

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE BIOLOGIA



**"Evolución del genoma mitocondrial de especies  
del grupo *obscura* de *Drosophila*"**

Memoria que presenta  
*Eladio Barrio Esparducer*  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Valencia, a 30 de Junio 1992



UMI Number: U607662

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607662

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA CIÈNCIES

BIOLOGICAS

Nº Registre 2270

DATA 7-10-92

SIGNATURA TD-B 234

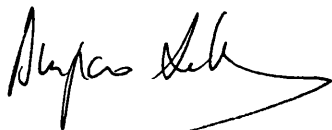
BIBLIOTECA

Nº LIBIS: j21522625

30 ans.

El presente trabajo ha sido dirigido por los Drs. Amparo Latorre Castillo y Andrés Moya Simarro Profesores Titulares del Departamento de Genética de la Universitat de València.

Valencia, a 30 de Junio de 1992



Fdo. Amparo Latorre Castillo



Fdo. Andrés Moya Simarro



**A Amparo.**

**A mi familia, en especial**

**a mi sobrina Iris.**

Entrega tu corazón al oficio que has aprendido y  
así hallarás el sosiego...

MARCO AURELIO, Meditaciones.

## AGRADECIMIENTOS

En el momento de finalizar el presente trabajo, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, en mayor o menor medida, han contribuido a la realización de este proyecto.

En primer lugar, se lo agradezco a mis directores, los Dres. Amparo Latorre y Andrés Moya, que además de directores son amigos, por la confianza que han depositado en mí, por el constante estímulo y ayuda.

A mi mujer, Amparo, sin la que este proyecto no hubiese finalizado, por su constante apoyo moral en los momentos difíciles. Si mío ha sido el mérito del guión, de ella ha sido el de toda la parte de edición y composición.

También deseo expresar mi gratitud al Prof. Francisco J. Ayala, por sus comentarios y su aportación a la realización y revisión de la parte de este trabajo que ya ha sido publicada, y por permitir que, próximamente, pueda completar mi formación postdoctoral en su laboratorio.

Debo expresar mi gratitud a todos los miembros de la gran familia de compañeros y amigos que es el grupo de Genética Evolutiva. A los compañeros de laboratorio, David, Alma, Rafa, Pepe, Ana, Celia, Vicky, Toni, y también a los que han ido pasando por el laboratorio, que hoy se encuentran en otros centros, por el extraordinario ambiente de camaradería y por sus sugerencias y colaboración. A aquellos alumnos de colaboración que han participado en diversas experiencias de la presente Tesis como Ana, Amparo, Angel, etc. También quiero agradecerse a los miembros del grupo, que trabajan en otros laboratorios, pero que participan del buen ambiente de camaradería: Agustí, Dori, Agustín, Angel, Javier y Carmen.

Y como no, menciono aparte merecen Fernando González y Santiago Elena, que sin sus sugerencias y asesoramiento en el análisis de secuencias y la aplicación de métodos filogenéticos, no se hubiese hecho realidad este proyecto.

A Daniel, Pascual, Ana, Luisa, Ramón y José Antonio, del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, por haberme permitido realizar las últimas experiencias en sus laboratorios, y por las sugerencias que me posibilitaron finalizar el presente trabajo.

A los restantes miembros del Departamento de Genética que han podido contribuir en el presente trabajo, en concreto a Manuel Pérez por sus sugerencias metodológicas.

A la "Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana" por concederme la beca para la obtención del grado de doctor. Y al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme una beca para, próximamente, completar mi formación postdoctoral.

Por último, también deseo expresar mi gratitud a los compañeros de otros Departamentos que han colaborado, directa o indirectamente, en la presente Tesis. En especial, a los compañeros y amigos de mi mujer en el Departamento de Microbiología, y al Departamento de Bioquímica por facilitarme las tareas burocráticas que conllevan la realización y defensa de una Tesis doctoral.

Seguramente, habré olvidado a muchas personas que, aún en pequeños detalles, han contribuido o facilitado la realización del presente trabajo. A todos ellos gracias.

## INDICE.

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
1. Características del DNA mitocondrial.....	2
1.1 Estructura y función del DNA mitocondrial.....	2
1.2. Variabilidad del DNA mitocondrial.....	5
2. El DNA mitocondrial como marcador evolutivo.....	7
2.1. Fenómenos de evolución revelados con el estudio del mtDNA	8
2.1.1. Obtención del Filogenias moleculares.....	8
2.1.2. Aplicación a la Genética de Poblaciones .....	9
3. Las especies del grupo <i>obscura</i> de <i>Drosophila</i> .....	10
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	20
1. Especies y cepas de <i>Drosophila</i> .....	22
2. Extracción y restricción del mtDNA .....	23
3. Digestión del DNA mitocondrial y obtención de los mapas de restrección.....	26
4. Clonación del mtDNA.....	28
5. Secuenciación del mtDNA.....	29
6. Análisis de secuencias y métodos filogenéticos.....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	32
1. Análisis filogenético basado en el polimorfismo de restricción del mtDNA.....	33
1.1. Mapas de restricción de las especies del grupo <i>obscura</i> .....	33
1.2. Comparación de mapas de restricción.....	41
1.3. Variabilidad de las diferentes regiones funcionales del	

genoma mitocondrial según el análisis de restricción .....	44
1.4 Inferencia de relaciones filogenéticas .....	47
1.4.1. Árboles filogenéticos basados en matrices de distancia	48
1.4.2. Árboles filogenéticos basados en caracteres.....	51
1.4.3. Geometría estadística en el espacio de las distancias ....	58
2. Secuenciación del mtDNA de especies del grupo <i>obscura</i> .....	60
2.1 Clonación de los fragmentos de restricción homólogos.....	60
2.2. Secuenciación parcial del genoma mitocondrial de las especies del grupo <i>obscura</i> .....	62
3. Variabilidad en las distintas regiones funcionales del genoma mitocondrial de <i>Drosophila</i> .....	68
3.1 Variabilidad del gen del RNA ribosómico grande .....	89
3.2. Variabilidad de los genes codificantes de tRNAs.....	91
3.3. Variabilidad de los genes codificantes de proteínas.....	95
3.3.1. Variabilidad del gen citocromo b .....	95
3.3.2. Variabilidad del gen de la subunidad 1 de la NADH-deshidrogenasa.....	101
3.3.3. Variabilidad del gen de la subunidad 5 de la NDAH-deshidrogenasa.....	105
3.4. Variabilidad de las secuencias intergénicas .....	108
4. Patrones de divergencia nucleotídica en el genoma de las especies del grupo <i>obscura</i> .....	112
5. Inferencia de relaciones filogenéticas de las especies del grupo <i>obscura</i> basada en el polimorfismo de secuencias del mtDNA.....	116
5.1. Árboles filogenéticos basados en matrices de distancias.....	117
5.2. rboles filogenéticos basados caracteres .....	128
5.3. Árboles filogenéticos basados en máxima verosimilitud .....	137
5.4. Métodos de los invariantes para la resolución de las relaciones entre linajes.....	138

5.5. Conversión de distancias en tiempo mediante máxima verosimilitud.....	146
<b>DISCUSION</b> .....	165
1. Patrones y procesos en la evolución del genoma mitocondrial de <i>Drosophila</i> .....	165
2. Filogenia mitocondrial del grupo <i>obscura</i> de <i>Drosophila</i> .....	169
3. Reconstrucción de la taxonomía del grupo <i>obscura</i> .....	182
4. Reconstrucción histórica de la evolución del grupo <i>obscura</i> .....	191
<b>CONCLUSIONES</b> .....	198
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	201

# Introducción





## 1. CARACTERÍSTICAS DEL DNA MITOCONDRIAL

El tema de la presente Tesis Doctoral se centra en la utilización de la información que proporciona la evolución del DNA mitocondrial para desentrañar las relaciones evolutivas de los organismos que lo portan, en este caso de las especies de *Drosophila* del grupo *obscura*. Como quiera que el conocimiento de las características del genoma mitocondrial ha permitido su aplicación a la resolución de problemas evolutivos, veamos muy brevemente las características generales del genoma mitocondrial en animales.

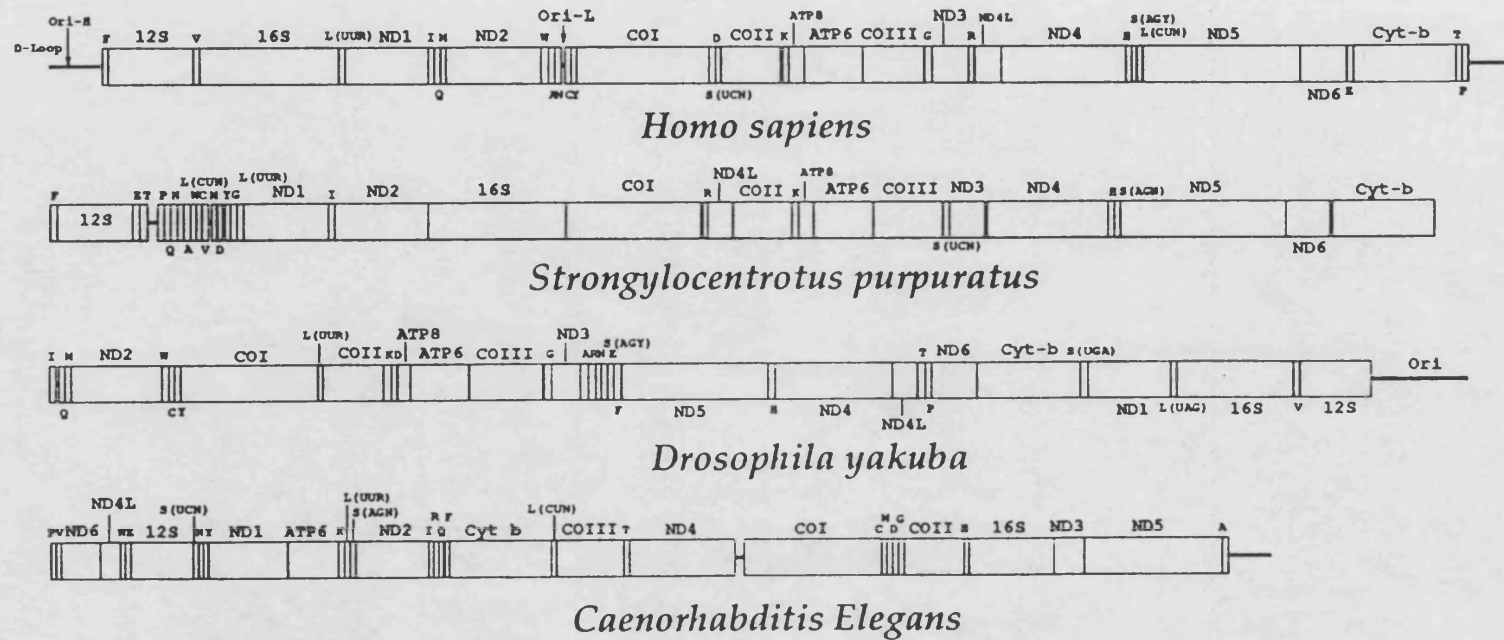
### 1.1. Estructura y función del DNA mitocondrial.

Las principales características del genoma mitocondrial de animales que han convertido a esta molécula en un marcador genético muy interesante en Genética evolutiva son: la herencia por vía materna y ausencia de recombinación. Sin embargo, es interesante conocer otras características, que pueden ser útiles para comprender la evolución de esta molécula.

El mtDNA de animales pluricelulares posee una estructura relativamente uniforme, no así en protozoos y plantas, donde se observa un alto grado de variabilidad en tamaño, estructura y contenido de genes. Actualmente se ha caracterizado el genoma mitocondrial de un cierto número de *phyla* animales, habiéndose obtenido la secuencia completa de varios representantes de ellos, principalmente de vertebrados y en concreto de mamíferos (Anderson et al., 1981 y 1982; Bibb et al., 1981; Cantatore et al., 1989; Clary y Wolstenholme, 1985a; DeBruijn, 1983; Gadaleta et al., 1989; Garesse, 1988; Jacobs et al., 1988; Okimoto et al., 1990; Roe et al., 1985; Valverde, 1992; Wolstenholme et al., 1987).

En los animales, el genoma mitocondrial está formado por una molécula de DNA de doble cadena, circular y covalentemente cerrada, que muestra, normalmente, una pequeña variación de tamaño (de 14.2 a 19.5 kb), y prácticamente ninguna en el contenido de genes (Figura 1), incluso entre *phyla* distantes (Brown, 1985, Moritz et al., 1987).

Hay cuatro características que definen la estructura del mtDNA de metazoos y que se han mantenido a lo largo de la evolución:



**Figura 1.** Organización física del DNA mitocondrial animal.

El mtDNA animal es una molécula circular. En la figura se presenta a escala la organización física de la molécula de mtDNA de humanos, erizo de mar, *Drosophila* y *Caenorhabditis*. Para clarificar la presentación las moléculas de mtDNA se presentan en forma lineal, interrumpidas arbitrariamente por el D-loop o la región rica en AT, y alineados por la izquierda para facilitar la comparación de sus longitudes. (De Valverde, 1992).

1) Disposición muy compacta de los genes, con ausencia, o presencia reducida, de secuencias intergénicas, e incluso con genes solapados.

2) Ausencia de intrones en los genes estructurales.

3) Situación de los genes de tRNA entre los restantes genes en una distribución dispersa.

4) Concentración de las secuencias reguladoras en una región, la región control (llamada región D-loop en vertebrados y región rica en A+T en artrópodos).

El contenido de genes es bastante constante, aunque la disposición de los genes difiere entre los grandes grupos animales. En todos los grupos, excepto nematodos, el genoma mitocondrial codifica para 13 proteínas: COI, COII y COIII del complejo citocromo oxidasa; cytb, apoenzima del complejo citocromo b-c1; ATPasa6 y ATPasa8, subunidades 6 y 8 de la fracción  $F_0$  del complejo ATP sintetasa mitocondrial (la subunidad 8 está ausente en el nematodo *Ascaris*, Wolstenholme et al., 1987); ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6, subunidades del complejo de la NADH deshidrogenasa. Además, codifica para dos RNA ribosómicos, el pequeño (srRNA) de 12s y el grande (lrRNA) de 16s. Los 22 tRNA mitocondriales, número menor que los que codifica el núcleo, difieren en su secuencia respecto a los nucleares, poseen un contenido en G+C menor y aparecen más pares de bases anormales (A:C y G:U), lo que hace que su estructura secundaria sea menos estable (Brown, 1985).

Una región de gran interés funcional es la región de control, llamada A+T en *Drosophila* (en artrópodos en general) por su riqueza en adenina y timina. Esta región posee el origen de replicación de una cadena y de transcripción del RNA y parece ser que desempeña un importante papel en la regulación de la replicación y de la expresión génica.

Otras características remarcables son sus especiales procesos de replicación, transcripción y traducción, desvelados únicamente en vertebrados. El mtDNA se replica autónomamente a lo largo de todo el ciclo celular de un modo regulado y coordinado con la expresión nuclear (Kruse et al., 1989). En vertebrados, la replicación se inicia independientemente en cada una de las cadenas complementarias y procede de forma continua, unidireccional, y asimétrica (Clayton, 1982; Attardi, 1985).

Existen tres unidades de transcripción, dos para la cadena pasada (H) y una para la cadena ligera (L). El primero de los dos orígenes de transcripción de la cadena H se encuentra en un promotor situado en una zona de la región control próxima al extremo 5' del srRNA, que termina un transcrito policistrónico que se extiende a lo largo de toda la cadena pesada. El segundo inicio de transcripción de la cadena H se encuentra 20 a 40 nucleótidos antes del gen tRNA<sup>Phe</sup> y da lugar a un transcrito que se extiende hasta el extremo 3' del gen lrRNA, terminando en el gen tRNA<sup>Leu</sup>. Por último, el origen de transcripción de la cadena L se sitúa también en la región control, y también da lugar a un transcrito policistrónico que abarca toda la cadena. Los RNAs policistrónicos son procesados por una enzima o enzimas desconocidas en mRNAs, tRNAs, rRNA y RNAs no estructurales que son degradados. Parece ser que la situación dispersa de los tRNAs entre los genes proteicos sirve de señal en el RNA policistrónico para el procesamiento de los mRNAs (Clayton, 1984).

El código genético difiere del universal en todos los grupos de animales, siendo distintos entre grupos. Hasta el momento se conocen 7 códigos distintos en animales: el de mamíferos (Anderson et al., 1981), el de *Xenopus laevis* (Roe et al., 1985), el del bacalao (Johansen et al., 1990), el de nematodos (Okimoto et al., 1990), el del erizo de mar *Strongylocentrotus* (Jacobs et al., 1988), el de la estrella de mar *Pisaster* (Smith et al., 1990), y el de *Drosophila* (DeBruijn, 1983). Sin embargo, si se excluyen las diferencias en los codones de inicio y parada, se puede hablar de un código general de vertebrados. La traducción se lleva a cabo por un menor número de tRNAs que los requeridos en los sistemas procarióticos y nucleares eucarióticos. No obstante, ninguno de los códigos difiere radicalmente del otro, lo que indica presumiblemente que los códigos mitocondriales son descendientes alterados del código universal, más que vestigios de un primitivo código ancestral (Attardi, 1985).

## 1.2. Variabilidad del DNA mitocondrial.

La variabilidad del mtDNA está determinada por la ocurrencia de tres tipos de cambios: el más importante son las sustituciones nucleotídicas, y en mucha menor medida las inserciones-deleciones, que producen variación de tamaño, y la reordenaciones génicas (inversiones y transposiciones).



En el inicio de los estudios del mtDNA se esperaba que esta molécula fuese altamente conservativa, por su uniformidad de tamaño y contenido génico, y por su papel clave en el metabolismo celular. Sin embargo, con el aumento de los conocimientos sobre el mtDNA se observó que la variabilidad es alta (Brown, 1985).

La sustitución nucleotídica es la proveedora más importante de variabilidad en el mtDNA. Aunque las sustituciones ocurren en toda la molécula (idéntica tasa de mutación), las tasas de sustitución difieren entre las distintas regiones en función de sus restricciones funcionales (diferente tasa de fijación de las mutaciones). Así, la región más variable es la región control y la más conservada la de los genes ribosómicos (Simon, 1991). En los genes proteínicos, las sustituciones sinónimas son mucho más frecuentes que las reemplazantes. Así, en mamíferos, las silenciosas suponen el 80-86% del total (Brown et al., 1982) y en *Drosophila* el 86% (Wolstenholme y Clary, 1985).

Otra observación interesante en las sustituciones nucleotídicas en el genoma mitocondrial es la mayor relación de transiciones frente a transversiones observada entre especies próximas (9:1 para mamíferos según Brown et al., 1982; 11:1 para *Drosophila* según DeSalle et al., 1987) que la que cabría esperar (1:2) y que se reduce, a medida que el tiempo de divergencia entre las especies aumenta, hasta 1:1 (ver también Liu y Beckenbach, 1992), debido a la acumulación de transversiones que oscurecen las transiciones previas (Simon, 1991).

Se ha señalado que la tasa de sustitución del genoma mitocondrial de mamíferos es 10 veces superior que la del genoma nuclear (Brown et al., 1982). Sin embargo, en *Drosophila* y erizos de mar es del mismo orden en los dos sistemas genéticos (Vawter y Brown, 1986; Powell et al., 1986). La controversia está en si la diferente relación tasa mitocondrial:tasa nuclear entre mamíferos e invertebrados es debida a diferencias en las tasas mitocondriales o en las nucleares. Parece ser que se debe a que la tasa de sustitución del genoma nuclear de invertebrados es mayor que la de vertebrados (Vawter y Brown, 1987; Sharp y Li, 1989; Moriyama y Gojobori, 1992).

