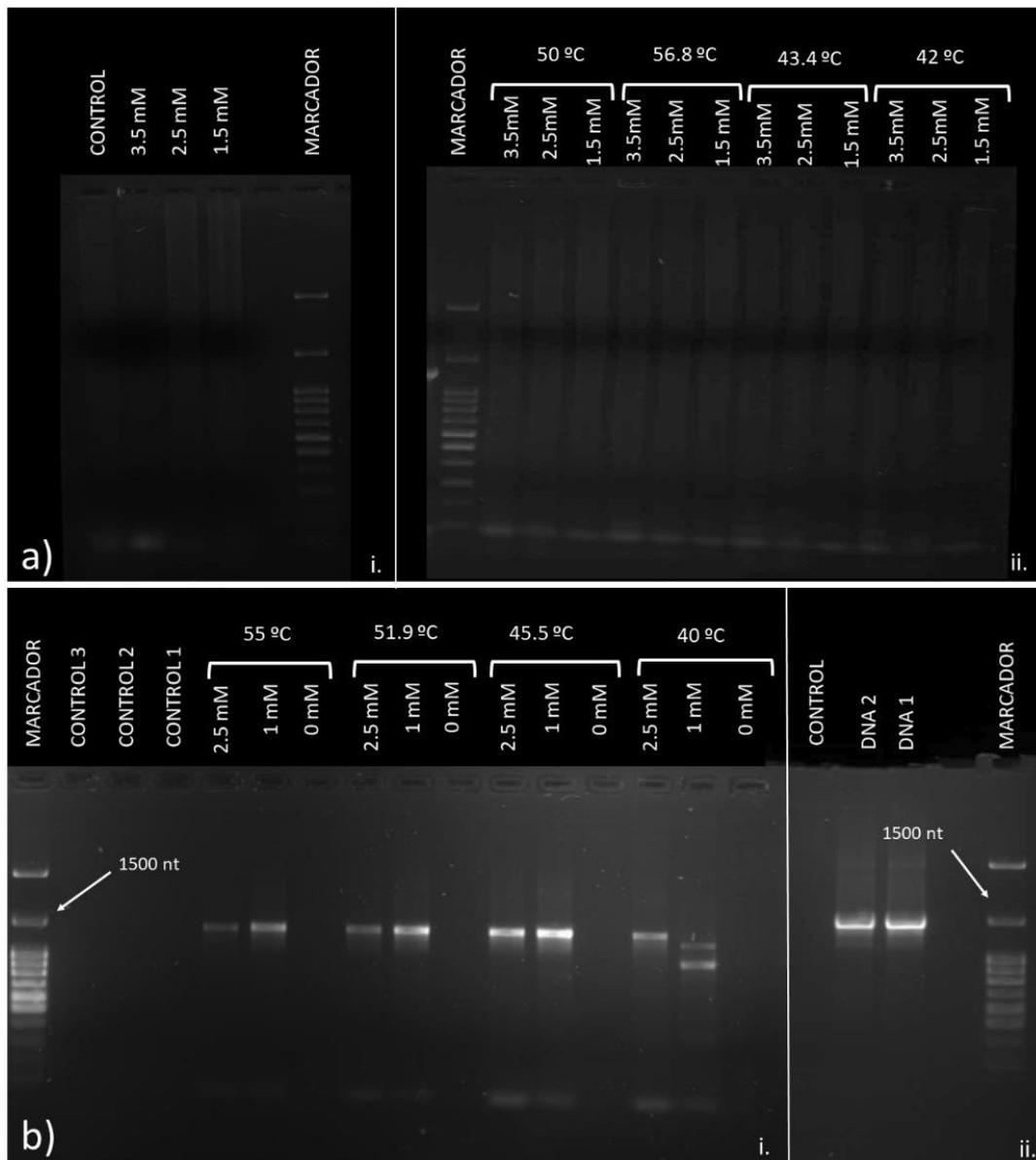


Figura 3: Visualización de los productos de PCR obtenidos: a) No se obtuvo producto de PCR. a.i y a.ii: Se utilizaron los cebadores 2F-2R en la cepa W. b) Se produjo la amplificación esperada de la secuencia objetivo de las cepas W y B. b.i: Fragmento amplificado por los cebadores 1F-1R de la cepa W; b.ii: Fragmento amplificado por los cebadores 1F-1R de la cepa B; DNA 1 y DNA 2*: Con ADN a 2,17 ng/μL y a 2 ng/μL, respectivamente.

En las otras dos PCRs se generaron los resultados esperados (**Figura 3.b**), ambas correspondientes al producto 1. Se generó una banda próxima a la marca de 1.500 nucleótidos. En la cepa W (**Figura 3.b.i**), la mayor calidad del producto se encontró en los carriles correspondientes a los 45,5 °C y 51,9 °C, a una concentración de 1 mM de MgCl₂. La muestra escogida para ser secuenciada fue aquella amplificada a 51,9 °C con 1 mM de MgCl₂. En la segunda PCR realizada en la cepa B las concentraciones finales de ADN molde no influyeron aparentemente en la calidad del producto (**Figura 3.b.ii**). Ambas muestras fueron utilizadas en la secuenciación.

Por lo tanto, solo pudo ser secuenciado el fragmento flanqueado por los cebadores 1F-1R en ambas cepas.

4.2. Análisis comparativo de las secuencias obtenidas

Tras la secuenciación del fragmento 1 se obtuvieron 4 cadenas en total. Dos de ellas secuenciadas a partir del *reverse primer*, una para cada cepa (1B-R y 1W-R), y las otras dos secuenciadas a partir del *forward primer* (1B-F y 1W-F). En el primer alineamiento (**Anexo 1**) las cuatro secuencias están alineadas con el genoma mitocondrial completo de *Drosophila buzzatii* publicado por Moreyra et al (2019) a partir de la posición 9.175 hasta la posición 10.543. Al comparar la cadena guía con el resto se vio que difería con 1B-R en 54 nucleótidos, con 1B-F en 60 nucleótidos, con 1W-R en 51 nucleótidos y con 1W-F en 53 nucleótidos. Sin embargo, al descartar los extremos de cada cadena problema las diferencias con el genoma de *D. buzzatii* se redujeron a 31 en 1B-F y 1W-F, a 30 en 1W-R y a 28 en 1B-R.

	1W	1B	<i>D. koepferae</i>	<i>D. buzzatii</i>	<i>D. mojavensis</i>
1W		0	0	50	144
1B	0		0	50	144
<i>D. koepferae</i>	0	0		50	144
<i>D. buzzatii</i>	50	50	50		145
<i>D. mojavensis</i>	144	144	144	145	

Tabla 3: Distancias entre las cadenas del segundo alineamiento. 1W y 1B: Fragmentos ensamblados de las cepas W y B, respectivamente.

En el segundo alineamiento (**Anexo 2**) no hubo ninguna diferencia entre las secuencias ensambladas del fragmento 1, y tampoco entre estas y el genoma mitocondrial de *D. koepferae*, pero había 50 con respecto a la cadena guía *D. buzzatii* y 145 con respecto al genoma mitocondrial de *D. mojavensis* (**Tabla 3**).

En la reconstrucción filogenética, debido a la ausencia de diferencias entre por las cadenas secuenciadas en el SAI y la cadena publicada de *D. koepferae*, estas forman un clado en el que no hay ramas horizontales. Estas 3 secuencias forman otro clado con *D. buzzatii*, y a su vez otro con *D. mojavensis* (**Figura 4**).

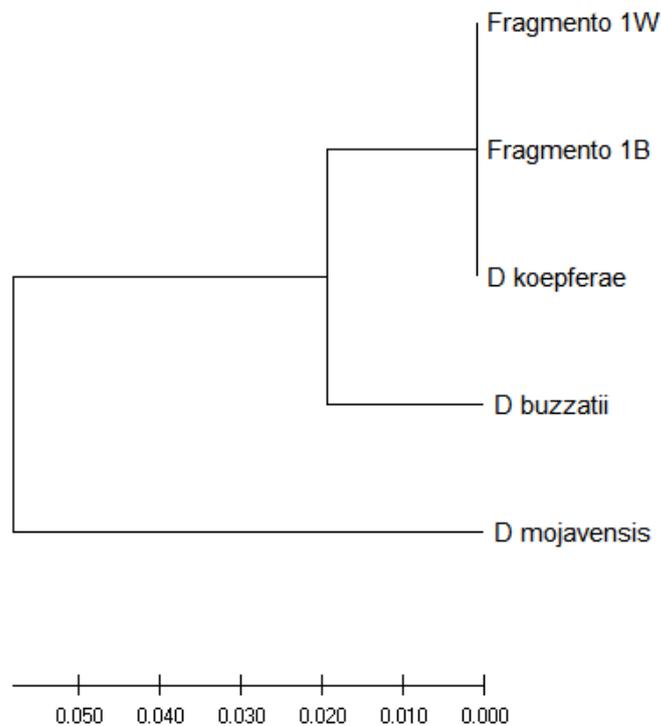


Figura 4: Árbol Neighbour Joining computado por Mega X

La prueba Z basada en codones realizada para medir las fuerzas selectivas en los distintos genes de la región 1, muestra unos resultados significativos para los dos genes analizados cuando se utilizó como hipótesis alternativa “dN < dS” (**Tabla 4** y **Tabla 5**). Para la hipótesis alternativa “dN > dS” no hubo resultados estadísticamente significativos. En función de dichos resultados no se observó ningún tipo de selección entre las secuencias 1W, 1B y el genoma mitocondrial de *D. koepferae*, como era de esperar debido a la ausencia de diferencias nucleotídicas. En cambio, en el resto de parejas ha actuado una fuerza selectiva purificadora. Se rechaza la hipótesis nula entre las distintas cadenas menos entre las que no comparten ninguna diferencia en sus secuencias.

	1	2	3	4	5
1. 1W		0.0000	2.0664	0.0000	2.0289
2. 1B	1.0000		2.0664	0.0000	2.0289
3. <i>D. buzzatii</i>	0.0205	0.0205		2.0664	2.1546
4. <i>D. koepferae</i>	1.0000	1.0000	0.0205		2.0289
5. <i>D. mojavensis</i>	0.0223	0.0223	0.0166	0.0223	

Tabla 4: Tabla de valores para la prueba Z basada en codones realizada en el gen ND4L. Las casillas vacías forman una diagonal que separan los valores Z (Mitad superior derecha) de los valores P (Mitad inferior izquierda). Tabla computada por Mega X.

	1	2	3	4	5
1. 1W		0.0000	3.1613	0.0000	2.7052
2. 1B	1.0000		3.1613	0.0000	2.7052
3. <i>D. buzzatii</i>	0.0010	0.0010		3.1613	2.4858
4. <i>D. koepferae</i>	1.0000	1.0000	0.0010		2.7052
5. <i>D. mojavensis</i>	0.0039	0.0039	0.0072	0.0039	

Tabla 5: Tabla de valores para la prueba Z basada en codones realizada en el gen ND6. Las casillas vacías forman una diagonal que separan los valores Z (Mitad superior derecha) de los valores P (Mitad inferior izquierda). Tabla computada por Mega X.

5. Discusión

5.1. Optimización de las condiciones de PCR

Como se describió anteriormente, durante el ensamblaje de la primera secuencia de *D. buzzatii* a partir de *scaffolds* del proyecto genoma de esta especie, se observó que había dos grandes regiones que no estaban comprendidas en ninguno de los *scaffolds*. Uno de los fragmentos a secuenciar en este trabajo era el fragmento 2, el cual pertenece a una de dichas regiones. El kit de PCR utilizado permite amplificar fragmentos de hasta 6 kb (NZYTech). Es posible que la longitud real del fragmento 2 fuese mayor a lo esperado.

Sin embargo, esta no es la única razón posible por la que no se obtuvo material genético amplificado. Como se ha visto anteriormente, y de lo cual se hablará en el siguiente apartado, el genoma mitocondrial obtenido en las cepas B y W se corresponde al de *Drosophila koepferae*. Esto supone una dificultad añadida en el momento del anillamiento de los *primers* a la cadena de ADN, ya que es posible que aumenten las diferencias dentro de los cebadores.