Otro fenómeno proveedor de variabilidad son las inserciones-delecciones. Sin embargo, la frecuencia de estos sucesos es cinco veces menor que la de las sustituciones. Estos fenómenos se dan principalmente en las pequeñas secuencias intergénicas y en la región control (Moritz et al., 1987). Es en la región control donde las inserciones-delecciones tienen mayor importancia y están constituidas por unidades repetidas en tandem, lo que da lugar a variaciones importantes de tamaño interespecíficas (Solignac et al., 1986b, Monforte et al., 1991 y 1992) e intraespecíficas, llamadas homoplasias (por ejemplo, ver Rand y Harrison, 1989).

El último tipo de proveedores de variabilidad son las reorganizaciones del genoma; éste es un fenómeno rarísimo (de 100 a 1000 veces menor que los demás tipos) que sólo se ha observado al comparar la distribución de los genes entre los *phyla* animales (Brown, 1985), tal y como puede observarse en la Figura 1.

Una vez conocidas las características del genoma mitocondrial, debemos ver como podemos determinar su variabilidad y qué información nos puede proporcionar que permitan resolver cuestiones referentes a la evolución del organismo portador del mtDNA.

## **2. EL DNA MITOCONDRIAL COMO MARCADOR EVOLUTIVO**

El interés de nuestro estudio estriba en el uso del mtDNA como marcador de los fenómenos evolutivos de las poblaciones de organismos portadores de estas moléculas. Lo primero que nos podemos cuestionar es la utilidad del mtDNA frente a otros sistemas moleculares. El mtDNA parece no sufrir muchas de las complejidades que hacen difíciles de interpretar los datos obtenidos con sistemas nucleares. Entre las ventajas de su utilización cabe destacar: la facilidad de extracción y manipulación, la simplicidad de la molécula (pequeño tamaño, carencia de intrones, etc.), la ausencia de recombinación, la herencia materna, y la alta tasa de sustitución nucleotídica (Avice, 1986; Brown, 1985; Moritz et al., 1987; Simon, 1991). Todo ello hace que el mtDNA no sea un sistema genético más para estudios evolutivos, tal como expresa J.C. Avice (1986): "desde una perspectiva de la Biología de Poblaciones, es una molécula altamente instructiva (informativa), cuya transmisión lineal (materna) a través de las generaciones de animales, provee

un tipo de información simple, no obtenible de cualquier sistema genético nuclear". Veamos, pues, la utilidad de esta molécula para obtener información sobre procesos evolutivos:

### **2.1. Fenómenos de evolución revelados con el estudio del mtDNA**

Mediante la secuenciación, hoy facilitada por las técnicas de amplificación rápida del DNA (PCR), se llega hasta la total caracterización de las bases moleculares de la variabilidad del mtDNA. Sin embargo, para estudios de evolución molecular a nivel poblacional es preciso utilizar métodos más simples y más rápidos, como son: el análisis de los perfiles de los fragmentos de restricción (comparación de los fragmentos obtenidos al digerir el DNA con enzimas de restricción) o el análisis de los mapas de restricción (mediante simples y dobles digestiones del DNA con enzimas de restricción se puede conocer la posición relativa de los sitios de restricción en el DNA; si además se posee un punto de referencia orientado en el DNA se puede conocer la posición absoluta).

Ambos métodos (secuenciación y restricción) permiten obtener estimas cuantitativas de la divergencia de la secuencia nucleotídica entre los mtDNA comparados. En el caso de restricción, mediante estimas máximo verosímiles a partir de los sitios de restricción compartidos entre los mtDNA comparados (Nei, 1987).

Los altos niveles de polimorfismo mitocondrial permiten reconstruir relaciones evolutivas tanto entre poblaciones como entre especies, proporcionando nuevas perspectivas en la resolución de cuestiones como estructura poblacional, flujo génico, hibridación, patrones de distribución biogeográfica, y determinación de las relaciones filogenéticas. Ya que el mtDNA es heredado maternalmente, las relaciones obtenidas representarán estimas de la relación matrilineal.

#### **2.1.1. Obtención de Filogenias moleculares**

Una de las aplicaciones es la obtención de filogenias matrilineales a partir de la estima del polimorfismo mitocondrial entre especies muy

relacionadas. El amplísimo número de estudios que han utilizado el mtDNA en la inferencia de relaciones filogenéticas, que en numerosas ocasiones han permitido resolver filogenias que otras aproximaciones no pudieron, ha sido motivo de diversas revisiones (Awise, 1986; Birley y Croft, 1986; Wilson et al., 1985).

Desde finales de los setenta y durante la década de los ochenta, los estudios filogenéticos basados en el mtDNA se realizaron a partir de datos de mapas de restricción. La utilización de secuencias del mtDNA para la obtención de filogenias fue mucho menos frecuente hasta el desarrollo de las técnicas de amplificación rápida de DNA (PCR, Mullis et al., 1986), desde entonces, su aplicación a la obtención de filogenias se ha disparado (Koller et al., 1989; Simon et al., 1991).

La utilización de secuencias del mtDNA en la resolución de relaciones filogenéticas, por otra parte, ha permitido determinar la dinámica evolutiva del genoma mitocondrial y sus implicaciones en su utilización con fines filogenéticos. De este modo, los efectos que sobre las reconstrucciones filogenéticas pueden tener la variación de las tasas de sustitución en y entre taxones, las constricciones estructurales y funcionales, la saturación por sustituciones múltiples, el sesgo en la composición nucleotídica, los patrones alterados de sustitución nucleotídica, retención del polimorfismo ancestral, etc., han pasado a ser de gran importancia para determinar la fiabilidad de las reconstrucciones filogenéticas, y han demostrado que la utilización del mtDNA como marcador filogenético no es una panacea y se debe considerar con precaución (Moritz et al., 1987; Simon, 1991).

### **2.1.2. Aplicación a la Genética de Poblaciones.**

La otra área donde la utilización del mtDNA como marcador ha sido más fructífera, ha sido la Genética de Poblaciones. La sencillez para la determinación del polimorfismo mitocondrial en gran número de individuos mediante el análisis de restricción ha permitido resolver cuestiones relativas a estructura poblacional, diferenciación geográfica, colonizaciones, pautas migratorias, flujo génico, fenómenos de hibridación, etc. (revisado en Awise, 1986; Moritz et al., 1987; Awise, 1989; Awise, 1991).



El estudio de los niveles de polimorfismo mitocondrial y la obtención de filogenias intraespecíficas, han permitido determinar patrones de diferenciación geográfica (Avice, 1989), pautas de migración (Baker et al., 1990) y dispersión frecuentes (Niegel et al., 1991), o sucesos de disminución drástica del tamaño poblacional (cuellos de botella) acontecidos en la historia evolutiva de las especies. El ejemplo más controvertido sería el análisis de las relaciones evolutivas entre poblaciones humanas mediante el mtDNA, que llevó al grupo de A.C. Wilson, de la Universidad de California en Berkeley, a proponer las hipótesis del origen reciente del hombre moderno en Africa, conocida como Hipótesis de la Madre Eva (Brown, 1980; Cann et al., 1987, Vigilant et al., 1989; DiRenzo y Wilson, 1991).

El análisis de los patrones de restricción también ha sido útil para determinar el origen materno de híbridos naturales o de especies partenogénicas formadas por hibridación (Densmore et al., 1985; Spolsky y Uzzell, 1986), y revelar fenómenos de introgresión (transmisión de un linaje mitocondrial de una especie a otra a través de híbridos fértiles) como el descrito para especies de ratón (Ferris et al., 1983) o para las especies gemelas *Drosophila pseudoobscura* y *D. persimilis* (Powell, 1983), aunque ciertos casos de posible introgresión pueden ser explicados mediante el mantenimiento del polimorfismo ancestral en especies de reciente divergencia, como es el caso de las especies de *Drosophila* anteriores (Hale y Beckenbach, 1985; Latorre et al., 1988).

### **3. LAS ESPECIES DEL GRUPO *obscura* DE *Drosophila***

La primera especie conocida del grupo fue descrita por C.F. Fallèn en 1823, cuando realizaba un estudio de los Dípteros de Suecia. La principal característica diferencial respecto a otras *Drosophila* era la tonalidad oscura de su cuerpo. Hasta 1916 no se capturó una nueva especie relacionada. Fue Sturtevant quién, en un estudio de los Drosophilidos de Estados Unidos, describió *D. affinis*, primera especie neártica del grupo. Incidentalmente, Séguy (1938) describió un miembro del grupo *obscura* en Kenia. Tsacas (1974) demostró que esta especie, *D. microlabis*, pertenece claramente a este grupo, al recolectarla en las mismas condiciones y lugares que Séguy. Se trataba, por tanto, de la primera especie etiópica del grupo *obscura*.

Las especies del grupo *obscura* se distribuyen, principalmente, en la región templada Holártica, que clásicamente se divide en dos subregiones, la Neártica (Norteamérica y Centroamérica), y la Paleártica (Europa, Asia no tropical y norte de Africa). Algunas especies del grupo se distribuyen en zonas limitadas de los macizos montañosos orientales de la región Etiópica, y otras han alcanzado zonas andinas de la región Neotropical (Sudamérica).

Actualmente, el grupo *obscura* está compuesto por 34 especies (ver Tabla 1), divididas en cuatro subgrupos, el *affinis* con 10 especies descritas (1 paleártica y 9 neárticas), el *obscura* con 14 especies (todas ellas paleárticas), el *pseudoobscura* con 6 especies (todas neárticas) y el *microlabis* con cuatro especies etiópicas (parece ser que hay algunas más recientemente descritas).

La distribución de las especies del subgrupo *pseudoobscura* abarca la costa del Pacífico, desde la Columbia Británica (Canadá) hasta Guatemala, y hacia el interior hasta las Montañas Rocosas (Dobzhansky y Powell, 1975). *D. pseudoobscura* también se ha localizado en áreas reducidas y aisladas del norte de los Andes, en Colombia. Estas últimas poblaciones han sido incluidas en una subespecie, *D. pseudoobscura bogotana* (Ayala y Dobzhansky, 1974). *D. pseudoobscura* es la especie con mayor rango de distribución, ocupando toda el área señalada. En cambio, *D. persimilis* y *D. miranda* están restringidas, principalmente, a la costa del Pacífico de los Estados Unidos. El resto de especies del subgrupo son endémicas y raras, restringidas a áreas reducidas de México (*D. frolovae* y *D. cuauhtemoci*) o de las Montañas Rocosas (*D. lowei*).

El subgrupo *affinis* ocupa la totalidad del subcontinente neártico, desde Alaska a México, llegando una de las especies (*D. tolteca*) hasta Bolivia, lo que indica un mayor éxito evolutivo en esta región, que las especies del subgrupo *pseudoobscura*. *D. helvetica*, especie paleártica clásicamente considerada del subgrupo *affinis* pero de dudosa filiación, tiene uno de los rangos de distribución más amplios, toda la región paleártica, desde Irlanda hasta Japón.

En las especies neárticas de este subgrupo se observa un patrón de distribución en el que hay tres especies occidentales, *D. azteca*, *D. tolteca* y *D. dobzhanskii*, cinco orientales, *D. affinis*, *D. algonquin*, *D. narragansett*,

## Tabla 1. Relación de especies del grupo *obscura*.

Género: *Drosophila* Subgénero: *Sophophora* Grupo: *obscura*.

### Subgrupo *affinis*:

Especies paleárticas:

*D. helvetica* Burla, 1948.

Especies neárticas:

*D. affinis* Sturtevant, 1916.

*D. algonquin* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.

*D. athabasca* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.

*D. azteca* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.

*D. dobzhanskii* Patterson, 1943.

*D. narragansett* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.

*D. novitskii* Sulerud et Miller, 1966.

*D. seminole* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.

*D. tolteca* Patterson et Mainland. 1944.

### Subgrupo *microlabis*:

Especies etiópicas:

*D. cariouae* Tsacas et al., 1985.

*D. kitumensis* Tsacas et al., 1985.

*D. kimbasi* Tsacas et al., 1985.

*D. microlabis* (Séguy), 1938.

### Subgrupo *obscura*:

Especies paleárticas:

*D. alpina* Burla, 1948.

*D. ambigua* Pomini, 1940.

*D. bifasciata* Pomini, 1940.

*D. eniuae* Takada et al., 1979.

*D. epiobscura* Parshad et Duggal, 1966.

*D. eskoii* Lakovaara et Lankinen, 1974.

*D. guanche* Monclús, 1976.

*D. imaii* Moriwaki et al., 1967.

*D. madeirensis* Monclús, 1984.

*D. obscura* Fallèn, 1823.

*D. subobscura* Collin, 1936.

*D. subsilvestris* (Basden), 1954.

*D. tristis* (Fallèn), 1823.

*D. tsukubaensis* Takamori et Okada, 1983.

### Subgrupo *pseudoobscura*:

Especies neárticas:

*D. cuauhtemoci* Felix et al., 1976.

*D. frolovae* Wheeler, 1949.

*D. lowei* Heed et al., 1969.

*D. miranda* Dobzhansky, 1935.

*D. persimilis* Dobzhansky et Epling, 1944.

*D. pseudoobscura* Frolova et Astaurov, 1929.

*D. novitskii* y *D. seminole*, y una única especie, *D. athabasca*, distribuida en ambas zonas (Lakovaara y Saura, 1982). Las especies orientales ocupan el sudeste, el este y el medio-oeste de los Estados Unidos, hasta el Río Grande al suroeste de Texas. Dentro de este área se encuentran las especies citadas una sola vez, *D. seminole* (sur de Alabama) y *D. novitskii* (Colorado).

Las especies occidentales abarcan el área situada desde California, Nuevo México y Arizona hasta Guatemala, o sea al sur y al este del Río Grande, llegando *D. tolteca* al norte de Sudamérica, desde Colombia y Venezuela hasta Bolivia. Es la especie que alcanza una distribución más meridional, introduciéndose en la región neotropical (posiblemente colonizada después de la aparición del estrecho de Panamá en el Plioceno).

En cuanto a la especie central (*D. athabasca*), ésta se ha localizado desde Alaska hasta Nuevo México, y desde la costa norte del Pacífico hasta los Grandes Lagos, formando una distribución en triángulo con los vértices en los puntos señalados. Este área fue ocupada por *D. athabasca* durante la retirada de los masas de hielo de la última glaciación cuaternaria. Ello dio lugar a la aparición de tres razas etológicamente aisladas: noroccidental, oriental A y oriental B, distinguibles por sus características cromosómicas.

Las especies del subgrupo *obscura* son las que han alcanzado el éxito en la región paleártica, distribuyéndose por Eurasia y el norte de Africa, alcanzando desde las islas de la Macaronesia (Azores, Madeira y Canarias) hasta Japón. Entre ellas, hay especies ampliamente distribuidas, como *D. bifasciata* y *D. alpina* que se han localizado desde Europa occidental hasta el Japón, y *D. subobscura*, desde el Norte de Europa hasta las islas del Atlántico y el Norte de Africa. Hay también especies boreales, como *D. eskoi*, bóreo-alpinas, como *D. alpina*, así como especies endémicas de las islas de la Macaronesia, como *D. madeirensis* y *D. guanche*, endémicas de islas japonesas, como *D. imaii*, *D. eniwaie* y *D. tsukubaensis*, o de las zonas vecinas del Himalaya, *D. epiobscura*. Recientemente, una de ellas, *D. subobscura*, se ha introducido en Chile (Brncic et al., 1981), Argentina (Prevosti et al., 1983) y en la costa del Pacífico norteamericana, en este último caso junto a *D. ambigua* (Beckenbach y Prevosti, 1986).

Por último, las especies etiópicas del subgrupo microlabis (*D. microlabis*, *D. cariouae*, *D. kitumensis* y *D. kimbasi*) se localizan en zonas muy concretas del Africa oriental, en bosques caducifolios de los macizos montañosos del Monte Kenia y del "Kenya Rift Valley" (Cariou et al., 1988).

Varias especies americanas del grupo *obscura* (*D. pseudoobscura* y sus afines) han constituido modelos en Genética Evolutiva desde que Dobzhansky, en la primera mitad de este siglo, las utilizó en sus numerosos estudios (Dobzhansky y Powell, 1975), que tanto contribuyeron a la consolidación de la Teoría Sintética de la Evolución. Al otro lado del Atlántico, otra especie del grupo, *D. subobscura*, fue centro de atención de numerosos investigadores durante décadas, en especial por su rico polimorfismo cromosómico (Krimbas y Loukas, 1980).

Sin embargo, a pesar del amplio conocimiento que se posee sobre el grupo *obscura* (Lakovaara y Saura, 1982), las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo siguen siendo un punto controvertido.

Clásicamente, el grupo se dividió en dos subgrupos, *affinis* y *obscura*, en base a caracteres morfológicos (Sturtevant, 1942). Esta división fue confirmada, de nuevo, a nivel morfológico, cromosómico, de aislamiento reproductivo en una revisión sobre las especies del grupo (Buzzatii-Traverso y Scossiroli, 1955).

La proliferación, en los años sesenta y setenta, de técnicas de análisis del polimorfismo enzimático, también permitió su aplicación a la resolución de problemas filogenéticos (Hubby y Throckmorton, 1965; Hubby y Levontin, 1966; Ayala y Powell, 1972).

Las primeras aproximaciones a la resolución de la filogenia del grupo *obscura*, mediante el análisis del polimorfismo enzimático, provienen de la labor de Lakovaara y colaboradores (1972 y 1976), llegando a analizar en sucesivos trabajos hasta 22 taxones del grupo (Lakovaara y Keränen, 1980; Lakovaara y Saura, 1982). De sus resultados, así como de la revisión de los análisis basados en caracteres morfológicos, llegaron a la conclusión de que las especies americanas del subgrupo *obscura* estaban tan distantes de las del subgrupo *affinis*, como de las especies paleárticas del subgrupo *obscura*. Por tanto, propusieron la división del subgrupo *obscura* en dos, con la creación

del nuevo subgrupo *pseudoobscura* que incluyera las especies americanas. Además de esta importante aportación a la taxonomía del grupo, también observaron que en el nuevo subgrupo *obscura* se podían diferenciar tres linajes principales: el de *D. bifasciata*-*D. imaii*-*D. eskoi*, el de *D. subobscura*-*D. guanche*, y el formado por *D. subsilvestris*, *D. ambigua*, *D. tristis* y *D. obscura*. Finalmente, también observaron que *D. helvética* y *D. alpina* se sitúan muy alejadas de las especies de sus subgrupos (*affinis* y *obscura*, respectivamente), confirmando la ambigüedad de sus afinidades morfológicas (Burla, 1951).

Sin embargo, posteriores estudios del polimorfismo enzimático señalarían que la relación entre especies de los distintos subgrupos no quedaba clara. Así, Marinkovic et al. (1978) señalaron que la dicotomía entre especies paleárticas y neárticas no es clara. *D. subobscura* se les situaba más próxima a las especies del subgrupo *pseudoobscura*. En un posterior estudio, también del polimorfismo enzimático, Cabrera et al. (1983) señalaron que *D. ambigua* se situaba en una posición incierta entre las especies del subgrupo *pseudoobscura* y el trío *D. subobscura*-*D. madeirensis*-*D. guanche*. Estos últimos autores propusieron que el antiguo subgrupo *obscura* se podía haber originado a partir de distintos linajes, el que dio lugar a las especies neárticas (que Lakovaara y colaboradores consideran subgrupo *pseudoobscura*), y varios otros que dieron lugar a las distintas especies paleárticas del subgrupo.