Se debe añadir que el genoma mitocondrial del género *Drosophila* Fallén es muy rico en los nucleótidos A + T (Haag-Liutard et al, 2008). Para conseguir una óptima hibridación de los cebadores a la cadena molde complementaria el mínimo porcentaje de G + C necesario es de un 50 %, y además, en la posición inicial y final debe haber un nucleótido de G o de C. Esto dificulta la búsqueda de cebadores en el genoma mitocondrial de este género (M. Horton & C. Tait, 1998).

5.2. Análisis comparativo de las secuencias obtenidas

Las moscas utilizadas tienen su origen común en una cepa capturada en San Luís en 1979 (Fontdevila, Ruiz, Ocaña & Alonso, 1982). Tienen por tanto un tiempo máximo de divergencia de 41 años. Como se ha visto, no hubo ninguna mutación entre las cepas B y W en el fragmento 1. Utilizando la tasa de mutación (μ) de $6,2 \cdot 10^{-8}$ sustituciones por nucleótido por generación obtenida por Haag-Liutard et al (2008) en la especie *Drosophila melanogaster*, y asumiendo que μ

permanece invariable en cada generación (Kimura, 1987), dada la siguiente fórmula,

$$\mu = s / (t \cdot n) \quad (1)$$

se obtiene que el tiempo de divergencia estimado necesario es de 11.956 generaciones (s) para que se fije una mutación en una cadena de 1.348 nucleótidos (n). El tiempo de divergencia sería de 1.196 años si se asumen 10 generaciones por año (Stephan & Li, 2007; Li, Satta, & Takahata, 1999; Sawyer & Hartl; 1992). Esto no es ni mucho menos aproximado, pero nos da una idea de lo alejadas que están de diferir en un solo nucleótido ambas secuencias.

La ausencia de mutaciones entre los dos fragmentos ensamblados y el genoma mitocondrial de *D. koepferae*, y la gran cantidad de diferencias entre estos dos y el genoma mitocondrial de *D. buzzatii*, supuso un replanteamiento del origen de las cepas utilizadas. El ADN mitocondrial de las cepas obtenidas de *D. buzzatii* se corresponde al genoma mitocondrial de *D. koepferae*, lo cual también se puede ver en el árbol filogenético obtenido. Esto no quiere decir que las moscas a las cuales se les clasificó como *D. buzzatii* pertenezcan en realidad a *D. koepferae*. Las moscas de la cepa W (o SL101w) utilizadas en este trabajo tienen su origen en una serie de cruzamientos realizados en 1886 (Naveira & Fontdevila, 1991). En ellos se intentaba probar los efectos sobre la *fitness* que produce la introgresión de regiones cromosómicas nucleares de *D. koepferae* en un fondo genético de *D. buzzatii*. Para ello se cruzaron hembras de *D. koepferae* con machos de *D. buzzatii*, y con las hembras de la generación de híbridos obtenida se hizo una serie de retrocruzamientos con machos de *D. buzzatii* de la generación parental. Esto explicaría por qué el genoma mitocondrial de dicha cepa pertenece a *D. koepferae*, ya que solo las mitocondrias procedentes de las madres son heredadas a la descendencia (Hurd, Herrmann, Sauerwald, Sanny, Grosch, & Lehmann, 2016). Sin embargo, la presencia de genoma mitocondrial de *D. koepferae* fue algo inesperado para la cepa B, ya que en sus generaciones parentales no debería de haber ningún híbrido. Al revisar las moscas que fueron seleccionadas, se vio que hubo un error a la hora de elegir las cepas. La cepa B utilizada en este proyecto también procede de uno de los retrocruzamientos entre

hembras híbridas y machos de *D. buzzatii*, de modo que no pertenece a la cepa original (SL6) utilizada en la tesis de Rodríguez (2015).

Por lo tanto, si bien uno de los objetivos iniciales era observar de forma directa alguna diferencia entre las cepas originales que indicase el por qué hay una inviabilidad de los machos al cruzarlas, esto no es posible debido a la ausencia de la cepa SL6. No obstante, ahora se sabe que la asimetría de la razón sexual tras cruzar las cepas SL101w y SL6 (Rodríguez, 2015) se debe a una diferencia de genomas mitocondriales procedentes de distintas especies. Se ha visto en otros estudios que el cruzamiento de híbridos xenonucleares produce cambios en el desarrollo (Deremiens, Schwartz, Angers, Glémet & Angers, 2015). El genoma mitocondrial y el genoma nuclear están en constante coevolución. Como las mitocondrias solo son transmitidas por vía materna la selección no puede actuar en las mitocondrias de los machos (Clancy, Hime, & Shirras, 2011). Este podría ser un motivo que explique el por qué de esa inviabilidad. En cambio, un gen nuclear del cromosoma X que interaccione con un gen mitocondrial también podría ser la causa de que sobrevivan aproximadamente la mitad de los machos tras el cruzamiento en la tesis de Rodríguez (2015).

La similitud que hay en el número de diferencias entre las secuencias de *D. koepferae* y *D. buzzatii* con la secuencia mitocondrial de *D. mojavensis* concuerda con la hipótesis del reloj molecular (Zuckerland & Pauling, 1962). En dicha hipótesis se asume que el número de distancias es directamente proporcional al tiempo de divergencia. Como se puede ver en el árbol filogenético generado, *D. mojavensis* es un taxón externo a las otras dos especies, por lo que el tiempo de divergencia entre estas y el grupo externo es el mismo.

6. Conclusiones

- 1) Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento 1 hibridaron correctamente con la cadena molde, a pesar de los inconvenientes que presentaba la cadena de referencia. En el fragmento 2, en cambio, no se obtuvo producto de PCR debido a los problemas descritos anteriormente. En resumen, los motivos posibles por los cuales no se obtuvo producto fueron:
 - (a) Una región demasiado larga como para ser amplificada.
 - (b) La dificultad de encontrar cebadores con la proporción adecuada de contenido GC para hibridar con la cadena molde en el genoma mitocondrial de *D. buzzatii*.
 - (c) El genoma mitocondrial a amplificar pertenece a una especie diferente de *D. buzzatii*.
- 2) La cepa SL101w pertenece a un híbrido mitonuclear. Es decir, contiene un genoma mitocondrial de *D. koepferae* transmitido por herencia materna, y un genoma nuclear de *D. buzzatii*. El hecho de que el genoma mitocondrial de las cepas SL6 y SL101w pertenezcan a especies distintas puede causar una interacción entre el genoma mitocondrial de *D. koepferae* transmitido por las hembras de la cepa SL101w y el genoma nuclear de *D. buzzatii* transmitido por los machos de la línea SL6, causando la inviabilidad en la que se basó este proyecto.

Bibliografía

- Carvajal, A. R., Gandarela, M. R., & Naveira, H. F. (1996). A three-locus system of interspecific incompatibility underlies male inviability in hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Genetica*, 98(1), 1-19.
- Chen, Z., Zhang, F., & Xu, H. (2019). Human mitochondrial DNA diseases and *Drosophila* models. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 46(4), 201–212.
- Clancy, D. J., Hime, G. R., & Shirras, A. D. (2011). Cytoplasmic male sterility in *Drosophila melanogaster* associated with a mitochondrial CYTB variant. *Heredity*, 107(4), 374-376.
- Connallon, T., Camus, M. F., Morrow, E. H., & Dowling, D. K. (2018). Coadaptation of mitochondrial and nuclear genes, and the cost of mother's curse. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1871), 20172257.
- Deremiens, L., Schwartz, L., Angers, A., Glémet, H., & Angers, B. (2015). Interactions between nuclear genes and a foreign mitochondrial genome in the redbelly dace *Chrosomus eos*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 189, 80-86.
- Fontdevila, A., Ruiz, A., Ocaña, J., & Alonso, G. (1982). Evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. II. How much has chromosomal polymorphism changed in colonization?. *Evolution*, 843-851.
- Goldman, N., & Yang, Z. (1994). A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Molecular biology and evolution*, 11(5), 725-736.
- Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., & Keightley, P. D. (2008). Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS biology*, 6(8).
- Hurd, T. R., Herrmann, B., Sauerwald, J., Sanny, J., Grosch, M., & Lehmann, R. (2016). Long Oskar controls mitochondrial inheritance in *Drosophila melanogaster*. *Developmental cell*, 39(5), 560-571.
- Kimura, M. (1987). Molecular evolutionary clock and the neutral theory. *Journal of molecular evolution*, 26(1-2), 24-33.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Li, Y. J., Satta, Y., & Takahata, N. (1999). Paleo-demography of the *Drosophila melanogaster* subgroup: application of the maximum likelihood method. *Genes & genetic systems*, 74(4), 117-127.
- Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., ... & Chen, S. M. (2018). Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(51), 13039-13044.
- M. Horton, R., & C. Tait, R. (1998). Designing the Mutant Primer. En R. M. Horton, & R. C. Tait, *Genetic Engineering with PCR* (págs. 27-28). Wyomondham: Horizon scientific press.
- Mai, N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., & Lightowlers, R. N. (2017). The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell and tissue research*, 367(1), 5-20.
- Manfrin, M. H., De Brito, R. O. A., & Sene, F. D. M. (2001). Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) cluster using mtDNA. *Annals of the Entomological Society of America*, 94(3), 333-346.
- Moreyra, N. N., Mensch, J., Hurtado, J., Almeida, F., Laprida, C., & Hasson, E. (2019). What does mitogenomics tell us about the evolutionary history of the *Drosophila buzzatii* cluster (repleta group)? *PloS one*, 14(11).
- Naveira, H., & Fontdevila, A. (1991). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXI. Cumulative action of multiple sterility factors on spermatogenesis in hybrids of *D. buzzatii* and *D. koepferae*. *Heredity*, 67, 57-72.
- NCBI & U.S.NLM (s.f.). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Homo+sapiens>
- NIH (s. f.). Obtenido de <https://www.genome.gov/human-genome-project/Completion-FAQ>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & Ugene Team. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166-1167.
- Pon, L. A., Vestweber, D., Yang, M., & Schatz, G. (1989). Interaction between mitochondria and the nucleus. *J Cell Sci*, 1989(Supplement 11), 1-11.

- Rodríguez, L. C. (2015). Especiación en el género *Drosophila*: efectos sobre la fitness de introgresiones cromosómicas estables de *D. koepferae* en *D. buzzatii*. Universidade da Coruña.
- Rodríguez-Trelles, F., Alarcón, L., & Fontdevila, A. (2000). Molecular evolution and phylogeny of the *buzzatii* complex (*Drosophila repleta* group): a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, 17(7), 1112-1122.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
- Sawyer, S. A., & Hartl, D. L. (1992). Population genetics of polymorphism and divergence. *Genetics*, 132(4), 1161-1176.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1).
- Stephan, W., & Li, H. (2007). The recent demographic and adaptive history of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 98(2), 65-68.
- Wolff, J. N., Nafisinia, M., Sutovsky, P., & Ballard, J. W. O. (2013). Paternal transmission of mitochondrial DNA as an integral part of mitochondrial inheritance in metapopulations of *Drosophila simulans*. *Heredity*, 110(1), 57-62.
- Yang, Z. (2006). Models of Nucleotide Substitution. En Yang, Z. (2006). *Computational molecular evolution* (Págs. 1-39). Oxford University Press,.
- Zuckerandl, E., Pauling, L. (1962) Molecular disease, evolution and genic heterogeneity. In: Kasha M, Pullman B, eds. *Horizons in biochemistry*. New York: Academic Press. 604 p.

1B-R ATTGAAAGTAAATGCTTACGATTAAGAAACAAAACAAAATAAACCAAAAATAAATAAAATATTGGCAATC 9800
 1B-F ATTGAAAGTAAATGCTTACGATTAAGAAACAAAACAAAATAAACCAAAAATAAATAAAATATTGGCAATC 9800
 1W-R ATTGAAAGTAAATGCTTACGATTAAGAAACAAAACAAAATAAACCAAAAATAAATAAAATATTGGCAATC 9800
 1W-F ATTGAAAGTAAATGCTTACGATTAAGAAACAAAACAAAATAAACCAAAAATAAATAAAATATTGGCAATC 9800
 D_buzzatii_mt ATTGAAAGTAAATGCTTACGATTAAGAAACAAAACAAAATAAACCAAAAATAAATAAAATATTGGTAAATC 9800
 ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