Los trabajos más recientes de filogenias del grupo *obscura* a partir del análisis del polimorfismo enzimático (Pinsker y Buruga, 1982; Loukas et al., 1984) y a partir del análisis de las reordenaciones cromosómicas y la localización de los genes de histonas (Felger y Pinsker, 1987) parecen confirmar la filogenia obtenida por Lakovaara et al. (1976).

El último estudio filogenético del grupo *obscura* basado en el polimorfismo enzimático (Cariou et al., 1988), pretendía determinar las relaciones filogenéticas entre las especies paleárticas del grupo y las nuevas especies descubiertas en Africa (Tsacas et al., 1985). En él, se concluye que las especies africanas, para las que proponen la creación de un nuevo subgrupo, el *microlabis*, parecen estar próximas tanto al par *D. tristis*-*D. ambigua* como a *D. pseudoobscura*. Entre la multitud de árboles discrepantes que obtienen, lo que destaca es la heterogeneidad del subgrupo *obscura*, donde les aparecen tres linajes igual de distantes entre sí: el del trío *ambigua*-

*obscura-tristis*, el del trío subobscura-madeirensis-guanche y el de *D. bifasciata*. Pero lo que más les extraña, es la posición de *D. pseudoobscura*, que les aparece más próxima al primer trío.

Desde finales de los setenta y durante los ochenta, la utilización del análisis del polimorfismo de restricción del mtDNA con fines filogenéticos ha tenido una amplia difusión. También las relaciones filogenéticas del grupo *obscura* fueron objeto de análisis mediante estas técnicas. Así, Latorre et al. (1988) reafirmaron las conclusiones de Lakovaara y col. sobre la existencia de tres subgrupos, y señalaron la gran heterogeneidad existente entre las especies del subgrupo *obscura*. Posteriormente, González et al. (1990), utilizando también el polimorfismo de restricción del mtDNA, reafirman la existencia de distintos linajes entre las especies del subgrupo *obscura*.

También la técnica de hibridación de DNAs nucleares ha sido utilizada para la resolución de las relaciones del grupo *obscura* (Goddard et al., 1990), especialmente entre las especies americanas. En dicho estudio, además de las consideraciones sobre las tasas de evolución del genoma de distintos grupos de *Drosophila*, la filogenia que obtuvieron relaciona los dos subgrupos americanos (*affinis* y *pseudoobscura*) como un único linaje, y reafirma la heterogeneidad del subgrupo *obscura*, ya que sus dos únicos representantes, *ambigua* y *subobscura*, no se agrupan juntos.

La última aproximación conocida a la resolución de las relaciones filogenéticas entre especies del grupo *obscura* es la de Ruttkay et al. (1992), quienes, mediante el análisis de secuencias de parte de los genes lrRNA mitocondriales y nucleares, pretendían determinar las relaciones entre especies africanas del subgrupo *microlabis*, y las especies de los grupos *pseudoobscura* y *obscura*, a la vez que comparar las divergencias nucleares y mitocondriales. En la reconstrucción filogenética les aparecen cuatro linajes distintos: el del subgrupo *pseudoobscura*, el del subgrupo *microlabis*, el del par *subobscura-guanche*, y el del par *obscura-tristis*. Sin embargo, las relaciones entre los linajes que determinan, no les parecen congruentes con las de trabajos previos, ya que el par *pseudoobscura bogotana-persimilis* (curiosamente elevan al rango de especie a la subespecie *bogotana*) se les agrupa con el par *tristis-obscura*.

Como hemos podido ver, aún quedan bastantes lagunas en la determinación de las relaciones filogenéticas de las especies del grupo *obscura*.



## **Objetivos**

## OBJETIVOS

El objetivo fundamental del presente trabajo es resolver las relaciones filogenéticas de las especies de *Drosophila* del grupo *obscura* mediante el estudio de la evolución de su genoma mitocondrial. A su vez, la información obtenida permitirá profundizar en el conocimiento de la dinámica evolutiva del propio genoma mitocondrial.

Algunas de las cuestiones que se pretenden resolver son:

1. ¿La aplicación de técnicas de análisis de restricción y secuenciación del mtDNA permitirá la resolución de las incertidumbres existentes en las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura*?

2. ¿La filogenia mitocondrial reflejará realmente las relaciones evolutivas entre las especies del grupo *obscura*?

2. El alto contenido en Adenina y Timina, que caracteriza el genoma mitocondrial de *Drosophila*, ¿en qué medida afecta a la dinámica evolutiva de este sistema genético?

3. ¿Hay algún tipo de restricción evolutiva hacia un mantenimiento de la riqueza en A+T?

4. ¿Cómo puede afectar la dinámica evolutiva del mtDNA de *Drosophila* a las reconstrucciones filogenéticas?

5. ¿Evolucionan, tal como se ha postulado, con una tasa semejante el genoma nuclear y mitocondrial?

## **Material y Métodos**

## 1. ESPECIES Y CEPAS DE *Drosophila*.

A lo largo del presente trabajo se analizaron 25 cepas pertenecientes a 16 especies y una subespecie del grupo *obscura* de *Drosophila*. Todas las cepas fueron fundadas a partir de una única hembra grávida con la finalidad de obtener individuos portadores de un mismo mtDNA (isolíneas).

Las especies y cepas utilizadas fueron las siguientes:

### Subgrupo *affinis*:

- D. affinis*: se utilizaron dos cepas, la CL de Cristal Lake, Nebraska, proporcionada por el "National Drosophila Species Resource Center" (NDSRC) de Bowling Green, Ohio, y la LI de Lincoln, Nebraska, obtenida de la Universidad de Umeå (UU), Suecia.
- D. algonquin*: se utilizaron las cepas LI de Lincoln, Nebraska, y HF de Honeoye Falls, New York, ambas proporcionadas por el NDSRC.
- D. narragansett*: se analizaron las cepas IN de Indiana y BS de Bastrop State Park, Texas, la primera proporcionada por la UU y la segunda por el NDSRC.
- D. azteca*: se estudiaron cuatro cepas provenientes de Davis, California (DA); Chilpancingo, México (CH); Arizona (AR); y California (CA). Fueron proporcionadas, respectivamente, por la Dra. A. Latorre (Universidad de Valencia), el NDSRC, el Dr. L. Serra (Universidad de Barcelona), y la UU.
- D. tolteca*: se analizó una única cepa procedente de Coroico, Bolivia, y proporcionada por el NDSRC.

### Subgrupo *obscura*:

- D. subobscura*: se utilizaron los dos haplotipos mitocondriales (I y II) más abundantes en su área de distribución (Latorre et al.,

1986 y 1992). Las isolíneas analizadas provenían ambas de Zürich, Suiza (Latorre et al., 1992).

- D. madeirensis*: especie endémica de Madeira proporcionada por la Dra. M. Monclús de la Universidad de Barcelona.
- D. guanche*: especie endémica capturada en la isla de Tenerife, Canarias, proporcionada también por la Dra. Monclús.
- D. ambigua*, capturada por miembros de nuestro departamento en Ribarroja, Valencia.
- D. obscura*: procedente de Queralps, Gerona, y proporcionada por la Dra. Monclús.
- D. tristis*: procedente de Snery, Suiza, y proporcionada por la Dra. Monclús.
- D. subsilvestris*: origen incierto, proporcionada por la Dra. Monclús.
- D. bifasciata*: originaria de Akan-ko, Japón, y obtenida en el NDSRC.

Subgrupo *pseudoobscura*:

- D. pseudoobscura pseudoobscura*: se analizaron dos cepas la BC de Bryce Canyon, Utah, y la M de Zirahuén, México, ambas cedidas por el Dr. W.W. Anderson de la Universidad de Georgia en Athens, USA.
- D. ps. bogotana*: esta subespecie endémica del área de Bogotá, Colombia, fue obtenida en el NDSRC.
- D. persimilis*: cepa capturada por la Dra. A. Latorre en Davis, California.
- D. miranda*: esta cepa también fue capturada por la Dra. A. Latorre en Davis, California.

## **2. EXTRACCION DEL DNA MITOCONDRIAL DE *Drosophila*.**

La extracción del mtDNA de *Drosophila* fue realizada siguiendo el protocolo de Latorre et al. (1986), ampliado según Afonso et al. (1988), con ligeras modificaciones. Al ser una de las técnicas básicas en el presente

trabajo, y dado que las modificaciones no han sido descritas, vamos a describirla:

1. Se homogeneizan en un tubo "eppendorf" a 4°C unas 15 moscas de 2 a 3 días de edad en 0.32 ml de una disolución Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, Sacarosa al 5%, EDTA 10 mM a pH 7.8.

2. Al homogeneizado se le añaden 0.40 ml de una disolución Tris-HCl 300 mM, SDS 1.25%, Sacarosa 5%, EDTA 10 mM a pH 9.0 y se incuba la mezcla a 65°C durante 30 min. De este modo conseguimos lisar las membranas y liberar el contenido celular, a la vez se desnaturalizan los ácidos nucleicos, que en el caso del mtDNA las dos hebras quedarán retenidas por uniones topológicas al ser una molécula de doble cadena, circular, covalentemente cerrada y superenrollada. Además, se forman complejos de SDS-proteínas desnaturalizadas.

3. Se añaden, entonces, 0.12 ml de acetato potásico 3M a pH 4.8 y se incuba la mezcla durante 10 min. a -20°C. El descenso del pH provoca la renaturalización correcta y solubilización de los ácidos nucleicos de pequeño tamaño, incluido el mtDNA, y la renaturalización al azar y precipitación de los de gran tamaño, principalmente nuclear. El potasio acomplejará el SDS-proteínas, facilitando su precipitación.

4. Centrifugar durante 10 min. en una microcentrífuga a la máxima velocidad y recoger el sobrenadante. Se eliminan restos celulares, las proteínas y SDS, y el DNA nuclear.

5. Al sobrenadante se le añade idéntico volumen de isopropanol y se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min. De esta forma precipitamos los ác. nucleicos solubles, entre ellos el mtDNA.

6. Se centrifuga, de nuevo, durante 5 min. a la máxima velocidad y se desecha el sobrenadante. El precipitado contendrá el mtDNA parcialmente purificado.

7. Al precipitado se le añaden 0.5 ml de etanol al 70% y se vuelve a centrifugar durante 2 min.

8. Se elimina el etanol y se seca el precipitado durante unos minutos a temperatura ambiente, antes de resuspenderlo en 0.15 ml de TE pH 8.

9. Una vez resuspendido el precipitado se le añaden 0.30 ml de una disolución de SDS 0.1% a pH 12.5 ajustado con unas gotas de NaOH 10 N (¡No se debe sobrepasar nunca el valor de pH indicado!), y se incuba la mezcla a 65°C durante 6 min. Se vuelve a iniciar un nuevo proceso de purificación del mtDNA similar al descrito en los pasos anteriores.

10. Inmediatamente después, se le añaden 0.23 ml de acetato sódico 3M a pH 4.8 y se incuba la mezcla durante 15 min a -20°C.

11. Se centrifuga a la máxima velocidad durante 5 min a 4°C y se recoge el sobrenadante. Para evitar que el precipitado, que contiene SDS, proteínas y DNA nuclear desnaturalizado, no resuspenda, se recomienda mantener los tubos en hielo.

12. Al sobrenadante se le añade el mismo volumen de isopropanol y se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min.

13. Se centrifuga la mezcla durante 5 min y se elimina el sobrenadante.

14. Se lava el precipitado, que contiene el mtDNA, con 0.5 ml de etanol al 70% y se centrifuga durante 5 min más.

15. Se elimina el sobrenadante, se seca el precipitado al vacío a temperatura ambiente durante 10 min, y se suspende en unos 35  $\mu$ l de TE. La cantidad de mtDNA obtenida es suficiente para realizar 4 digestiones en un volumen final de 10  $\mu$ l cada una. Para eliminar el RNA contaminante se debe incluir RNasa en la digestión.



El mtDNA extraído es lo suficientemente puro como para observar sus patrones de restricción en geles de agarosa (Figura 2), e incluso, para ser clonado directamente.

### 3. DIGESTION DEL DNA MITOCONDRIAL Y OBTENCION DE LOS MAPAS DE RESTRICCION.

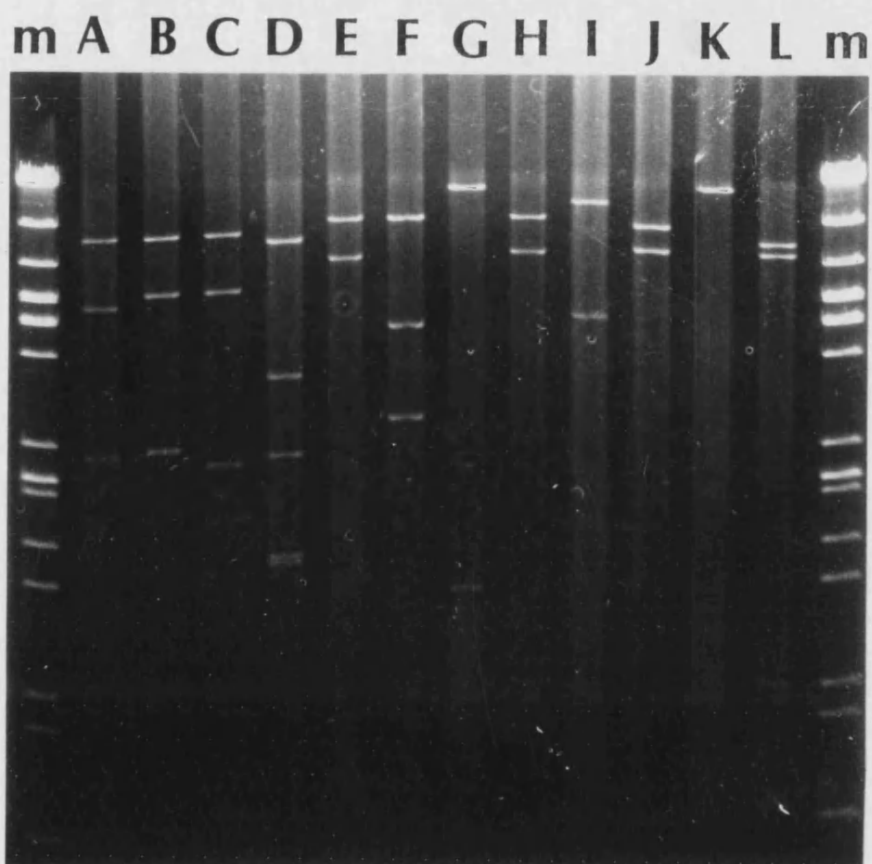
El mtDNA fue digerido con las siguientes endonucleasas de Boehringer Mannheim: restrictasas con dianas de 6 pb, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Hpa*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sca*I, *Xba*I, *Xho*I; restrictasas con dianas de 4 pb, *Hae*III, *Hpa*I, *Mvn*I-*Tha*I.

Los fragmentos de restricción se separaron en geles de agarosa del 0,8 al 1,2% en tampón TBE 0.5x (Sambrook et al., 1989). Como marcadores de tamaño se utilizaron los fragmentos de restricción del DNA de fago lambda digerido con *Hind*III y doblemente digerido con *Hind*III y *Eco*RI. Esporádicamente, y dependiendo de los tamaños a estimar, se utilizó el marcador VI de Boehringer M. (pBR328/*Bgl*I + pBR328/*Hin*FI).

Para la obtención de los mapas de restricción se siguió el método de las dobles digestiones, que consiste en deducir la posición relativa de los sitios de restricción a partir de los resultados obtenidos al digerir el DNA con una única enzima y con combinaciones de dos (Sambrook et al., 1989).

La correspondencia entre los mapas de restricción y el mapa génico se obtuvo por comparación de nuestros mapas y los de las especies del subgrupo *melanogaster* (Solignac et al., 1986a), verificada determinando la homología entre fragmentos de restricción transfiriéndolos a filtros de "nylon" mediante la técnica de "Southern" (Sambrook et al., 1989), e hibridándolos, posteriormente, con sondas de mtDNA correspondientes a diferentes clones de la especie del subgrupo *melanogaster D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985) marcadas con digoxigenina según el protocolo del "DIG DNA labeling kit" de Boehringer M. (ref. 1093657).





**Figura 2.** Electroforesis en geles de agarosa de fragmentos de restricción del mtDNA de 4 especies del grupo *obscura*, representantes de los distintos subgrupos, extraído mediante el método de Latorre et al. (1986), con las modificaciones reseñadas en el apartado 2 de Material y Métodos. El mtDNA de *D. azteca* (subgrupo *affinis*) fue digerido con *Hind*III (A), *Xba*I (E) y *Sca*I (I). El mtDNA de *D. ambigua* (subgrupo *obscura*) fue también digerido con *Hind*III (B), *Xba*I (F) y *Sca*I (J). El de *D. subobscura* (subgrupo *obscura*) digerido con *Hind*III (C), *Xba*I (G) y *Sca*I (K). Y el de *D. pseudoobscura* M, con *Hind*III, *Xba*I (E) y *Sca*I (I). Como marcadores de tamaños (m) se utilizó una mezcla de los fragmentos de restricción del DNA del fago lambda obtenidos por digestión simple con *Eco*RI y por digestión doble con *Eco*RI y *Hind*III.

#### 4. CLONACION DEL mtDNA.

El mtDNA, obtenido según el protocolo descrito anteriormente, era suficientemente puro como para clonarlo. Para ello seguimos dos aproximaciones, la primera corresponde a la captura al azar de los fragmentos de restricción del mtDNA en un vector apropiado (técnica del "shot gun" traducido en la literatura en castellano como "perdigonada"). Para ello, el mtDNA de las distintas especies fue digerido con *EcoRI*. El vector de clonación, el plásmido pUC19, fue digerido a su vez con *EcoRI* y desfosforilado con la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer M.). Una vez eliminadas las enzimas por fenolización y comprobada la eficiencia de la desfosforilación (Sambrook et al., 1989) se llevó a cabo la ligación con ligasa de T4 (Boehringer M.). La incubación se realizó a 19°C durante 16 a 18 h.

Células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* obtenidas por el método del CaCl<sub>2</sub> y con una frecuencia de transformación de 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> transformantes por ug de plásmido, fueron transformadas con la mezcla de ligación (Sambrook et al., 1989). Los transformantes fueron seleccionados en placas de LB con ampicilina, y las colonias blancas portadoras del plásmido y el inserto, amplificadas en medio líquido.

Los plásmidos recombinantes fueron extraídos mediante la técnica de lisis alcalina de Birnboim y Doly (Sambrook et al., 1989) y caracterizados mediante restricción para determinar si los insertos correspondían a fragmentos de mtDNA.

La segunda aproximación fue la clonación directa de aquellos fragmentos de restricción que no se pudieron clonar por el anterior método. El mtDNA fue digerido con *EcoRI* y los fragmentos resultantes separados mediante electroforesis en geles de agarosa del 0,8-1,2% de agarosa de bajo punto de fusión (Boehringer M.). Las bandas correspondientes a los fragmentos de interés se cortaron del gel y se fundieron a 65°C. Directamente se utilizó el mtDNA en la agarosa fundida para la ligación con

pUC19 digerido con *EcoRI* y desfosforilado. La metodología empleada a partir de este punto fue coincidente con la de la clonación al azar.

## 5. SECUENCIACION DEL mtDNA.

Aquellos clones de interés que contenían regiones homólogas en todas las especies de *Drosophila* analizadas fueron secuenciados.

La secuenciación se realizó mediante el método de Sanger de terminación por didesoxinucleótidos modificado para la secuenciación directa de DNA plasmídico desnaturalizado (Mierendorf y Pfeffer, 1987). Para ello se utilizó la T7 DNA polimerasa ("T7 sequencing kit" de Pharmacia LKB ref. 27-1682-01) y para el marcaje radiactivo ( $\alpha$ -<sup>35</sup>S)dATP $\alpha$ S (Amersham).

En la reacción se emplearon los siguientes oligonucleótidos sintéticos como iniciadores:

1) el oligonucleótido universal d5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' ("universal primer" de Pharmacia).

2) el oligonucleótido reverso d5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' ("M13/pUC reverse primer" de Boehringer M.).

3) el oligonucleótido d5'-AAGGGGGATGTGCTGCA-3', iniciador sintético (Durviz S.A.) diseñado a -63 nucleótidos del sitio *EcoRI* del pUC19. Este iniciador se diseñó con la finalidad de obtener la misma información que con el oligonucleótido reverso, independientemente de la orientación en la que haya insertado el fragmento *EcoRI*.

4) el oligonucleótido nº1 de 32 nucleótidos 5'-AATAAAGCATGAGTTAATAAATGAA-ATATAGC-3' (MedProbe, Noruega), correspondiente a las posiciones 7235 a 7266 de la secuencia de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985), y diseñado a partir de las secuencias

de varias especies de *Drosophila* siguiendo las recomendaciones de Barnes (1987). Este nucleótido y los siguientes se sintetizaron para secuenciar regiones adyacentes a dianas de restricción perdidas en algunas especies, como veremos en el apartado de Resultados (Figura 10).

5) el oligonucleótido nº2 18-mer 5'-CTGGTCGAGCTCCAATTC-3' (Durviz S.A.), correspondiente a las posiciones 11544 a 11526 de la secuencia de *D. yakuba*, diseñado siguiendo las mismas normas y con la misma finalidad que el anterior.

6) el oligonucleótido nº3 de 35 nucleótidos 5'-CGATCAATTCCTAATAAATTAGGAGGAGTAATTGC-3' (Durviz S.A.), correspondiente a las posiciones 11361 a 11395 de la secuencia de *D. yakuba*, diseñado al igual que los anteriores.

Las muestras de secuenciación se corrieron en geles de poliacrilamida al 6 o al 8% en gradiente de espesor de 0.2-0.4 mm ó 0.1-0.4 mm, en presencia de urea 8M como agente desnaturizante y tampón TBE 1x. Los geles se corrieron en cubetas Macrophor (Pharmacia LKB) durante 2-4 h (según concentración) a 2500 V para carreras cortas y 7 h a 2500 V (6% de acrilamida) o 16 h a 1800 V (8% de acrilamida) para carreras largas.

## 6. ANALISIS DE SECUENCIAS Y METODOS FILOGENETICOS.

Para la manipulación de secuencias y el análisis filogenético se ha dispuesto del material informático del "Servicio de Bioinformática" y del Departamento de Genética de la Universitat de València.

El material disponible consta del siguiente "hardware": microordenadores Olivetti M380/C, Olivetti M380XP3 y miniordenador VAX.

En cuanto al "software" utilizado se ha dispuesto de una serie de programas comerciales de análisis de secuencias, como el GCG (Universidad de Winsconsin), DNASTAR (DNASStar Inc.) y PCGENE (Intelligenetics-

Biomed, Universidad de Ginebra, Suiza), y de programas "non-profit" de alineamiento de secuencias como el CLUSTAL V (Higgins y Sharp, 1988) y de análisis filogenético como el PHYLIP v. 3.41 (Felsenstein, 1990) y el PAUP v. 2.4 (Swofford, 1985). Los diferentes métodos filogenéticos utilizados serán mencionados en los apartados correspondientes de resultados.

Además se han utilizado otros programas desarrollados en el Servicio de Bioinformática:

**PHYPHYLI:** Permite la transformación entre formatos de ficheros de secuencias alineadas.

**PANA:** Facilita el alineamiento de secuencias nucleotídicas respetando la pauta de lectura.

**DISTANCE:** Calcula los estimadores de distancias genéticas de Jukes y Cantor (1969), de Kimura de dos, tres, cuatro y seis parámetros (ver Gojobori et al., 1990). Además facilita el número de transiciones-transversiones y de todos los tipos de sustituciones nucleotídicas entre secuencias.

**GEOESTD:** Determina los parámetros de arboricidad según el método de Geometría Estadística en el espacio de las distancias de Eigen (Winkler-Oswatitsch et al., 1986, ver también Maynard-Smith, 1989).

## **Resultados**

## 1. ANALISIS FILOGENETICO BASADO EN EL POLIMORFISMO DE RESTRICCIÓN DEL mtDNA.

### 1.1. Mapas de restricción de las especies del grupo *obscura*

En una primera aproximación a la resolución de las relaciones filogenéticas entre las especies de *Drosophila* del grupo *obscura* se determinaron los mapas de restricción de 21 de las 25 cepas reseñadas en el apartado de Material y Métodos. Estas cepas corresponden a 13 especies y 1 subespecie, representantes de los tres subgrupos holárticos (Tabla 2).

Las 21 cepas presentaban un total de 16 haplotipos mitocondriales, identificados con números romanos en la Tabla 2. Cada uno de los taxones presentaba un haplotipo o patrón conjunto de restricción específico, excepto *D. ps. pseudoobscura* y *D. algonquin* en los que cada cepa poseía un haplotipo propio. El resto de especies representadas por más de una cepa mostraron un único haplotipo. En el caso de *D. subobscura*, en la que estudios previos habían caracterizado su variabilidad mitocondrial intraespecífica (Latorre et al., 1986 y 1992; Afonso et al., 1990; Rozas et al., 1990), se seleccionó para el análisis el haplotipo más común (el I según la nomenclatura de Latorre et al., 1986).

En la Figura 3 se representan los mapas de restricción de los 16 haplotipos linealizados en el sitio *MvnI-ThaI* universal presente en todos los genes srRNA (Noller, 1984). Este mismo sitio de referencia, localizado en la posición 14754 de la secuencia de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985a), fué utilizado también por Solignac et al. (1986a) en el estudio del subgrupo *melanogaster*.

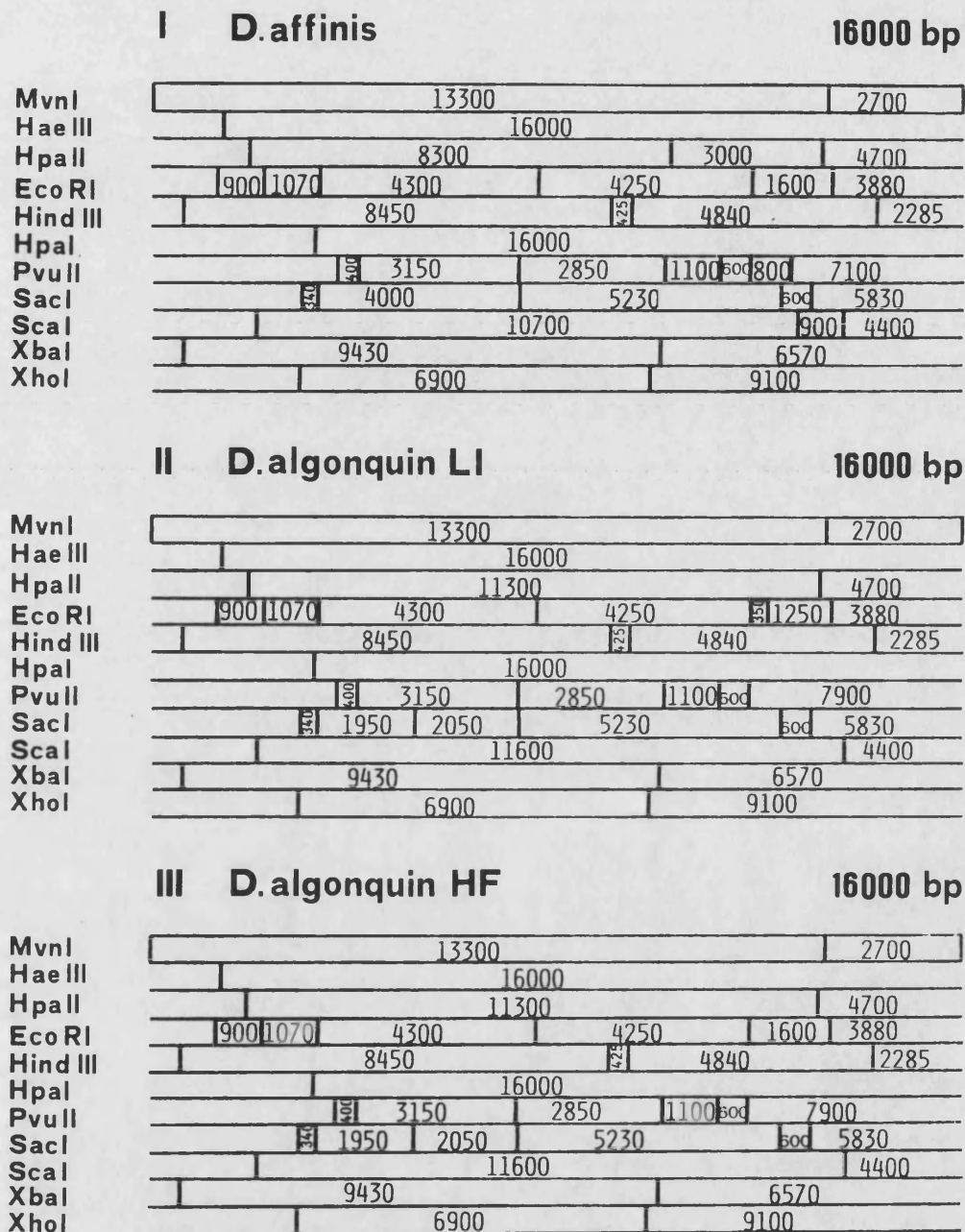
El número de sitios de restricción por haplotipo observado con las 13 endonucleasas de restricción osciló entre los 28 de *D. subobscura* y los 40 de *D. obscura*. Las enzimas con dianas de 4 pb proporcionaron un total de 5 a 14 sitios de restricción, y las de 6 pb, de 20 a 31 sitios por haplotipo. Considerando el promedio de sitios de 4 y 6 pb, las 13 restrictasas muestrearon un total de 184 nucleótidos por haplotipo, lo que representa el 1,15% del genoma mitocondrial de cada especie.

**Tabla 2.** Origen geográfico de las 21 cepas de *Drosophila* analizadas por restricción, y su haplotipo mitocondrial correspondiente.

Nº Cepa	Localidad	Laboratorio	Haplotipo
Subgrupo <i>affinis</i> :			
1 <i>D. affinis</i>	Cristal Lake, Nebraska	Bowling Green	I
2	Lincoln, Nebraska	Umeå	I
3 <i>D. algonquin</i> LI	Lincoln, Nebraska	Bowling Green	II
4 HF	Honeoye Falls, New York	Bowling Green	III
5 <i>D. narragansett</i>	Indiana	Umeå	IV
6	Bastrop State Park Texas	Bowling Green	IV
7 <i>D. azteca</i>	Davis, California	Dr. Latorre <sup>1</sup>	V
8	Chilpancingo, Mexico	Bowling Green	V
9	Arizona	Umeå	V
10	California	Dr. Serra <sup>2</sup>	V
11 <i>D. tolteca</i>	Coroico, Bolivia	Bowling Green	VI
Subgrupo <i>obscura</i> :			
12 <i>D. subobscura</i>	Helsinki, Finland	Bowling Green	VII
13 <i>D. guanche</i>	Tenerife, Canary Islands	Bowling Green	VIII
14 <i>D. ambigua</i>	Ribarroja, Spain	Dr. Latorre	IX
15 <i>D. obscura</i>	Queralps, Spain	Dr. Monclús <sup>2</sup>	X
16 <i>D. bifasciata</i>	Akan-Ko, Japan	Bowling Green	XI
Subgrupo <i>pseudoobscura</i> :			
17 <i>D. ps. pseudoobscura</i> M	Zirahuén, México	Dr. Anderson <sup>3</sup>	XII
18 BC	Bryce Canyon, Utah	Dr. Anderson	XIII
19 <i>D. ps. bogotana</i>	Bogotá, Colombia	Bowling Green	XIV
20 <i>D. persimilis</i>	Davis, California	Dr. Latorre	XV
21 <i>D. miranda</i>	Davis, California	Dr. Latorre	XVI

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidad de Valencia. <sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidad de Barcelona. <sup>3</sup>Departamento de Genética, Universidad de Georgia, Athens, EE.UU.





**Figura 3.** Mapas de restricción de los 16 haplotipos mitocondriales determinados entre las especies del grupo *obscura* analizadas. El genoma, circular, ha sido representado linealmente a partir del sitio *MvnI-ThaI*, común a todos los haplotipos. Los tamaños de los fragmentos vienen dados en pares de bases (bp). Algunos de los tamaños fueron calculados teniendo en cuenta los sitios homólogos determinados en las secuencias del mtDNA de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985a) y *D. melanogaster* (DeBruijn, 1983; Garesse, 1988).

#### IV D. azteca

16000 bp

MvnI	13300				2700
HaeIII	16000				
HpaII	11300				4700
EcoRI	900	5370	4250	1600	3880
HindIII	8450		4840	2285	
HpaI	16000				
PvuII	3550		3950	800	7900
SacI	350	4000	5230	800	5830
Scal	11600				4400
XbaI	9430		6570		
XhoI	16000				

#### V D. narragansett

16000 bp

MvnI	13300				2700
HaeIII	16000				
HpaII	3900	7400		4700	
EcoRI	900	1070	4300	4250	1600 3880
HindIII	8450		4840	2285	
HpaI	8600		7400		
PvuII	400	3150	2850	1700	800 7100
SacI	350	1950	2050	5230	800 5830
Scal	11600				1800 3600
XbaI	9430		6570		
XhoI	6900		9100		

#### VI D. tolteca

15900 bp

MvnI	13300				2600
HaeIII	2500	13400			
HpaII	10000				5900
EcoRI	900	1070	4300	5850	3780
HindIII	8450		4840	2185	
HpaI	4800		6100		5000
PvuII	400	3150	3950	800	7800
SacI	350	1950	2050	5230	800 5730
Scal	15900				
XbaI	9430		6470		
XhoI	15900				

### VII *D. subobscura*

15800 bp

MvnI	13300				2500
Hae III	6000		9800		
Hpa II	3900	4400	800	6700	
Bam HI	15800				
Eco RI	900	1070	4300	9530	
Hind III	8450			5265	2085
Hpa I	8400		7400		
Pst I	5300		10500		
Pvu II	15800				
Sac I	350	4000	5230	6230	
Scal	15800				
Xba I	14530				

### VIII *D. guanche*

15800 bp

MvnI	13300				2500
Hae III	15800				
Hpa II	5100	550	5300	4650	
Eco RI	900	1070	4300	9530	
Hind III	6950		6765		2085
Hpa I	3300	1500	11000		
Pvu II	6000		9800		
Sac I	2290	2050	2380	2850	6230
Scal	8900			6900	
Xba I	14530				

### IX *D. ambigua*

16050 bp

MvnI	12000				1300	2750
HaeIII	9300			6750		
HpaII	8200		1000	6850		
EcoRI	900	5370	3650	2200	3930	
HindIII	8450			5265	2335	
HpaI	7150	7450		1450		
PvuII	3150		2850	1100	8950	
SacI	4340		5230	6480		
Scal	8900			7150		
XbaI	9430			4300	2320	
XhoI	16050					

### X *D. obscura*

16100 bp

MvnI	13300				900	1900
HaeIII	4450	4350	1850	5150		
HpaII	4500	1200	3400	1050	650	5300
EcoRI	900	5370	5850	3980		
HindIII	6200		2250	5265	2385	
HpaI	7200	1500	6450	950		
PvuII	3150		2850	1100	9000	
SacI	4340		5230	6530		
Scal	1200	6400	1300	7200		
XbaI	9430			5100	1570	

### XI *D. bifasciata*

16500 bp

MvnI	2900	10400			3200	
HaeIII	4800		2450	2600	1800	4850
HpaII	4500		2600	3900		5500
EcoRI	900	1070	4300	5850	4380	
HindIII	6950		1500	5265	2785	
HpaI	4500		12000			
PvuII	11150		2850	2500		
SacI	4340		2380	2850	600	6330
Scal	8000			900	7600	
XbaI	9430			950	6120	

## XII *D. p. pseudoobscura* M

16200 bp

Mvnl	13300				2900
Hae III	1800	1000	13400		
Hpa II	4400		800	4300	1800 4900
Eco RI	900	1070	4150	150	9930
Hind III	2200	3200	1550	1500	7750
Hpa I	16200				
Pvu II	12500		2850	850	
Sac I	10370		2380	2850	800
Sal I	8000			900	7300
Xba I	9430			6770	
Xho I	16200				

## XIII *D. p. pseudoobscura* BC

16200 bp

Mvnl	13300				2900
Hae III	2800	13400			
Hpa II	4400		800	4300	1600+200 4900
Eco RI	1970	4150	150	9930	
Hind III	2200	3200	1550	1500	7750
Hpa I	16200				
Pvu II	12500		2850	850	
Sac I	10370		2380	2850	800
Sal I	8900			7300	
Xba I	9430			6770	
Xho I	16200				

## XIV *D. p. bogotana*

16200 bp

Mvnl	13300				2900
Hae III	2800	1800	11600		
Hpa II	4100 + 300		800	4300	1800 4900
Eco RI	900	1070	4150	150	9930
Hind III	2200	3200	1550	1500	7750
Hpa I	16200				
Pvu II	12500		2850	850	
Sac I	10370		2380	2850	800
Sal I	8000			900	7300
Xba I	9430			6770	
Xho I	16200				

**XV D. persimilis**

**16200 bp**

Mvnl	13300				2900
Hae III	2800	13400			
Hpa II	5200		4300	1800	4900
Eco RI	900	1070	4150	9930	
Hind III	2200	3200	1550	1500	7750
Hpa I	16200				
Pvu II	12500		2850	850	
Sac I	10370		2380	2850	600
Sal I	8000			900	7300
Xba I	9430			6770	
Xho I	16200				

**XVI D. miranda**

**16100 bp**

Mvnl	13300				2800
Hae III	16100				
Hpa II	9500			1800	4800
Eco RI	900	5220	9830		
Hind III	2200	3200	3050	7650	
Hpa I	3700	5000		7400	
Pvu II	13250		2850		
Sac I	10370		2380	2850	600
Sal I	8000			900	7200
Xba I	9430			6670	
Xho I	16100				



Al comparar nuestros mapas de restricción con los obtenidos para otras especies de *Drosophila* (Solignac et al., 1986a; DeSalle y Giddings, 1986) y a partir de las secuencias disponibles (DeBruijn, 1983; Clary y Wolstenholme, 1985a; DeSalle et al., 1987; Garesse, 1988), se observa la presencia de varios sitios de restricción conservados en *Drosophila*. Estos sitios nos permitieron estimar con mayor precisión los tamaños del genoma mitocondrial en las especies del grupo *obscura*. Especialmente útiles para ello fueron los sitios *MvnI-ThaI* y *HindIII* (ver Figura 4 donde se muestran los sitios de restricción alineados por enzimas).