1B-R TTCAATACAAAATTATAATCATTAGTTTTAATAGTTTAAATAAAAAACATGGGCTTGTAATCAAAAATAA 9870
 1B-F TTCAATACAAAATTATAATCATTAGTTTTAATAGTTTAAATAAAAAACATGGGCTTGTAATCAAAAATAA 9870
 1W-R TTCAATACAAAATTATAATCATTAGTTTTAATAGTTTAAATAAAAAACATGGGCTTGTAATCAAAAATAA 9870
 1W-F TTCAATACAAAATTATAATCATTAGTTTTAATAGTTTAAATAAAAAACATGGGCTTGTAATCAAAAATAA 9870
 D_buzzatii_mt TTCAATATAAAAATTATAATCATTAGTTTTAATAGTTTAAATAAAAAACATGGGCTTGTAATCAAAAATAA 9870
 ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

1B-R GAATTTT--TTCTTTTAAAACCTTCAAGAAAAAGATGTTCTTTTTCATTAATCCCCAAAATTAATATTTTA 9940
 1B-F GAATTTT--TTCTTTTAAAACCTTCAAGAAAAAGATGTTCTTTTTCATTAATCCCCAAAATTAATATTTTA 9940
 1W-R GAATTTT--TTCTTTTAAAACCTTCAAGAAAAAGATGTTCTTTTTCATTAATCCCCAAAATTAATATTTTA 9940
 1W-F GAATTTT--TTCTTTTAAAACCTTCAAGAAAAAGATGTTCTTTTTCATTAATCCCCAAAATTAATATTTTA 9940
 D_buzzatii_mt GATTTTTTTTCTTTTAAAACCTTCAAGAAAAAGATTTCTTTTTCATTAATCCCCAAAATTAATATTTTA 9940
 ** ** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

1B-R TTATAAACTATTTCTTGAAATTCCTCAATTAATTTCTTTATTCATTAATTTTTTTTAAACATCAATATTTTT 10010
 1B-F TTATAAACTATTTCTTGAAATTCCTCAATTAATTTCTTTATTCATTAATTTTTTTTAAACATCAATATTTTT 10010
 1W-R TTATAAACTATTTCTTGAAATTCCTCAATTAATTTCTTTATTCATTAATTTTTTTTAAACATCAATATTTTT 10010
 1W-F TTATAAACTATTTCTTGAAATTCCTCAATTAATTTCTTTATTCATTAATTTTTTTTAAACATCAATATTTTT 10010
 D_buzzatii_mt ATATAAACTATTTCTTGAAATTCCTCAATTAATTTCTTTATTCATTAATTTTTTTTAAACATCAATATTTTT 10010
 ***** ***** * * * * * ** * * * ***** ***** * ****

1B-R ATTAATATAATTACCCATTAGCAATAGGTTAACACTATTAATTCAAACAATTTTAATTTGTTTAATCT 10080
 1B-F ATTAATATAATTACCCATTAGCAATAGGTTAACACTATTAATTCAAACAATTTTAATTTGTTTAATCT 10080
 1W-R ATTAATATAATTACCCATTAGCAATAGGTTAACACTATTAATTCAAACAATTTTAATTTGTTTAATCT 10080
 1W-F ATTAATATAATTACCCATTAGCAATAGGTTAACACTATTAATTCAAACAATTTTAATTTGTTTAATCT 10080
 D_buzzatii_mt ATTAATATAATTACCCATTAGCAATAGGTTAACACTATTAATTCAAACAATTTTAATTTGTTTAATTT 10080
 *

1B-R CTGGCCTAATAACAAAACCTTTTGGATTTCTTATATTTTATTTTAAATTTTTTTGGGGGATACTAGT 10150
 1B-F CTGGCCTAATAACAAAACCTTTTGGATTTCTTATATTTTATTTTAAATTTTTTTGGGGGATACTAGT 10150
 1W-R CTGGCCTAATAACAAAACCTTTTGGATTTCTTATATTTTATTTTAAATTTTTTTGGGGGATACTAGT 10150
 1W-F CTGGCCTAATAACAAAACCTTTTGGATTTCTTATATTTTATTTTAAATTTTTTTGGGGGATACTAGT 10150
 D_buzzatii_mt CTGGTTTAAATAACAAAACCTTTTGGATTTCTTATATTTTATTTTAAATTTTTTTAGGAGGAATATTAGT 10150

1B-R TTTATTTATTTATGTTACATCTTTAGCTTCTAATGAAATATTTAACCTATCAATTAATAAATAACATAAAT 10220
 1B-F TTTATTTATTTATGTTACATCTTTAGCTTCTAATGAAATATTTAACCTATCAATTAATAAATAACATAAAT 10220
 1W-R TTTATTTATTTATGTTACATCTTTAGCTTCTAATGAAATATTTAACCTATCAATTAATAAATAACATAAAT 10220
 1W-F TTTATTTATTTATGTTACATCTTTAGCTTCTAATGAAATATTTAACCTATCAATTAATAAATAACATAAAT 10220
 D_buzzatii_mt TTTATTTATTTATGTTACATCTTTAGCTTCTAATGAAATATTTAACCTATCAATTAATAAATAACATAAAT 10220

1B-R TGTTTTTATTTTATTAATTTCAAGAATTTTATTAATTTTATTTTAGACAAAACCTATTTTCTTTTTTTT 10290
 1B-F TGTTTTTATTTTATTAATTTCAAGAATTTTATTAATTTTATTTTAGACAAAACCTATTTTCTTTTTTTT 10290
 1W-R TGTTTTTATTTTATTAATTTCAAGAATTTTATTAATTTTATTTTAGACAAAACCTATTTTCTTTTTTTT 10290
 1W-F TGTTTTTATTTTATTAATTTCAAGAATTTTATTAATTTTATTTTAGACAAAACCTATTTTCTTTTTTTT 10290
 D_buzzatii_mt TGTTTTTATTTTATTAATTTCAAGAATTTTATTAATTTTATTTTAGACAAAACCTATTTTCTTTTTTTT 10290

1B-R TAATTAATAATGAAATACAAAATATTTTATATATTTTATTTTATTTTCCAGAAAATTCCTTATCTTTAA 10360
 1B-F TAATTAATAATGAAATACAAAATATTTTATATATTTTATTTTATTTTCCAGAAAATTCCTTATCTTTAA 10360
 1W-R TAATTAATAATGAAATACAAAATATTTTATATATTTTATTTTATTTTCCAGAAAATTCCTTATCTTTAA 10360
 1W-F TAATTAATAATGAAATACAAAATATTTTATATATTTTATTTTATTTTCCAGAAAATTCCTTATCTTTAA 10360
 D_buzzatii_mt TAATTAATAATGAAATACAAAATATTTTATATATTTTATTTTATTTTCCAGAAAATTCATTATCTTTAA 10360

1B-R TAAATTATATAATTTTCCAACAAATTTGTAACAATTCCTCTATAAAATATCTCTAATTACATTAATT 10430
 1B-F TAAATTATATAATTTTCCAACAAATTTGTAACAATTCCTCTATAAAATATCTCTAATTACATTAATT 10430
 1W-R TAAATTATATAATTTTCCAACAAATTTGTAACAATTCCTCTATAAAATATCTCTAATTACATTAATT 10430
 1W-F TAAATTATATAATTTTCCAACAAATTTGTAACAATTCCTCTATAAAATATCTCTAATTACATTAATT 10430
 D_buzzatii_mt TAAATTATATAATTTTCCAACAAATTTGTAACAATTCCTCTATAAAATATTTTACTAATTACATTAATT 10430

1B-R GTTATTGTAAAAATTACAAAATATTTTAAAGGACCTCTTCGACTTATAAAATAATGAATAAACCTTTACG 10500
 1B-F GTTATTGTAAAAATTACAAAATATTTTAAAGGACCTCTTCGACTTATAAAATAATGAATAAACCTTTACG 10500
 1W-R GTTATTGTAAAAATTACAAAATATTTTAAAGGACCTCTTCGACTTATAAAATAATGAATAAACCTTTACG 10500
 1W-F GTTATTGTAAAAATTACAAAATATTTTAAAGGACCTCTTCGACTTATAAAATAATGAATAAACCTTTACG 10500
 D_buzzatii_mt GTTATTGTAAAAATTACAAAATATTTTAAAGGACCTCTTCGACTTATAAACTAATGAATAAACCTTTACG 10500

1B-R	AACTTCACATCCACTCTTTAAAAATTGCTAATAATGCTTCAAGG-----	10570
1B-F	-----	10570
1W-R	AACTTCACATCCACTCTTTAAAAATTGCTAATAATG-----	10570
1W-F	-----	10570
D_buzzatii_mt	AACTTCCCACCCACTTTTAAAAATTGCTAATAATGCTTTAGTTGATTTACCTGCACCTATTAATATTTCT	10570

Anexo 2: Alineamiento entre el fragmento 1 ensamblado de las cepas W y B y de los genomas mitocondriales de D. koepferae, D. buzzatii y D. mojavensis. *: Sitios en los que coinciden todas las secuencias del alineamiento.

CLUSTAL W 2.0 multiple sequence alignment

1W AAAAAATAAAATAAAATAAATCTTATTCTCTAAATGTTAAAACTAACCAATAAAAGTAATATAACAA 70
1B AAAAAATAAAATAAAATAAATCTTATTCTCTAAATGTTAAAACTAACCAATAAAAGTAATATAACAA 70
D_koepferae AAAAAATAAAATAAAATAAATCTTATTCTCTAAATGTTAAAACTAACCAATAAAAGTAATATAACAA 70
D_buzzatii AAAAAATAAAATAAAATAAATCTTATTCTCTAAATGTTAAAACTAACCAATAAAAGTAATATAACAA 70
D_mojavensis AAAAAATAAAATAAAATAAATCTTATTCTCTAAATGTTAAAACTAACCAATAAAAGTAATATAACAA 70
***** *
1W CATTTAATAAAAAATAAATTTTTATAATTATTATTTTATAAACACTTTCACCTTGCTATTAATATTTAAAGA 140
1B CATTTAATAAAAAATAAATTTTTATAATTATTATTTTATAAACACTTTCACCTTGCTATTAATATTTAAAGA 140
D_koepferae CATTTAATAAAAAATAAATTTTTATAATTATTATTTTATAAACACTTTCACCTTGCTATTAATATTTAAAGA 140
D_buzzatii CATTTAATAAAAAATAAATTTTTATAATTATTATTTTATAAACACTTTCACCTTGCTATTAATATTTAAAGA 140
D_mojavensis TATTAATAAAAAATAAATTTTTATAATTATTATTTTATAAATTTTTCTCTTGCTATAATTATAAGGGC 140

1W ACAAATTCATAATGATAATAAAATCAACCCATAAGACAATATATCTCCCCCTAAAAAATAAGAAATTCCT 210
1B ACAAATTCATAATGATAATAAAATCAACCCATAAGACAATATATCTCCCCCTAAAAAATAAGAAATTCCT 210
D_koepferae ACAAATTCATAATGATAATAAAATCAACCCATAAGACAATATATCTCCCCCTAAAAAATAAGAAATTCCT 210
D_buzzatii ACAAATTCATAATGATAATAAAATCAACCCATAAGACAATATATCTCCCCCTAAAAAATAAGAAATTCCT 210
D_mojavensis ACAAATTCATAATGATAATAAAATCAACCCATAAGACAATATATCTCTTCTAAAAAATAAGAAATTCCT 210

1W GTTCAGTAATTTAAAAAATTTTATTATAAAAGTATAACAAAACCTCATAAAAAATAAATAAAATTTGTACCA 280
1B GTTCAGTAATTTAAAAAATTTTATTATAAAAGTATAACAAAACCTCATAAAAAATAAATAAAATTTGTACCA 280
D_koepferae GTTCAGTAATTTAAAAAATTTTATTATAAAAGTATAACAAAACCTCATAAAAAATAAATAAAATTTGTACCA 280
D_buzzatii GTTCAGTAATTTAAAAAATTTTATTATAAAAGTATAACAAAACCTCATAAAAAATAAATAAAATTTGTACCA 280
D_mojavensis ATCCAATAATTTAAAAAATTTTATTATAAAAGTATAACAAAACCTCATAAAAAATAAATAAAATTTGTACCA 280
* *
1W TTCAAAAATATATTTTATAAAAACAAAGAGGCTTTAAAAAATAAAAAATAAATTAATTTTAAACATTAT 350
1B TTCAAAAATATATTTTATAAAAACAAAGAGGCTTTAAAAAATAAAAAATAAATTAATTTTAAACATTAT 350
D_koepferae TTCAAAAATATATTTTATAAAAACAAAGAGGCTTTAAAAAATAAAAAATAAATTAATTTTAAACATTAT 350
D_buzzatii TTCAAAAATATATTTTATAAAAACAAAGAGGCTTTAAAAAATAAAAAATAAATTAATTTTAAACATTAT 350
D_mojavensis TTCAAAAATATATTTTATAAAAACAAATAGGCTTTAAAAAATAAAAAAATAAATTTTAAACATTAT 350