Los dos subgrupos neárticos (*pseudoobscura* y *affinis*) exhibieron una pequeña variabilidad de tamaño mitocondrial. Cuatro especies del subgrupo *affinis* poseen un genoma de 16.000 pb, mientras que la quinta, *D. tolteca*, ligeramente menor, sólo 15.900 pb. Respecto a las especies del subgrupo *pseudoobscura*, éstas poseen un genoma de 16.200 pb, excepto *D. miranda* con un genoma algo menor de 16.100 pb. Son las especies del subgrupo *obscura* las más heterogéneas, sus genomas mitocondriales poseen una longitud que oscila de 15.800 pb en *D. subobscura* y *D. guanche* a 16.500 pb en *D. bifasciata* (Figura 3).

Algunos de estos tamaños difieren de los estimados en estudios previos (Hale y Beckenbach, 1985; González et al., 1990), notablemente en lo que se refiere a las especies del subgrupo *pseudoobscura*, donde se estimaron tamaños de 15.500 pb. Las diferencias quedan clarificadas utilizando dos enzimas: *MvnI* que en estas especies proporciona un fragmento, que contiene la región variable, de 2,9 kb, claramente mayor que el fragmento homólogo de otras especies de genoma de menor tamaño y *HindIII* proporciona un doblete de 1,5 y 1,55 kb en *pseudoobscura* y *persimilis*, que en *miranda* corresponde a una única banda. El hecho de que los estudios previos no hicieran uso del primer enzima y que el doblete no fuese considerado como tal, permite explicar la gran diferencia de tamaño entre nuestros datos y los previos.

## 1.2. Comparación de los mapas de restricción.

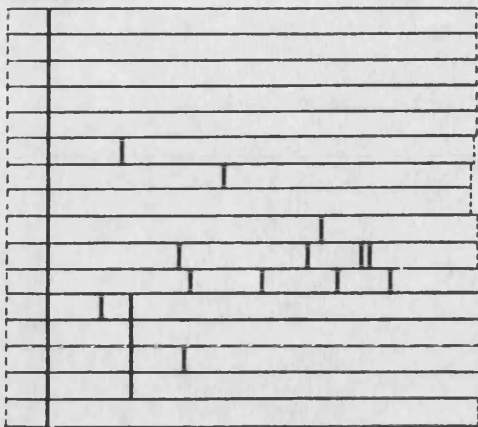
La comparación de los mapas de restricción permite el alineamiento de los sitios de restricción, tal como se muestra en la Figura 4, donde aparecen 11

MvnI (ThaI)

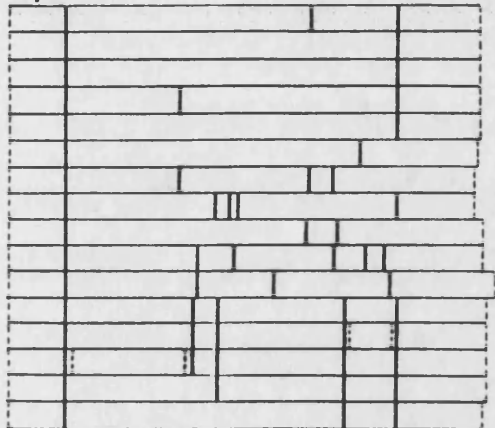


I  
II  
III  
IV  
V  
VI  
VII  
VIII  
IX  
X  
XI  
XII  
XIII  
XIV  
XV  
XVI

HaeIII

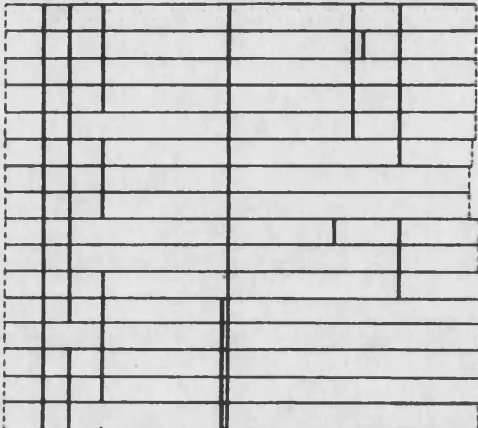


HpaII

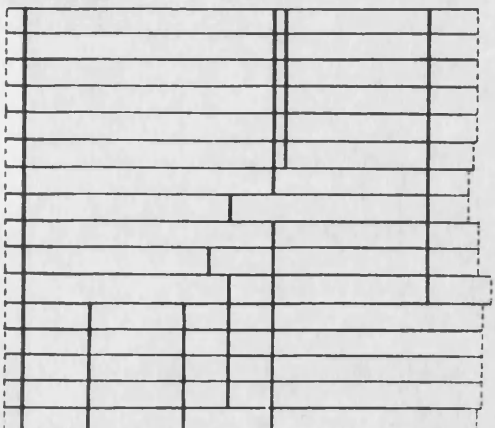


I  
II  
III  
IV  
V  
VI  
VII  
VIII  
IX  
X  
XI  
XII  
XIII  
XIV  
XV  
XVI

EcoRI



HindIII



I  
II  
III  
IV  
V  
VI  
VII  
VIII  
IX  
X  
XI  
XII  
XIII  
XIV  
XV  
XVI

HpaI

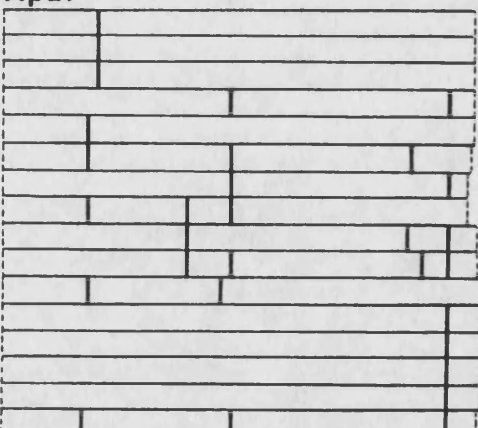


Figura 4. Alineamiento de los sitios de restricción variables y constantes por enzimas para los 16 haplotipos mitocondriales del grupo *obscura*. Las endonucleasas *Bam*HI y *Pst*I no figuran en la representación gráfica ya que sólo proporcionaban 1 y 2 sitios en *D. subobscura*, respectivamente.





de las 13 enzimas, ya que *Bam*HI y *Pst*I únicamente cortan el mtDNA de *D.subobscura*, y por tanto, han sido omitidos. La homología de los sitios de restricción se determinó mediante simples y dobles digestiones, y en caso de duda, mediante hibridación con las sondas de *D. yakuba*.

El alineamiento de los sitios de restricción permitió determinar que las diferencias de tamaño entre los genomas mitocondriales son debidos a la variabilidad de la región A+T (Solignac et al., 1986b; Monforte et al., 1992), zona especialmente rica en Adenina y Timina donde se inicia la replicación.

En total, se presentan 104 sitios de restricción distintos en el mtDNA de las especies estudiadas del grupo *obscura* (43 de 4 pb y 61 de 6 bp), lo que representa un muestreo del 3,36% del genoma mitocondrial de estas especies. De ellos, once (10,6%) son idénticos en todas las especies y 93 (89,4%) variables. Entre los sitios variables, 50 son autapomórficos (carácteres derivados no compartidos), 48 de los cuales están presentes en una sola especie y dos ausentes en un único haplotipo. Los restantes 43 sitios son filogenéticamente informativos (Tabla 3) al estar presentes o ausentes en más de una especie.

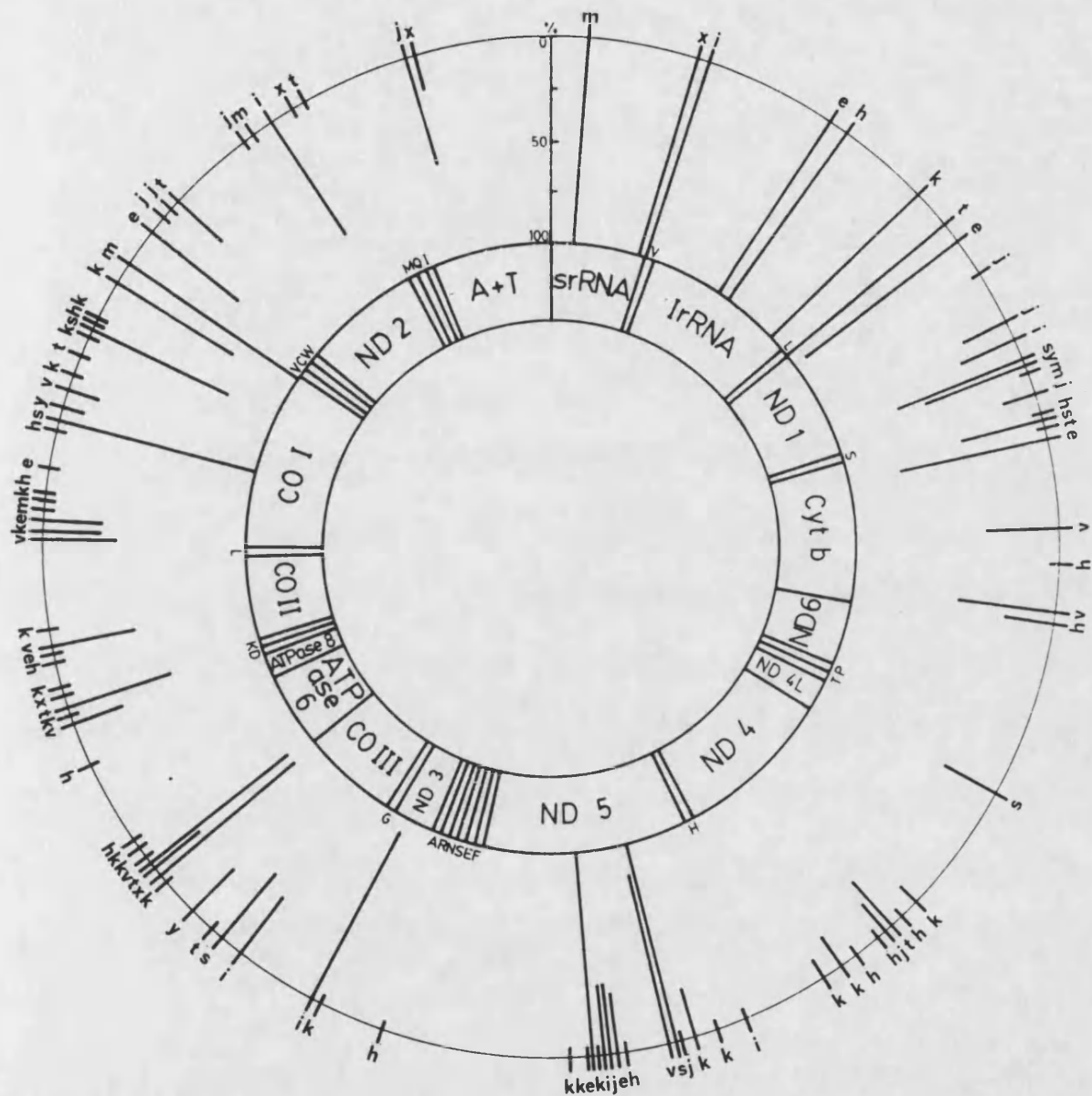
### **1.3. Variabilidad de las diferentes regiones funcionales del genoma mitocondrial según el análisis de restricción.**

La Figura 5 muestra la localización aproximada de los sitios de restricción sobre el mapa génico del genoma mitocondrial. Los sitios conservados se situaron según las secuencias de *D. yakuba* y *D. melanogaster* (DeBruijn, 1983; Clary y Wolstenholme, 1985a; Garesse, 1988). El resto de sitios variables se situó según su posición relativa respecto a los conservados en los mapas de restricción de los 16 haplotipos (ver Figura 3). La longitud de las líneas radiales que marcan la posición de los sitios de restricción es proporcional al número de haplotipos que presentan dicho sitio.

Es remarcable la gran estabilidad de los genes ribosómicos que no presentan ningún sitio de restricción variable. De los 11 sitios constantes del total del genoma, 6 corresponden a genes ribosómicos y son los mismos que se encuentran en otras especies de *Drosophila* (subgrupo *melanogaster*, Solignac

**Tabla 3.** Matriz de presencia/ausencia de los sitios de restricción filogenéticamente informativos del mtDNA de los 16 haplotipos obtenidos. Las abreviaturas para los enzimas de restricción son las de la Figura 5.

Sitio	Haplotipo															
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
h4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
k3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
k4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
k5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
k7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
k12	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
k17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
k23	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
e3	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
e4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
e7	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
e9	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
i2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
i3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
i5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
i7	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
j2	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
j3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
j4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
j6	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
j10	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
v1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
v2	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
v3	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
v4	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
v5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
v6	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
v7	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
v8	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
s1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
s2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
s3	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
s5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
s7	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
t4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
t5	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
t7	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x2	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
x5	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
y1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
y2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
y3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0



**Figura 5.** Variabilidad de las distintas regiones mitocondriales en las especies del grupo *obscura*. Cada línea radial corresponde a un sitio de restricción, y su longitud es proporcional al porcentaje de haplotipos mitocondriales que los poseen. La organización del genoma mitocondrial se basa en el mapa génico del mtDNA de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985). Abreviaturas de los enzimas de restricción: b=*Bam*HI, e=*Eco*RI, h=*Hae*III, i=*Hind*III, j=*Hpa*I, k=*Hpa*II, m=*Mvn*I-*Tha*I, p=*Pst*I, s=*Sac*I, t=*Scal*, v=*Pvu*II, x=*Xba*I, y=*Xho*I.

et al., 1986a; especies hawaianas, DeSalle y Giddings, 1986; grupo *repleta*, Barrio et al., 1992b). La variabilidad observada se concentra principalmente en los genes proteicos siendo similar a la observada en otras especies de *Drosophila* en trabajos previos.

#### 1.4 Inferencia de relaciones filogenéticas.

De los alineamientos de los mapas de restricción (Figura 4), se obtiene una matriz de presencia/ausencia de sitios (ver Tabla 3 para los sitios informativos) que nos permitirá inferir las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura*.

Existen dos aproximaciones principales a la reconstrucción de filogenias moleculares, la basada en distancias y la basada en caracteres (cladista). En la primera, la relación se determina a partir de las distancias entre las especies, obtenidas bajo un modelo evolutivo, sin tratar de establecer los caminos concretos que ha seguido durante la evolución cada uno de los caracteres estudiados. En la segunda, las relaciones se determinan considerando diferentes posibles caminos de la evolución bajo determinados supuestos.

La aproximación basada en distancias tiene buenos defensores (Nei, 1987; Sourdis y Nei, 1988), que aducen que esta metodología, bajo ciertas asunciones basadas en modelos de evolución, puede ser aplicada a la obtención de árboles filogenéticos. Sin embargo, sus detractores (Farris, 1977; Penny, 1982; Swofford y Olsen, 1990) argumentan que dichas asunciones (aditividad, reloj molecular, etc.) raramente se cumplen o, al menos, son muy discutidas. Además, critican el hecho de que toda la información sobre el proceso evolutivo quede reducida a un único valor de distancia entre pares de taxones.

También los métodos cladísticos tienen sus críticas, entre las que destaca el efecto de las homoplasias (carácter presente en dos o más especies que no lo poseía el antecesor común de todas ellas) sobre la reconstrucción filogenética.

En nuestro análisis de las relaciones evolutivas entre las especies del grupo *obscura* hemos hecho uso de las dos aproximaciones a partir de la misma fuente de resultados, la matriz de presencia y ausencia de sitios de restricción.

#### **1.4.1. Árboles filogenéticos basados en matrices de distancias.**

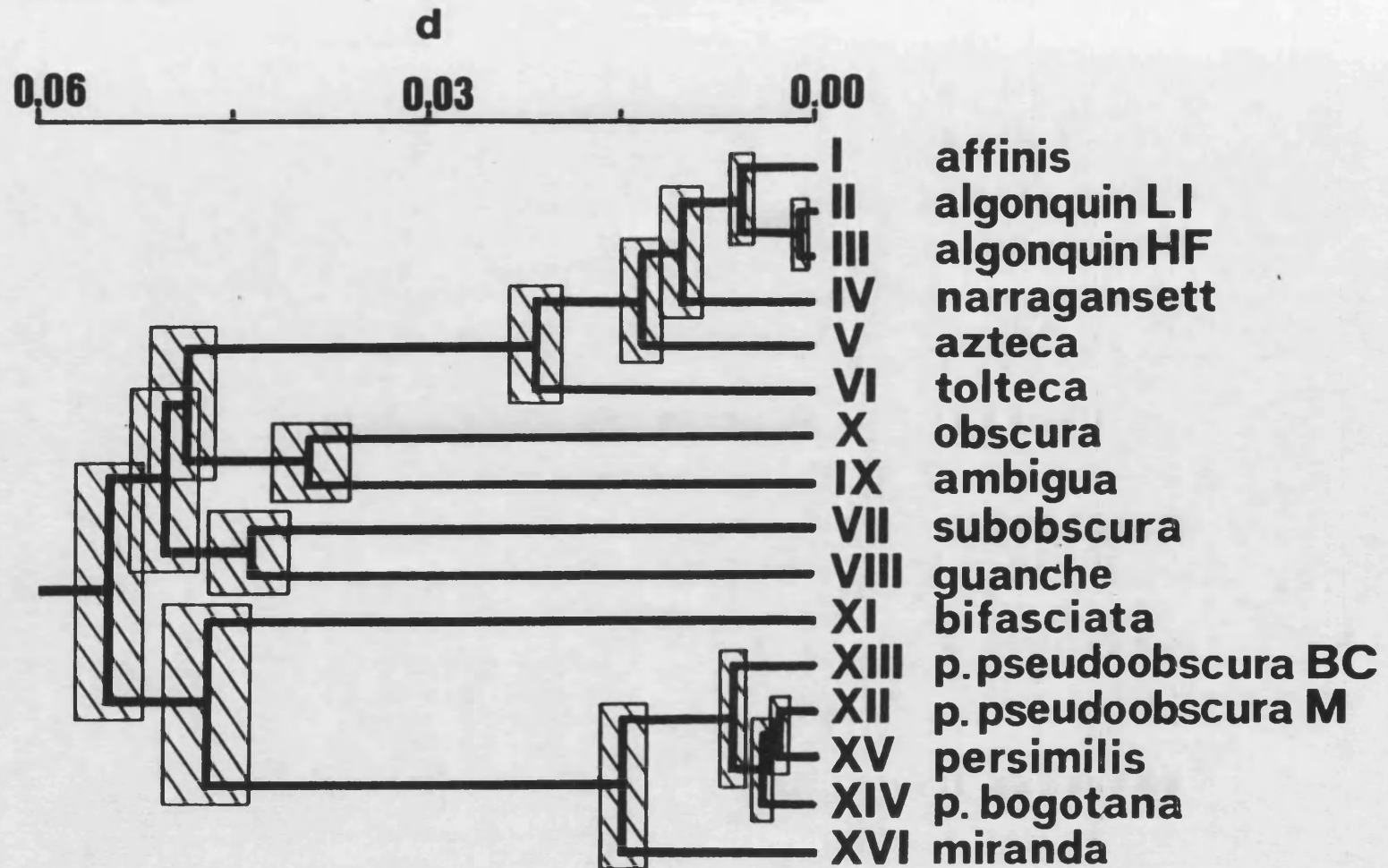
Utilizando la matriz de presencia/ausencia de sitios de restricción se estima la similitud entre haplotipos como la fracción de sitios de restricción compartidos, y a partir de ella, la divergencia nucleotídica (número de sustituciones nucleotídicas por nucleótido) entre los pares de haplotipos, siguiendo el procedimiento de estimas por máxima verosimilitud propuesto por Nei (1987, pág. 104). Este método está basado en una serie de asunciones, de entre las que destacan dos: a) las tasas de sustitución entre los distintos nucleótidos son más o menos idénticas y b) la frecuencia de los distintos nucleótidos en el genoma analizado es aproximadamente idéntica. Ambas asunciones no son ciertas para el genoma mitocondrial de *Drosophila*; sin embargo, según señala Nei, el incumplimiento de ambas asunciones afecta muy levemente las estimas de divergencia por máxima verosimilitud. El análisis del método, por otra parte, muestra que la divergencia nucleotídica obtenida mediante este método se ajusta a la obtenida a partir de la comparación de las secuencias nucleotídicas cuando la divergencia es menor de un 25% (Nei y Tajima, 1987).

La Tabla 4 muestra la fracción de sitios compartidos (sobre la diagonal) y las estimas de divergencia nucleotídica (debajo de la diagonal). A partir de estos valores de divergencia podemos emplear distintos métodos de análisis filogenético basados en distancias; métodos que asumen tasas homogéneas de evolución, por ejemplo el método UPGMA ("Unweighted pair group methods using arithmetic averages", Sokal y Michener, 1957; Sneath y Sokal, 1973), o que no las asumen por ejemplo los métodos de Fitch-Margoliash (1967), del vecino más próximo de Saiton y Nei (1987), etc.

La Figura 6 muestra el análisis UPGMA de los valores de distancias de la Tabla 4. En los nodos se señalan las desviaciones estándar (Nei et al., 1985).

**Tabla 4.** Fracción de sitios compartidos (sobre la diagonal) y divergencia nucleotídica (bajo la diagonal) entre los haplotipos mitocondriales determinados en las especies de *Drosophila* del grupo *obscura*. Las estimas han sido obtenidas a partir de la matriz de presencia/ausencia de los sitios de restricción aplicando el procedimiento desarrollado por Nei (1987).

Haplotipos	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
I <i>D. affinis</i>	-	0.930	0.943	0.862	0.877	0.754	0.563	0.554	0.627	0.546	0.603	0.571	0.559	0.563	0.588	0.585
II <i>D. algonquin</i> LI	0.013	-	0.986	0.875	0.889	0.794	0.571	0.594	0.636	0.553	0.583	0.580	0.567	0.571	0.597	0.594
III <i>D. algonquin</i> HF	0.010	0.003	-	0.889	0.901	0.806	0.581	0.603	0.646	0.560	0.592	0.588	0.576	0.580	0.606	0.603
IV <i>D. azteca</i>	0.027	0.024	0.021	-	0.818	0.807	0.561	0.552	0.633	0.543	0.606	0.540	0.525	0.531	0.557	0.586
V <i>D. narragansett</i>	0.023	0.021	0.018	0.036	-	0.771	0.646	0.606	0.618	0.564	0.595	0.592	0.580	0.583	0.609	0.636
VI <i>D. toteca</i>	0.051	0.041	0.038	0.039	0.047	-	0.59	0.613	0.656	0.568	0.600	0.508	0.492	0.500	0.523	0.548
VII <i>D. subobscura</i>	0.106	0.103	0.100	0.107	0.080	0.097	-	0.632	0.610	0.551	0.523	0.516	0.500	0.508	0.533	0.561
VIII <i>D. guanche</i>	0.109	0.095	0.092	0.110	0.092	0.090	0.086	-	0.600	0.571	0.606	0.571	0.557	0.563	0.590	0.586
IX <i>D. ambigua</i>	0.085	0.082	0.080	0.084	0.088	0.077	0.093	0.096	-	0.667	0.588	0.554	0.540	0.546	0.571	0.600
X <i>D. obscura</i>	0.114	0.111	0.108	0.115	0.107	0.106	0.114	0.107	0.077	-	0.539	0.480	0.466	0.474	0.493	0.543
XI <i>D. bifasciata</i>	0.094	0.100	0.097	0.093	0.097	0.095	0.124	0.095	0.100	0.119	-	0.620	0.580	0.611	0.638	0.606
XII <i>D. pseudoobscura</i> M	0.104	0.100	0.098	0.115	0.097	0.126	0.126	0.106	0.111	0.141	0.091	-	0.939	0.957	0.970	0.857
XIII <i>D. pseudoobscura</i> BC	0.108	0.105	0.102	0.121	0.101	0.133	0.132	0.111	0.117	0.148	0.104	0.012	-	0.925	0.938	0.820
XIV <i>D. pseudoobscura</i> BO	0.107	0.104	0.101	0.118	0.100	0.130	0.129	0.109	0.115	0.144	0.094	0.008	0.015	-	0.955	0.844
XV <i>D. persimilis</i>	0.097	0.094	0.091	0.108	0.091	0.120	0.118	0.099	0.104	0.135	0.085	0.006	0.012	0.009	-	0.885
XVI <i>D. miranda</i>	0.098	0.094	0.091	0.097	0.082	0.110	0.108	0.099	0.094	0.116	0.094	0.028	0.037	0.032	0.022	-



**Figura 6.** Dendrograma obtenido mediante el análisis de agrupamiento según el método UPGMA, de los 16 haplotipos mitocondriales del grupo *obscura*, utilizando los valores de divergencia de la Tabla 4.



En dicha Figura se observan 5 linajes, dos de ellos conducentes a agrupaciones definidas (subgrupos *affinis* y *pseudoobscura*), y los otros tres conducentes a las especies del heterogéneo subgrupo *obscura* (*D. bifasciata*, par *D. guanche* - *D. subobscura*, par *D. obscura* - *D. ambigua*). La relación entre estos linajes no queda clarificada, tal como indican las desviaciones estándar de los nodos.

Del análisis, así como de los valores de divergencia (Tabla 4), destaca el hecho de que la divergencia entre las especies del subgrupo *obscura* ( $0.101 \pm 0.014$ ) es del mismo orden que la observada entre especies de los tres subgrupos (Tabla 5):  $0.105 \pm 0.012$  entre los subgrupos *pseudoobscura* y *affinis*,  $0.113 \pm 0.017$  entre *pseudoobscura* y *obscura*, y  $0.097 \pm 0.011$  entre *affinis* y *obscura*, o incluso entre las especies de los 5 linajes que surgen del análisis UPGMA.

Ya que en el caso de la existencia de tasas heterogéneas en los distintos linajes, la reconstrucción filogenética obtenida por el método UPGMA no sería correcta, se realizó el análisis por el método de Fitch y Margoliash (1967) utilizando el programa FITCH del paquete de análisis filogenético PHYLIP 3.3 (Felsenstein, 1990). El resultado de este análisis queda recogido en la Figura 7. Se examinaron 392 árboles, dando, el representado en dicha Figura, el menor valor de porcentaje de desviación estándar media (6,78).

El árbol resultante muestra nuevamente la existencia de 5 linajes: subgrupo *affinis*, subgrupo *pseudoobscura*, y el heterogéneo subgrupo *obscura*. En este caso, aunque los pares *subobscura-guanche* y *ambigua-obscura* se agrupan juntos esta unión no es significativa. *D. bifasciata* sigue agrupándose con las especies del subgrupo *pseudoobscura*.

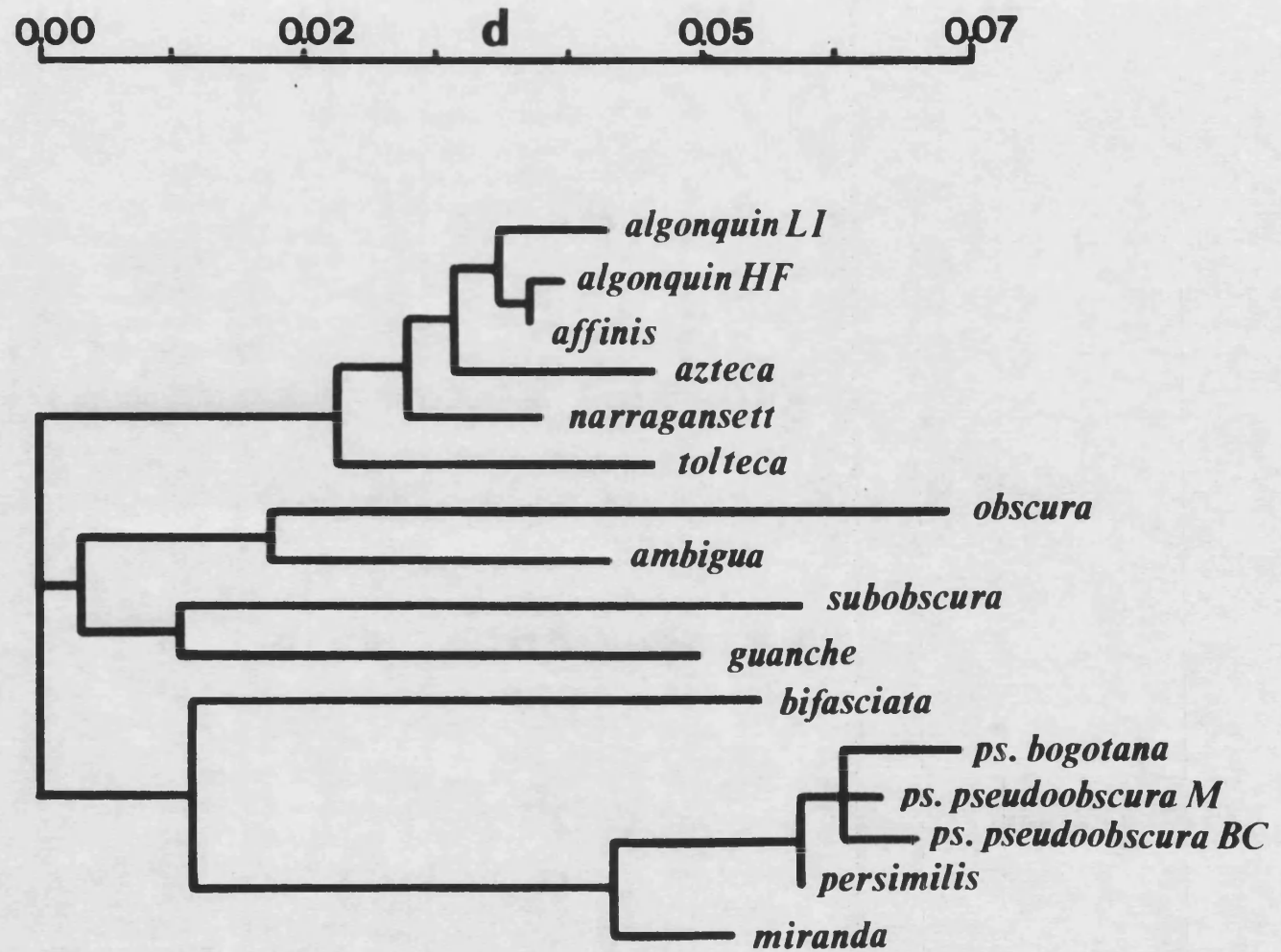
#### 1.4.2. Árboles filogenéticos basados en caracteres.

A partir de la matriz de presencia/ausencia de sitios de restricción, y considerando cada sitio como un carácter que se gana o pierde por efecto de una única sustitución nucleotídica, podemos construir una filogenia que minimice el número de sustituciones nucleotídicas requeridas para conectar todas las especies, según el principio de máxima parsimonia.

**Tabla 5.** Divergencia nucleotídica promedio y error estándar en y entre agrupaciones de especies.

Especies comparadas (Nº de Comparaciones)	substituciones por sitio
En el subgrupo <i>affinis</i> (15)	0.027 ± 0.013
En el subgrupo <i>pseudoobscura</i> (10)	0.018 ± 0.010
En el subgrupo <i>obscura</i> (10)	0.101 ± 0.014
En el linaje <i>obscura-ambigua</i> (1)	0,077 ± 0.000
En el linaje <i>subobscura-guanche</i> (1)	0.086 ± 0.000
Subgrupo <i>pse.</i> frente subgrupo <i>aff.</i> (30)	0.105 ± 0.012
Subgrupo <i>pse.</i> frente subgrupo <i>obs.</i> (25)	0.113 ± 0.017
Subgrupo <i>aff.</i> frente subgrupo <i>obs.</i> (30)	0.097 ± 0.011
Subgrupo <i>pse.</i> frente linaje <i>obs-amb</i> (10)	0.122 ± 0.017
Subgrupo <i>aff.</i> frente linaje <i>obs-amb</i> (12)	0.096 ± 0.014
Subgrupo <i>pse.</i> frente linaje <i>sub-gua</i> (10)	0.114 ± 0.011
Subgrupo <i>aff.</i> frente linaje <i>sub-gua</i> (12)	0.098 ± 0.009
Subgrupo <i>pse.</i> frente <i>D. bifasciata</i> (5)	0.094 ± 0.006
Subgrupo <i>aff.</i> frente <i>D. bifasciata</i> (6)	0.096 ± 0.002
Linaje <i>obs-amb</i> frente linaje <i>sub-gua</i> (4)	0.102 ± 0.009
Linaje <i>obs-amb</i> frente <i>D. bifasciata</i> (2)	0.110 ± 0.009
Linaje <i>sub-amb</i> frente <i>D. bifasciata</i> (2)	0.109 ± 0.014

Abreviaturas: *aff* = *affinis*, *amb* = *ambigua*, *gua* = *guanche*, *obs* = *obscura*, *pse* = *pseudoobscura* y *sub* = *subobscura*.



**Figura 7.** Arbol filogenético sin raíz de los 16 haplotipos mitocondriales, obtenido mediante el método de mínimas distancias cuadráticas de Fitch y Margoliash (1967), a partir de los valores de divergencia nucleotídica de la Tabla 4.

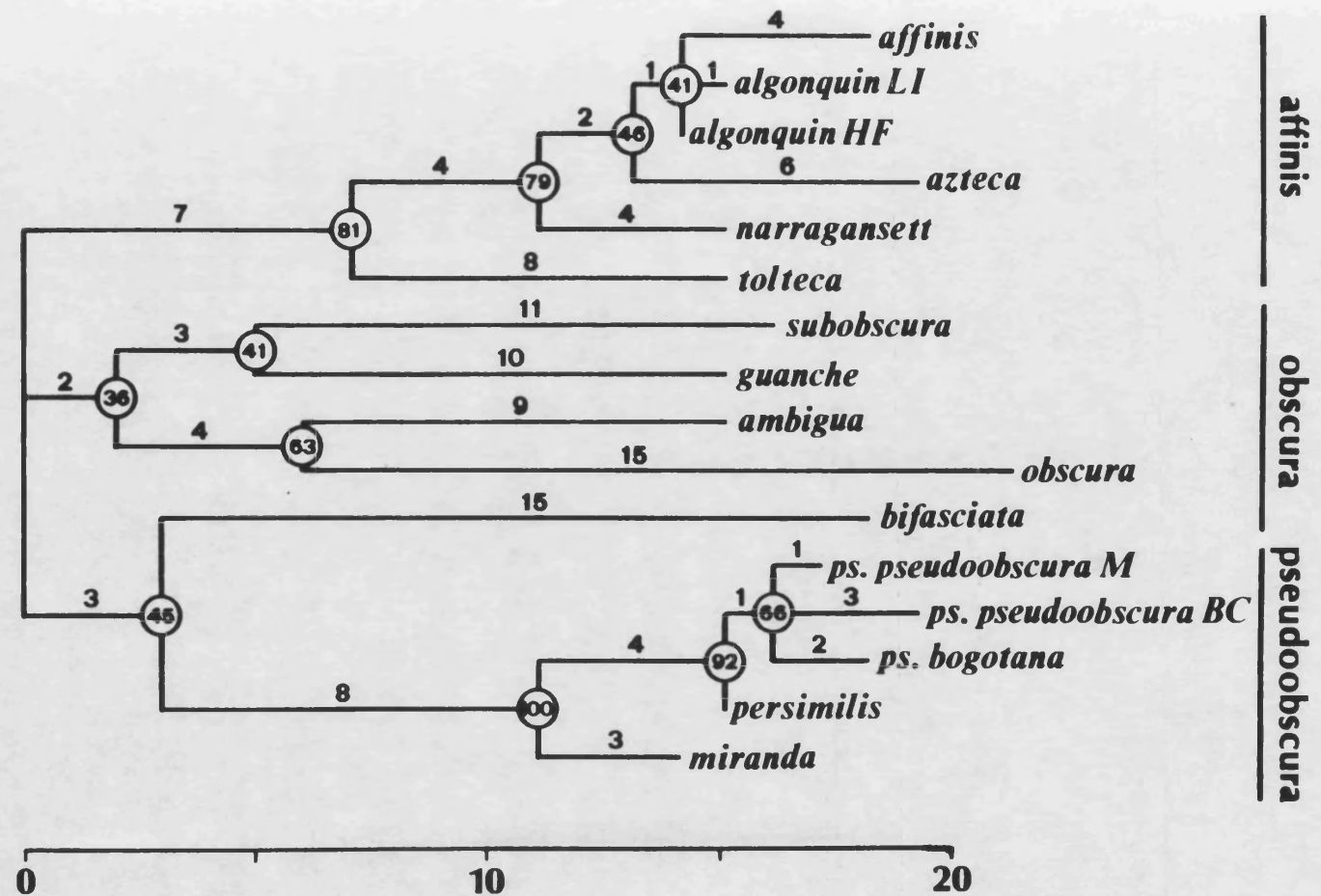
La parsimonia no es definible de forma única, depende de qué eventos evolutivos sean permitidos y de cómo minimizar su número. De este modo se definen distintos criterios: el de **Camin-Sokal** (1965), que asume que para cada carácter se conoce el estado inicial, y sólo son permitidos los cambios al estado nuevo o derivado; el de **Wagner**, que permite que los cambios sean reversibles (Kluge y Farris, 1969; Farris, 1970); el de **Dollo**, que asume que las estructuras complejas se adquieren difícilmente y se pierden con facilidad durante la evolución (Farris, 1977); y el de **compatibilidad**, que trata de encontrar el árbol con el menor número de homoplasias, o sea, que la pérdida o ganancia de un carácter ocurra una sola vez a lo largo del árbol.

En la utilización de métodos parsimónicos a partir de datos de restricción, se recomienda el uso del criterio de Dollo debido a la mayor probabilidad de pérdida que de ganancia de sitios de restricción (DeBry y Slade, 1985). Sin embargo, en nuestro caso hemos aplicado el de Wagner, ya que debido a las constricciones funcionales del genoma mitocondrial (Simon, 1991), así como al sesgo en la frecuencia de los distintos tipos de sustituciones nucleotídicas (Wolstenholme y Clary, 1985, y tal como veremos más adelante en la información obtenida a partir de secuencias), la probabilidad de reversión de los sitios de restricción perdidos es bastante grande (Barrio et al., 1988 y 1992a).

La Figura 8 muestra el árbol filogenético inferido mediante el principio de parsimonia. Para obtenerlo, se utilizó el programa MIX del paquete PHYLIP. En el análisis se requirieron un total de 131 sucesos mutacionales para explicar la filogenia obtenida a partir de los datos de restricción. El índice de consistencia, que mide el número de homoplasias por carácter, fué de 0.71 si se consideraban todos los caracteres variables y 0.53 si se excluían los sitios no informativos.