1W ATAATTCATAATGATTGAAAAATAATCATTCACATGAGTTCCGAATTTATGATACTAAAAATGATAACCCCTA 420
1B ATAATTCATAATGATTGAAAAATAATCATTCACATGAGTTCCGAATTTATGATACTAAAAATGATAACCCCTA 420
D_koepferae ATAATTCATAATGATTGAAAAATAATCATTCACATGAGTTCCGAATTTATGATACTAAAAATGATAACCCCTA 420
D_buzzatii ATAATTCATAATGATTGAAAAATAATCATTCACATGAGTTCCGAATTTATGATACTAAAAATGATAACCCCTA 420
D_mojavensis ATAATTCATAATGATTGAAAAATAATCATTCACATGAGTTCCGAATTTATGAAACTAAAAATGATAGCCCTA 420

1W ATGCTCCTTCACATACTCTAAAAAGTTAAAAATATTATACTAAAAAACTTTTCATAATTTAATATATTTTAA 490
1B ATGCTCCTTCACATACTCTAAAAAGTTAAAAATATTATACTAAAAAACTTTTCATAATTTAATATATTTTAA 490
D_koepferae ATGCTCCTTCACATACTCTAAAAAGTTAAAAATATTATACTAAAAAACTTTTCATAATTTAATATATTTTAA 490
D_buzzatii ATGCTCCTTCACATACTCTAAAAAGTTAAAAATATTATACTAAAAAACTTTTCATAATTTAATATATTTTAA 490
D_mojavensis AAGCACCCTTCACATACTCTAAAAAGTTAAAAATATTATACTAAAAAACTTTTCATAATTTAATATATTTTAA 490
* *
1W ATAAATAAATAAATAAAAAAATAAAATTAATACAATAAACTCTAAACTTAATAAATTTGAAAGTAAATGC 560
1B ATAAATAAATAAATAAAAAAATAAAATTAATACAATAAACTCTAAACTTAATAAATTTGAAAGTAAATGC 560
D_koepferae ATAAATAAATAAATAAAAAAATAAAATTAATACAATAAACTCTAAACTTAATAAATTTGAAAGTAAATGC 560
D_buzzatii ATAAATAAATAAATAAAAAAATAAATTAATACAATAAACTCTAAACTTAATAAATTTGAAAGTAAATGC 560
D_mojavensis ATAAATAAATAAATAAAAAAATAAACTTAATACAATAAACTCTAAACTTAATAAATTTGAAAGTAAATGC 560

1W TTACGATTAGAAACAAACAAATAAAACCAAAAAATAAATAAATTTATGGCAATCTTCAATACAAAATTA 630
1B TTACGATTAGAAACAAACAAATAAAACCAAAAAATAAATAAATTTATGGCAATCTTCAATACAAAATTA 630
D_koepferae TTACGATTAGAAACAAACAAATAAAACCAAAAAATAAATAAATTTATGGCAATCTTCAATACAAAATTA 630
D_buzzatii TTACGATTAGAAACAAACAAATAAAACCAAAAAATAAATAAATTTATGGCAATCTTCAATACAAAATTA 630
D_mojavensis TTTCGATTAGAAACAAACAAATAAAACCAAAAAATAAATAAATTTATGGCAATCTTCAATACAAAATTA 630
* *
1W TAATCATTAAGTTTAAATAGTTTAAATAAAAAATTTGGTCTTGTAAATCAAAAATAAGAAATTT--TTCTTTT 700
1B TAATCATTAAGTTTAAATAGTTTAAATAAAAAATTTGGTCTTGTAAATCAAAAATAAGAAATTT--TTCTTTT 700
D_koepferae TAATCATTAAGTTTAAATAGTTTAAATAAAAAATTTGGTCTTGTAAATCAAAAATAAGAAATTT--TTCTTTT 700
D_buzzatii TAATCATTAAGTTTAAATAGTTTAAATAAAAAATTTGGTCTTGTAAATCAAAAATAAGAAATTT--TTCTTTT 700
D_mojavensis TAATCATTAAGTTTAAATAGTTTAAATAAAAAATTTGGTCTTGTAAATCAAAAATAAGAAATTT--TTCTTTT 700

1W AAAACTTCAAGAAAAAGATGTTCTTTTTCATTAATCCCAAAATTAATATTTTATTATAAACTATTTCCT 770

1B	AAAACTTCAAGAAAAAGATGTTCTTTTTCATTAATCCCCAAAATTAATATTTTATTATAAACTATTTCT	770
D_koepferae	AAAACTTCAAGAAAAAGATGTTCTTTTTCATTAATCCCCAAAATTAATATTTTATTATAAACTATTTCT	770
D_buzzatii	AAAACTTCAAGAAAAAGATTTTCTTTATCATTAAATCCCCAAAATTAATATTTTAAATATAAACTATTTCT	770
D_mojavensis	AAAACTTCAAGAAAAAGATTTTCTTTTTCATTAATCCCCAAAATTAATATT-TTACATAAACTATTTCT	770

1W	TGAAATTTCTTCAATTAATTCCTTTATTTCATTAATTTTTTTTAAACATCAATTATTTTTATTAATATAAATTCAC	840
1B	TGAAATTTCTTCAATTAATTCCTTTATTTCATTAATTTTTTTTAAACATCAATTATTTTTATTAATATAAATTCAC	840
D_koepferae	TGAAATTTCTTCAATTAATTCCTTTATTTCATTAATTTTTTTTAAACATCAATTATTTTTATTAATATAAATTCAC	840
D_buzzatii	TGAAATTTCTTCAATTAATTCCTTTATTTCATTAATTTTTTTTAAACATCAATTATTTTTATTAATATAAATTCAC	840
D_mojavensis	TGATATTTCTTCAATTAATTCCTTTACTCAATAATTTTTTTTAAACATCAATTATTTTTATTAATATAAATTCAC	840

1W	CCATTAGCAATAGGTTTAACTATTAAATTCAAACAATTTTAAATTTGTTAATCTCTGGCCATAAACAA	910
1B	CCATTAGCAATAGGTTTAACTATTAAATTCAAACAATTTTAAATTTGTTAATCTCTGGCCATAAACAA	910
D_koepferae	CCATTAGCAATAGGTTTAACTATTAAATTCAAACAATTTTAAATTTGTTAATCTCTGGCCATAAACAA	910
D_buzzatii	CCATTAGCAATAGGTTTAACTATTAAATTCAAACAATTTTAAATTTGTTAATTTCTGGTTTAAATAACAA	910
D_mojavensis	CCATTAGCTTTAGGTTTAACTTTTAAATCCAAACAATTTTAAATTTCTAGTAACCTGGGTTAAATAACAA	910

1W	AAACTTTTTGATTTTCTTATATTTTATTTTTAATTTTTTTGGGGGGTATACTAGTTTTATTTATTTATGT	980
1B	AAACTTTTTGATTTTCTTATATTTTATTTTTAATTTTTTTGGGGGGTATACTAGTTTTATTTATTTATGT	980
D_koepferae	AAACTTTTTGATTTTCTTATATTTTATTTTTAATTTTTTTGGGGGGTATACTAGTTTTATTTATTTATGT	980
D_buzzatii	AAACTTTTTGATTTTCTTATATTTTATTTTTAATTTTTTTAGGAGGAATATTAGTTTTATTTATTTATGT	980
D_mojavensis	AAACTTTTTGATTTTCTTATATTTTATTTTTAATTTTTTTAGGGGGAAATATTAGTTTTATTTATTTATGT	980

1W	TACATCTTTAGCTTCTAATGAAATATTTAACCTATCATTAAAATTAACAATAATTTGTTTTATTTATTA	1050
1B	TACATCTTTAGCTTCTAATGAAATATTTAACCTATCATTAAAATTAACAATAATTTGTTTTATTTATTA	1050
D_koepferae	TACATCTTTAGCTTCTAATGAAATATTTAACCTATCATTAAAATTAACAATAATTTGTTTTATTTATTA	1050
D_buzzatii	TACATCTTTAGCTTCTAATGAAATATTTAATTTATCTTAAAATTAACGATAAATTTGTTTTATTTATTA	1050
D_mojavensis	AACATCATTGGCATCAAAATGAAATATTTAATTTATCATTAAAATTAACCTTTAACATGTTTTAATTAATTT	1050

1W	ATTTCAAGAAATTTTATTAATTTTATTTTTAGCAAAAACATTTTTCTTTTTTTTAAATTAATAATGAAA	1120
1B	ATTTCAAGAAATTTTATTAATTTTATTTTTAGCAAAAACATTTTTCTTTTTTTTAAATTAATAATGAAA	1120
D_koepferae	ATTTCAAGAAATTTTATTAATTTTATTTTTAGCAAAAACATTTTTCTTTTTTTTAAATTAATAATGAAA	1120
D_buzzatii	ATTTCAAGAAATTTTATTAATTTTATTTTTAGCAAAAACATTTTTCTTTTTTTTAAATTAATAATGAAA	1120
D_mojavensis	ATTTCAAGAAATTTTATTCATCTTATTAATTAATAATAATTTAATTTCTTAACTTATATTCCAAAATAACGAAA	1120

1W	TACAAAAATTTTCATATATTTATTCATATTTTCCAGAAAATTCCTTATCTCTTAATAAATTAATAATTT	1190
1B	TACAAAAATTTTCATATATTTATTCATATTTTCCAGAAAATTCCTTATCTCTTAATAAATTAATAATTT	1190
D_koepferae	TACAAAAATTTTCATATATTTATTCATATTTTCCAGAAAATTCCTTATCTCTTAATAAATTAATAATTT	1190
D_buzzatii	TACAAAAATTTTCATATATTTATTCATATTTTCCAGAAAATTCATTATCTCTTAATAAATTAATAATTT	1190
D_mojavensis	TACAAAAATTTCTTAATATACATTTCTTATTTTTGAGAAAATTCCTTATCTTTAAATAAACTTTATAATTT	1190

1W	TCCAACAAAATTTTGTAAACAATTCCTTCTTATAAATTAATCTCCTAATTACATTAATTTGTTATTGTAAAAAT	1260
1B	TCCAACAAAATTTTGTAAACAATTCCTTCTTATAAATTAATCTCCTAATTACATTAATTTGTTATTGTAAAAAT	1260
D_koepferae	TCCAACAAAATTTTGTAAACAATTCCTTCTTATAAATTAATCTCCTAATTACATTAATTTGTTATTGTAAAAAT	1260
D_buzzatii	TCCAACAAAATTTTGTAAACAATTCCTTCTTATAAATTAATTTACTAATTACATTAATTTGTTATTGTAAAAAT	1260
D_mojavensis	TCCTACTAATTTTGTAAACAATTTTATAAATAAATTAATTTAATTAATTACATTAATTTGTTATTGTAAAAAT	1260

1W	ACAAAATTTATTTAAAGGACCTCTTCGACTTATAAATTAATGAATAAACCTTTACGAACCTTCACATCCACT	1330
1B	ACAAAATTTATTTAAAGGACCTCTTCGACTTATAAATTAATGAATAAACCTTTACGAACCTTCACATCCACT	1330
D_koepferae	ACAAAATTTATTTAAAGGACCTCTTCGACTTATAAATTAATGAATAAACCTTTACGAACCTTCACATCCACT	1330
D_buzzatii	ACAAAATTTATTTAAAGGACCTCTTCGACTTATAAATTAATGAATAAACCTTTACGAACCTTCACATCCACT	1330
D_mojavensis	ACAAAATTTATTTAAAGGACCTCTTCGCTTATAAATTAATGAATAAACCTTTACGAACCTTCACATCCCTT	1330

1W	CTTTAAAATTTGCTAATAATG	1350
1B	CTTTAAAATTTGCTAATAATG	1350
D_koepferae	CTTTAAAATTTGCTAATAATG	1350
D_buzzatii	TTTTAAAATTTGCTAATAATG	1350
D_mojavensis	ATTTAAAATTTGCTAATAATG	1350