La topología obtenida es semejante a la de los análisis basados en distancias. El árbol muestra, de nuevo, los subgrupos neárticos (*pseudoobscura* y *affinis*) como agrupamientos perfectamente definidos. No así el subgrupo *obscura*, que aparece como un grupo polifilético, o sea, formado por varios linajes sin origen común.

Para comprobar la fiabilidad del árbol, se realizó un análisis mediante el procedimiento de remuestreo, método de "bootstrap" (Felsenstein, 1985),



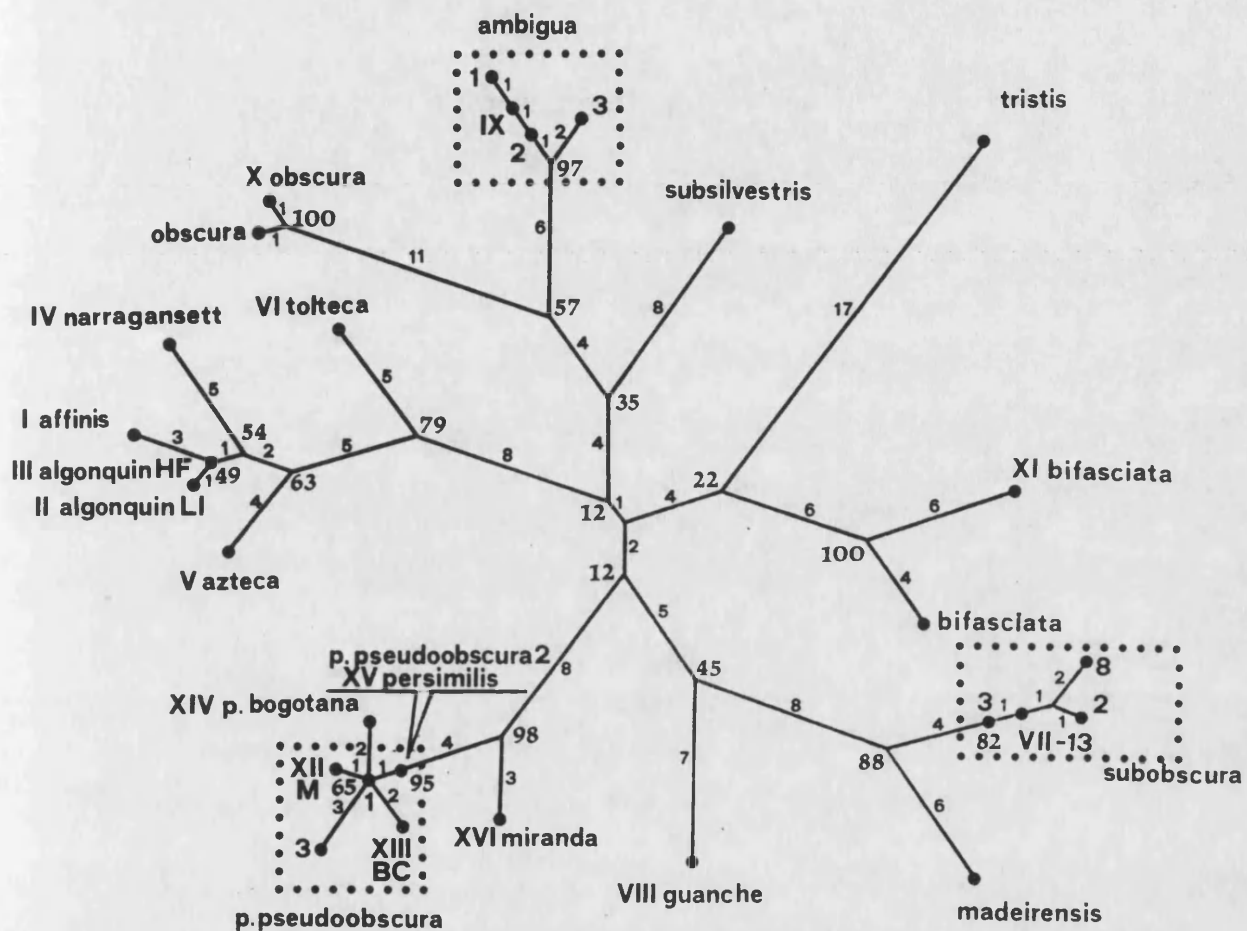
**Figura 8.** Arbol filogenético sin raíz obtenido según el criterio de Wagner de máxima parsimonia para los 16 haplotipos del grupo *obscura* estudiados. El número de cada rama indica los pasos mutacionales requeridos. Los números en los nodos, rodeados por un círculo, indican el porcentaje de replicas en las que la agrupación aparece al realizar el análisis de remuestreo por "bootstrap".

que consiste en la obtención de un cierto número de replicas del árbol por el método de máxima parsimonia y la obtención de un árbol consenso en el que se señala el número de veces que cada grupo monofilético ha aparecido. Se utilizó el programa BOOT del paquete PHYLIP, y los valores obtenidos sobre 100 remuestreos se señalan en los nodos del árbol de la Figura 8, tomándose como valores indicadores monofiléticos los que están por encima del 95%.

El grupo *pseudoobscura* aparece como el único significativamente monofilético (100% de los casos). El subgrupo *affinis*, a pesar de no ser significativo, aparece como tal en el 81% de los casos, aunque las relaciones entre las especies de este subgrupo no queden claras (< 50%). En el caso del subgrupo *obscura*, ninguno de los nodos que conectan sus especies alcanza la significación, ni incluso especies claramente emparentadas (*subobscura-guanche*, *ambigua-obscura*).

Por otra parte, dado que en el mismo periodo que se realizó este estudio aparecieron los resultados de un trabajo en el que se estudiaban las relaciones evolutivas entre las especies del subgrupo *obscura*, basadas en mapas de restricción (González et al., 1990), y donde se analizaban algunas especies no contempladas en nuestro estudio, creímos oportuno incorporar sus datos a los nuestros. De este modo, eliminando las discrepancias entre los mapas, se alinearon los sitios de restricción y se realizaron los mismos análisis llevados a cabo con nuestros datos. Dada la similitud de los resultados obtenidos entre los tres tipos de análisis, sólo se muestra el resultado del análisis parsimónico, que permite la validación estadística por el método de remuestreo (Figura 9).

En este caso el árbol requiere 172 pasos mutacionales, con índices de consistencia global de 0.64 y utilizando sólo los sitios informativos de 0.53. El análisis únicamente clarifica las relaciones entre especies próximas. Sigue apareciendo el subgrupo *pseudoobscura* como monofilético (98%), el *affinis* como un grupo definido pero no significativo (79%), y el *obscura* como un grupo heterogéneo formado por 3 linajes (*ambigua-obscura-subsilvestris*, *subobscura-madeirensis-guanche* y *tristis-bifasciata*), sin que queden significativamente determinadas las relaciones entre las especies de cada subgrupo o linaje, ni entre linajes.



**Figura 9.** Arbol filogenético sin raíz obtenido según el criterio de Wagner de máxima parsimonia para todas las especies y poblaciones del grupo *obscura* estudiadas hasta la actualidad por restricción (González et al., 1990; Barrio et al., 1992a). El número de cada rama indica los pasos mutacionales requeridos. Los números en los nodos indican el porcentaje de replicas en las que la agrupación aparece al realizar el análisis de remuestreo por "bootstrap". Nuestros haplotipos se señalan con el correspondiente número romano (ver Tabla 1). El resto de haplotipos corresponden a los publicados por González et al. (1990), preservando su nomenclatura. Cuando aparecen más de cuatro haplotipos por especie se agrupan en un cuadro de puntos.

En dicho árbol también se puede observar el polimorfismo intraespecífico, destacando la divergencia entre las dos poblaciones de *bifasciata* (europea la de González et al. y japonesa la nuestra), del nivel de la existente entre especies. También, destaca el hecho de que *D. pseudoobscura* y *D. persimilis* compartan un mismo patrón, lo que indicaría que el polimorfismo mitocondrial es previo al suceso de especiación. Y la proximidad entre *D. affinis* y *D. algonquin*, cuya divergencia es menor que la existente entre las poblaciones de *D. pseudoobscura*, *D. ambigua* y *D. subobscura*.

### 1.4.3. Geometría estadística en el espacio de las distancias.

Para determinar si fenómenos de homoplasia, o cualquier otro fenómeno que aleatorizara el proceso evolutivo, podían ser la causa de la imposibilidad de clarificar las relaciones filogenéticas entre los subgrupos del grupo *obscura*, aplicamos el método de la geometría estadística en el espacio de las distancias (Winkler-Oswatitsch et al., 1989; Eigen y Winkler-Oswatitsch, 1990).

Este método es útil para determinar si una topología filogenética es un auténtico árbol o está reflejando relaciones oscurecidas por fenómenos evolutivos como reversión, convergencia, transferencia horizontal, introgresión, recombinación, etc., que dan lugar a topologías en red o arbusto. El método utiliza las distancias entre especies para estimar para todos los posibles cuartetos de especies o grupos de especies dos parámetros:  $y$ , la distancia media de la rama interna entre el cuarteto, y  $x$  la desviación media de la estructura de árbol (debida a reversiones, convergencia, etc.). La relación  $x/y$  es una medida de la estructura en árbol. Así, valores próximos a 0 ( $x < y$ ) indican que se trata de un auténtico árbol, valores próximos a 1 ( $x > y$ ) indican topología en forma de red y cuando  $x$  e  $y$  son aproximadamente 0 indican topología en arbusto (Maynard-Smith, 1989).

La Tabla 6 muestra los parámetros obtenidos en la comparación entre pares y cuartetos de especies o grupos de especies que se indican. El menor cociente  $x/y$  se obtiene al comparar el subgrupo *pseudoobscura* frente al resto de especies, lo que indica que la rama interna que las separa  $y$ , es mayor que en las demás comparaciones entre subgrupos, que la desviación





de la estructura de árbol es menor o ambas cosas, en concordancia con el resultado del análisis de remuestreo.

Hay que destacar el valor del cociente obtenido al realizar el análisis entre las cuatro ramas que surgen de las reconstrucciones filogenéticas (agrupamiento 10 de la Tabla 6), ya que en este caso el valor  $x/y$  es mayor que uno. El valor de  $x$ , reflejo de fenómenos de reversión, convergencia, etc., es del mismo orden que en las otras comparaciones, lo que implica que la rama interna (valor de  $y$ ) que separa los linajes es mucho menor y más próxima a 0 que en el resto de comparaciones. Nos encontramos, por tanto, con una radiación de los linajes del grupo *obscura* en arbusto o estrella.

## **2. SECUENCIACION DEL mtDNA DE ESPECIES DEL GRUPO *obscura***

En los últimos años, y debido al desarrollo de técnicas rápidas y sencillas de secuenciación (por ejemplo, a partir de la PCR), el análisis de secuencias nucleotídicas ha proporcionado una enorme cantidad de información evolutiva. La información obtenida, a diferencia de la proporcionada por otras técnicas como el análisis de restricción, permite, no sólo determinar de manera más precisa relaciones filogenéticas de los organismos portadores del DNA, sino también el estudio evolutivo de la propia región de DNA analizada (tasas de sustitución nucleotídica variables entre regiones del DNA, constricciones funcionales y estructurales, sesgos en la composición nucleotídica, sesgos en el uso de codones, evolución de la organización del genoma, etc.).

Con el fin de profundizar, por una parte, en las relaciones entre los distintos linajes del grupo *obscura*, y por otra, en la especial dinámica evolutiva del mtDNA de insectos, nos planteamos secuenciar distintas regiones de ésta molécula en especies del grupo *obscura*.

### **2.1 Clonación de los fragmentos de restricción homólogos.**

En el momento de plantearnos la secuenciación del mtDNA de especies del grupo *obscura* de *Drosophila*, cabían dos aproximaciones: a)

amplificar distintas regiones homólogas por PCR y secuenciar el producto de la amplificación (tal como proponen fervientemente Kocher et al., 1989), o b) clonar distintos fragmentos homólogos mediante técnicas clásicas y secuenciar distintas zonas de cada fragmento.

Debido a que se había comprobado que el mtDNA obtenido por la técnica de Latorre et al. (1986) era suficientemente puro como para ser clonado, y a las dificultades que entrañaba la secuenciación directa de los productos de la PCR, optamos por la segunda alternativa (ver la sección de Material y Métodos).

Para ello decidimos clonar los fragmentos de restricción generados por enzimas que tuvieran sitios de reconocimiento en los vectores de clonación de uso habitual (serie pUC), que proporcionaran fragmentos de restricción de un tamaño adecuado para ser clonados y que dieran lugar al mayor número de sitios de restricción conservados en las especies del grupo *obscura*. La restrictasa elegida fué *EcoRI*, la única que genera sitios conservados clonables, y que proporciona fragmentos homólogos de 0.9, 1.1 y 4.3 kb en la mayoría de las especies.

Ya que el esfuerzo requerido para secuenciar parcialmente el genoma mitocondrial de varias especies del grupo *obscura* es mayor que el requerido para el análisis de restricción, y teniendo en cuenta los resultados de este análisis previo, seleccionamos representantes (14 especies, 15 poblaciones) de los distintos linajes para su secuenciación. De los linajes de los subgrupos *pseudoobscura* y *affinis*, en los que las relaciones filogenéticas quedaban claramente determinadas, se tomaron tres representantes de cada uno de ellos. Así, del subgrupo *pseudoobscura* se clonaron y secuenciaron: *D. pseudoobscura bogotana*, *D. persimilis* y *D. miranda*; y del *affinis*: *D. affinis* población CL, *D. algonquin* HF y *D. azteca* DA (ver Material y Métodos, donde se describen sus orígenes). En cuanto al subgrupo *obscura*, dada su heterogeneidad y la existencia de distintos linajes (Cabrera et al., 1983; González et al., 1990; resultados del apartado anterior recogidos en Barrio et al., 1992a), se escogieron todas las especies disponibles del subgrupo: *D. subobscura*, *D. madeirensis*, *D. guanche*, *D. ambigua*, *D. obscura*, *D. tristis*, *D. subsilvestris* y *D. bifasciata*. De *D. subobscura* se tomó un representante de cada uno de los dos haplotipos mitocondriales (I y II) más frecuentes según estudios previos (Latorre et al., 1986 y 1992; Afonso et al., 1990; Rozas et al.,

1990). Por lo tanto tres especies más *D. madeirensis*, *D. tristis* y *D. subsilvestris* que las utilizadas previamente en los análisis de restricción.

Siguiendo la metodología expuesta en la sección de Material y Métodos, se clonaron los fragmentos señalados en la Figura 10, de los cuales se determinó secuenciar distintas regiones comprendidas entre los sitios de restricción constantes situados en las posiciones 7146 y 13433 de la secuencia de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985a).

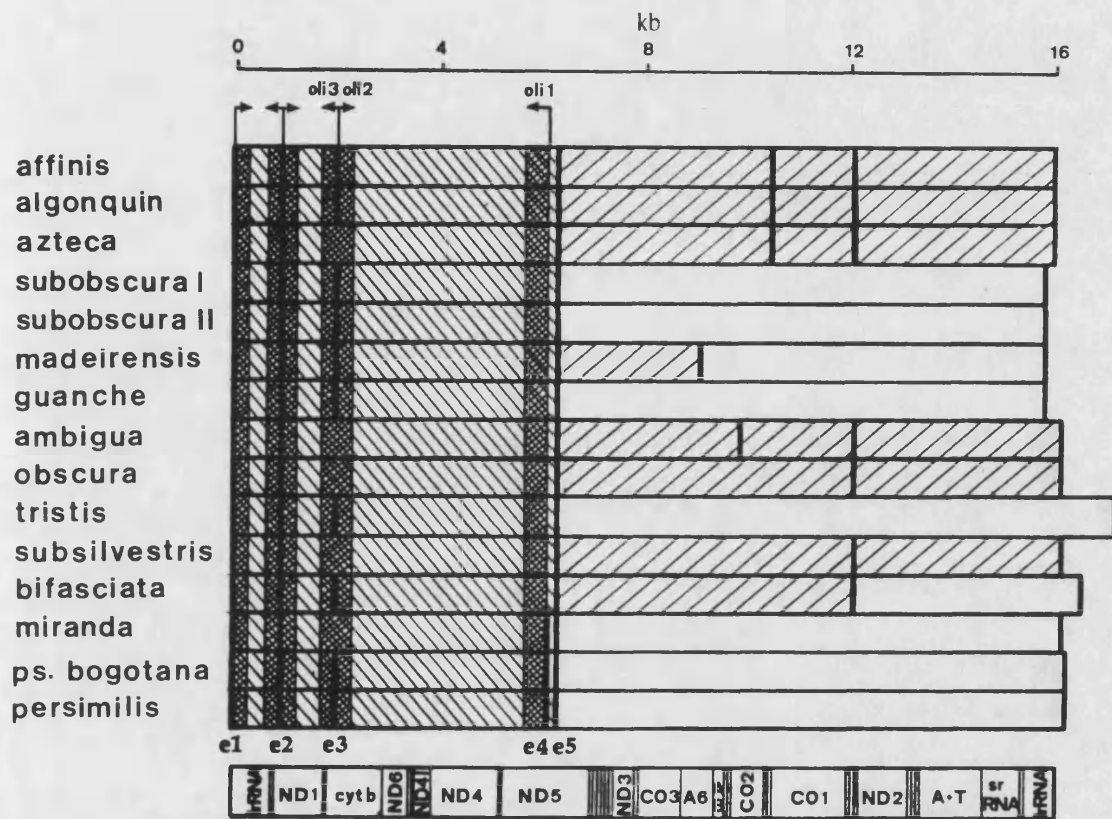
## **2.2 Secuenciación parcial del genoma mitocondrial de las especies del grupo *obscura*.**

De entre los genes comprendidos entre los sitios de restricción señalados, decidimos secuenciar parcialmente aquellos de más fácil acceso a partir de los puntos de clonación. De esa forma se secuenciaron todos los extremos homólogos de los fragmentos de restricción clonados.

Como se puede observar en la Figura 10, no todas las especies poseen los mismos sitios de restricción *EcoRI*. Para poder secuenciar las mismas regiones en todas las especies, debimos recurrir en algunos casos a la utilización de los iniciadores ("primers") sintéticos descritos en Material y Métodos. Cuando fué posible se utilizaron "primers" estandars.

A partir del sitio *EcoRI*-1 (e1, posición 13343 de *D. yakuba*) se secuenció una región del fragmento de 0.9 kb de 300 bp que contenía parte del gen rRNA 16S (Figura 11). Este sitio lo poseían todos los genomas mitocondriales analizados, por lo que no se hizo necesario la utilización de iniciadores sintéticos.

A partir del sitio *EcoRI*-2 (e2, posición 12533 de *D. yakuba*), se secuenciaron otras dos regiones (300 y 320 pb) de los fragmentos de 0.9 kb y de 1.1 kb ó 5.4 kb. Esta zona (posiciones 12224 a 12833 de la secuencia de *D. yakuba*) contenían el extremo 5' del gen ND1, el gen del tRNA de la leucina que reconoce los codones CUN (Leu-CUN-tRNA) y el extremo 3' del gen del rRNA grande 16S (Figura 11), además de las regiones intergénicas situadas entre estos genes. También este sitio lo poseían todos los genomas



**Figura 10.** Mapas de restricción *EcoRI* de las especies secuenciadas indicando los fragmentos clonados (zona rayada), los fragmentos seleccionados para secuenciación (zona rayada intensa), y las regiones secuenciadas (zona cuadrículada) a partir de los diferentes sitios *EcoRI* (e1-e5) utilizados para la clonación. Algunas de las especies, carentes de determinados sitios *EcoRI*, se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos sintéticos indicados en el mapa (oli1, oli2 y oli3). En la parte inferior se representa el mapa génico de *D. yakuba* según Clary y Wolstenholme (1985a).



CCTAAAATTATAGAACAGATACAGGAGCTTCAACATGAGCTTTAGGTAATCATAAATGTAAGTAAAAATATGGTATTTTCACTAAAAAGCACATAA 9000  
 CGATTTTAAIATCTTGGTCTATGCTCGAAGTTGACTCGAAATCCATTAGTATTTACATGATTTTATAAGCATAAAAGTGATTTTTCGTGATTAI  
 A L I H S G S V P A E V H A K P L W L H V L F H P H K V L F A C L L  
 AACAAAAATATAAATAATCATAATTAACATAAAATTTTATTAAATAAAAAATTTATTCACCCAGTTTGTATTAATACATAAAAAATTCGAATTAATAT 9100  
 TTTTATTAAT  
 C F Y L L D Y N F H F H N H L Y F H M S G I K H H V Y F I G I L M  
 AGGTAACAACTAATAAAGTATAAAATAAATAAACCAGCTTCCAAATCGTTCCGGTTCATAACCCATCCIAAAAATTAATAAATAATGACGAAT 9200  
 TCCATTTCTTTGATTTTTCATATTTTATTATTTATTGTTGCTCGAAGCTTAGCAAGGCCAAGTATTCGAGTAGGATTTTAAATTTTATTTACATCTTAA  
 P L S V L L L T Y F L L Y V G A Q L R E P Q Y G W G C L I L F I T P I  
 AATCTTCTTTCAAAAAATA 9300  
 TTAGCAAAAGCTTTTATTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTT  
 L S S E F F L Y F H F L S H S S F T L V L L L L L L I V I N L I L F L H  
 TTTTCTAATTAATTAATTAATTAATTTCTCTAGCTAATAATATCAATGAACAAATTCATAAACAAGCAAAACCAAAACCAAAACCAAAACCAAAACCA 9400  
 AAAACATTAATAAATAAATAAATAAAGCAAGAGATTTATTAATAGTTTACTTTTAACTTTCATAAGTTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCAT  
 K Y N H Y K N T S E S A L L H L S C I W L S L L V L G Y S L M D C  
 TCCTAAAAATAAACAATTTCTGATCAATAATTTATAAAATTTTATTAATAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA 9500  
 AGCATTTTATTTCTTTAAAGCAGTATTAATAATTTTATAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
 G L F Y S I E Y S H H F H H H H L L F I F S I F F L H I Q V H W Y  
 ATATTATTAATAAACAAGCAGTAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA 9600  
 TATAA  
 M H N I F C V P T L F L L F L I I K I L M \*\* M I S F S Q F Y D H G H T  
 ←URF4  
 ACGAATATAGAACCAAAATTCATAAACCTAAAGCTCCTTCACATACCTTAAATGTAAAAAATATTTTCTAAAAATAAATTTTCAATAATTTAGTATTT 9700  
 TCGTAAATATCTTTGCTTTAACTATTTGCTATTCAGGCAAGCTGTAAGATTTTCAAAATTTTATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
 R I H S V L I S L G L A G E C V S F T L F H M S F Y N E Y N L M N  
 AAATA 9800  
 TTTATTT  
 L Y I F L H F F L H L V I F E L S L L M S L I L H K R N S V F C F L G  
 CTAAAAATA 9900  
 GATTTTATTT  
 L I F L I M P L S W Y L I M I H  
 ←URF4L  
 I I I Q L M  
 URF6 →  
 TATTTCTTTTAAACCTCAAGCAAAAAGAAATTTCTTTTTCATTAATCCGCAAAATTAATATTTTATAAATAAATACCTCTTGAATTTATTCATTAAT 10000  
 AATAAAGAAAATTTTCACTTCTCTTTCTTTAAAGAAAAGTAAITAGCGGTTTAAATTTATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
 ←tRNA<sup>Phe</sup>  
 I Y S L I I T T S I I F F N H I H P I A I C L T L L L I Q T I F V C  
 ATTATATTCATTAAT 10100  
 TAATATAAGTAATTAATAATCATGTAGATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
 L L S G L A H T K S F W Y S Y I L F L I F L G G H L V L F I Y V T  
 TTACTTTCCAGGATTAATACTAAAAGTTTTCATCTCATACATTTTATTTTAAATTTTTCAGGAGCAATCTTGTTTTATTTATTTATTTATTTATTT 10200  
 AATGAAAGTCCCAATTAATTCATTTTCAAAAAGTATGAGTATGTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
 L A S H E M F N L S I K L T L F S M F I L F F H F I L S M I L D K T  
 TAGCTTCTAATGAAATTTAATTTATCAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA 10300  
 ATCGAATTAATTAATAA  
 S I T L F L H N N E H Q S I I E H N S Y F T E N S I S L N K L Y N  
 TTTCTATTCTTTATTTTAAATA 10400  
 AAGATAATGAAATAA  
 F P T N F V T I L L L H N Y L L I T L L I V V K I T K L F K G P I R  
 TTTCCAAACAATTTTCAACAATTTTAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA 10500  
 AAAGCTTCTTTAAACATTTTAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
 M H S \*\* M H K P L R N S H P I F K I A H N A L V D L P A P I N I S  
 TAATATCTTAATTAATGCAATAAACCTTTACGAAATTCACCCTTTTATTTAAATTCCTAATAAATGCTTTAGTTGATTTACCAGCTCCAATTAATTTTC 10600  
 ATTATAGAAATTAATTCAGTATTTGCAATTCCTTTAAGGCTGGAAATAAATTTAAGCAATTAATTCGAAATCAACTAAATGCTCGAGCTTAATTAATAAG  
 S W W H F C S L L G L C L I I Q I L T G L F L A H H Y T A D V N L  
 AAGATGATGAAATTTGGATCATTACTTGGATTAATTTAATTTTCAAAATTTAAGCTGGATTTATTTTAGCTATACACTACACAGCAGATGTTAACTTA 10700  
 TTCTACTACTTTAAACCTAGTAATGAACCTAATACAAATTAATAAGTTTAAATTTGACCTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
 A F Y S V N H I C R D V N Y G W I L R T I H A N G A S F F F I C I  
 CCTTTTATAGTGTAAATCATATTTGCCGAGATGTAATTTAGCTTCAATTAACGAAGTTTACAGCTTAAGGCTGCAICATTTTITTTATTTGTAATTT 10800  
 CGAAAAATATCACAATTAAGTATAAACCCTCTACATTTAATACCAACTAATAAAGCTTGAATTCGCAATTCGCACTAGTAAAAAATAAATAAATAAATA  
 Y L H I G R G I Y Y G S Y L F T P T W L V G V I I L F L V H G T A F  
 ACTTACATTTGGTCGAGGAATTTATACGGATCATAATTTAATTAACCAAACTTACATTAAGGAGTAAATTAATTTATTTTATTTAGTAATTAAGCAACAGC 10900  
 TGAATGATAACAGCTCTTAAATAATGCTTACTATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
 H G Y V L P W C Q H S F W G A T V I T H L I S A I P Y L C H D I V  
 TATAGCTTATGTTTACCTTACAGCAAAATATCATTTTACAGGAGCACTGTAATTAATTAATTTAGCTTACCTTATTTAGCTTATACAGCTTACTA 11000  
 ATATCCAATCAAAAATCGAAGCTCTTTTATAGTAAACCTCTTCTGACATTAATGATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA









mitocondriales analizados, por lo que no se hizo necesaria la utilización de iniciadores sintéticos.

A partir del sitio *EcoRI*-3 (e3, posición 11462 de la secuencia de *D. yakuba*) secuenciamos una región de 315 pb del fragmento de 4.3 kb y otra de 320pb del fragmento de 1.1 kb (Figura 11) y las dos regiones intergénicas situadas entre estos dos genes. Ambas zonas adyacentes (posiciones 11147 a 11777) contenían el extremo 3' del gen del citocromo b (cytb), el gen del tRNA para la serina que reconoce los codones UCN (Ser-UCN-tRNA), y el extremo 3' del gen de la NADH-Deshidrogenasa subunidad 1 (ND1). En las especies carentes de ese sitio de restricción se utilizaron los oligonucleótidos 2 y 3 para secuenciar ambas regiones.

Respecto del sitio *EcoRI*-4 (e4), en aquellas especies que carecían de él (que son todas excepto las del subgrupo *pseudoobscura*), se utilizó el oligonucleótido 1. A partir de ese sitio (posición 7290 de la secuencia de *D. yakuba*), o con el oligo uno, se secuenció la región de 415 bp del gen NADH-Deshidrogenasa subunidad 5 (ND5) homóloga a la de *D. yakuba* recogida en la Figura 11.

Por último, se obtuvieron las secuencias a partir del sitio *EcoRI*-5 (e5, posición 7146 de *D. yakuba*) de la pequeña zona de 144 bp entre los sitios *EcoRI* 4 y 5 correspondientes al gen ND5. Esta zona se pudo secuenciar para todos los fragmentos de 4.3 y 5.4 kb, pero únicamente para el fragmento de 144 pb de *D. persimilis*, ya que en las otras especies del subgrupo *pseudoobscura* no se consiguió clonar.

En total se secuenciaron 30967 pb (aproximadamente 2065 pb por especie), de los que únicamente se utilizó la información de 29095 pb, al eliminar los 144 pb de los que carecíamos de información en *D. ps. bogotana* y *D. miranda*, o sea unos 1940 pb por especie (Tabla 7).

### **3. VARIABILIDAD DE LAS DISTINTAS REGIONES FUNCIONALES DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE *Drosophila*.**

En las Figuras 12, 13, 14, 15 y 16 se muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas por regiones funcionales. En la Figura 17 se incluye el

**Tabla 7.** Número de nucleótidos secuenciados para cada genoma mitocondrial de las especies del grupo *obscura* (en negrilla, en la diagonal) y número de nucleótidos comunes (debajo de la diagonal).

	<i>yak</i>	<i>mel</i>	<i>aff</i>	<i>alg</i>	<i>azt</i>	<i>subI</i>	<i>subII</i>	<i>mad</i>	<i>gua</i>	<i>amb</i>	<i>obs</i>	<i>ssv</i>	<i>tri</i>	<i>bif</i>	<i>mir</i>	<i>bog</i>	<i>per</i>
<i>yakuba</i>	<b>1949</b>																
<i>melanogaster</i>	1937	<b>1939</b>															
<i>affinis</i>	1941	1934	<b>1941</b>														
<i>algonquin</i>	1941	1934	1941	<b>1941</b>													
<i>azteca</i>	1938	1933	1938	1938	<b>1938</b>												
<i>subobscura I</i>	1936	1933	1935	1935	1934	<b>1936</b>											
<i>subobscura II</i>	1936	1933	1935	1935	1934	1936	<b>1936</b>										
<i>madeirensis</i>	1936	1933	1935	1935	1934	1936	1936	<b>1936</b>									
<i>guanche</i>	1937	1933	1936	1936	1935	1936	1936	1936	<b>1937</b>								
<i>ambigua</i>	1938	1935	1937	1937	1936	1936	1936	1936	1936	<b>1938</b>							
<i>obscura</i>	1942	1935	1941	1941	1938	1936	1936	1936	1937	1938	<b>1942</b>						
<i>subsilvestris</i>	1939	1934	1938	1938	1938	1935	1935	1935	1936	1937	1939	<b>1939</b>					
<i>tristis</i>	1942	1935	1941	1941	1938	1936	1936	1936	1937	1938	1942	1939	<b>1942</b>				
<i>bifasciata</i>	1942	1936	1941	1941	1938	1936	1936	1936	1937	1938	1942	1939	1942	<b>1943</b>			
<i>miranda</i>	1942	1935	1941	1941	1938	1936	1936	1936	1937	1938	1942	1939	1942	1942	<b>1942</b>		
<i>ps. bogotana</i>	1942	1935	1941	1941	1938	1936	1936	1936	1937	1938	1942	1939	1942	1942	1942	<b>1942</b>	
<i>persimilis</i>	1942	1935	1941	1941	1938	1936	1936	1936	1937	1938	1942	1939	1942	1942	1942	1942	<b>1942</b>

**Figura 12.** Alineamiento de las secuencias del gen ribosómico grande mitocondrial. Los números del epígrafe y del inicio y final de las secuencias hace referencia a las posiciones nucleotídicas designadas por Clary y Wolstenholme (1985a) para el genoma mitocondrial de *D. yakuba*.

Gen LrRNA (13438-13139 y 12833 12733):

					60
<i>yakuba</i>	GAATTCGGCA	AAAATAATGT	TCGCCTGTTT	AACAAAAACA	TGTCTTTTGG AATTATATAT
<i>melanogaster</i>	.....	.....A.	.....	.....	.....
<i>affinis</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
<i>algonquin</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
<i>azteca</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
<i>subobscura</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
<i>madeirensis</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
<i>guanche</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
<i>ambigua</i>	.....	.....	.....	.....	.....TA..T.
<i>obscura</i>	.....	.....	.....	.....	.....TA..T.
<i>subsilvestris</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
<i>tristis</i>	.....	.....A.	.....	.....A.	.....A..T.
<i>bifasciata</i>	.....	.....	.....	.....	.....TA..T.
<i>miranda</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
<i>ps. bogotana</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
<i>persimilis</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..T.
					120
<i>yakuba</i>	AAAGTCTAAC	CTSCCCACTG	AAAATTTTAA	ATGGCCGCAG	TATTTTGACT GTGCAAAGGT
<i>melanogaster</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>affinis</i>	.....	.....	.....	.....	.....C.....
<i>algonquin</i>	.....	.....	.....G-	.....	.....C.....
<i>azteca</i>	.....	.....	.....	.....	.....C.....
<i>subobscura</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>madeirensis</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>guanche</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ambigua</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>obscura</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>subsilvestris</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>tristis</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>bifasciata</i>	.....	.....	.....T-	.....	.....
<i>miranda</i>	.....	.....	.....	.....	.....C.....
<i>ps. bogotana</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>persimilis</i>	.....	.....	.....	.....	.....

<i>yakuba</i>	-AGCATAATC	ATTAGTCTTT	TAATTGAAGG	CTGGAATGAA	TG3TTGSAGG	AAATATTAAC
<i>melanogaster</i>	T...TA.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>affinis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>algonquin</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>azteca</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>subobscura</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>madeirensis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>guanche</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ambigua</i>	.....	.....C.....	.....G.....	.....	.....	.....
<i>obscura</i>	.....	.....C.....	.....G.....	.....	.....	.....
<i>subsilvestris</i>	.....	.....C.....	.....G.....	.....	.....	.....
<i>tristis</i>	.....	.....C.....	.....G.....	.....	.....	.....
<i>bifasciata</i>	.....	.....C.....	.....G.....	.....	.....	.....
<i>miranda</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ps. bogotana</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>persimilis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....

<i>yakuba</i>	TGTTTCATTT	AAATTTAAAA	TAGAATTTTA	TTTTTTAGTC	AAAAAGCTAA	AATTAATTTA
<i>melanogaster</i>	.....	...A...TTT.	.....	.....	.....	...T.....
<i>affinis</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...A.....
<i>algonquin</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...A.....
<i>azteca</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	.....
<i>subobscura</i>	.....	...A...TTT.	.....	.....	.....	...A.....
<i>madeirensis</i>	.....	...A...TTT.	.....	.....	.....	...A.....
<i>guanche</i>	.....	...A...TTT.	.....	.....	.....	...A.....
<i>ambigua</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...T.....
<i>obscura</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...T.....
<i>subsilvestris</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...T.....
<i>tristis</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...T.....
<i>bifasciata</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...T.....
<i>miranda</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...A.....
<i>ps. bogotana</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...A.....
<i>persimilis</i>	.....	.....TTT.	.....	.....	.....	...A.....

<i>yakuba</i>	AAAGACGAGA	AGCCCTATA	AATCTTTATA	TTTT-ATTTA	TTTTAATTAT	AAAGATTAAT
<i>melanogaster</i>	.....	.....	.....	...TT...	.....	...T.....
<i>affinis</i>	.....	.....	.....	...T...-	.....G.	.....
<i>algonquin</i>	.....	.....	.....	...T...-	.....G.	T.....
<i>azteca</i>	.....	.....	.....	...T...-	.....G.	.....
<i>subobscura</i>	.....	.....	.....	...T...-	.....G.	T.....
<i>madeirensis</i>	.....	.....	.....	...T...-	.....G.	T.....
<i>guanche</i>	.....	.....	.....	...T...-	.....G.	T.....
<i>ambigua</i>	.....	.....	.....	...TT...-	.....G.	T.....
<i>obscura</i>	.....	.....	.....	...TT...-	.....G.	T.....
<i>subsilvestris</i>	.....	.....	.....	...TT...-	.....G.	T.....
<i>tristis</i>	.....	.....	.....	...TT...-	.....G.	T.....
<i>bifasciata</i>	.....	.....	.....	...TT...-	...A.....	.....
<i>miranda</i>	.....	.....	.....	...TT...-	.....G.	.....T..
<i>ps. bogotana</i>	.....	.....	.....	...TT...-	.....G.	T.....
<i>persimilis</i>	.....	.....	.....	...TT...-	.....G.	T.....

<i>yakuba</i>	TTTTATAATA TTTTAGTACG AAAGGACCAA ATATTAAAAT AATTATATTT TTATATAAGA
<i>melanogaster</i>	.A...G... ..C..... ..TATA-..
<i>affinis</i>	.....G..... ..A.A...
<i>algonquin</i>	.....G..... ..A.A...
<i>azteca</i>	.....G..... ..A.A.A-..
<i>subobscura</i>	..... ..A.A-T..
<i>madeirensis</i>	..... ..A.A-T..
<i>guanche</i>	..... ..A.A.A-T..
<i>ambigua</i>	..... ..A.A-T..
<i>obscura</i>	..... ..A.A.T..
<i>subsilvestris</i>	.....G..... ..A.ATA-T..
<i>tristis</i>	..... ..A.A.T..
<i>bifasciata</i>	..... ..A.T..
<i>miranda</i>	.....G..... ..A.A...
<i>ps. bogotana</i>	.....C..... ..A.A...
<i>persimilis</i>	.....C..... ..A.A...

<i>yakuba</i>	ATATTATTAA TATATAATAA
<i>melanogaster</i>	.....----AA
<i>affinis</i>	.....G..TA..
<i>algonquin</i>	.....G..TA..
<i>azteca</i>	.....--..
<i>subobscura</i>	.....-----
<i>madeirensis</i>	.....-----
<i>guanche</i>	.....C..-----
<i>ambigua</i>	.....C.....---A..
<i>obscura</i>	.....C.....TA..
<i>subsilvestris</i>	.....--TA..
<i>tristis</i>	.....C.....TA..
<i>bifasciata</i>	.....TA..T....
<i>miranda</i>	.....A.TA..
<i>ps. bogotana</i>	.....A.....TA..
<i>persimilis</i>	.....A.....TA..



**Figura 13. a)** Alineamiento de las secuencias de los genes tRNAs de Leucina. Resto como en la Figura 12.

	66
<i>yakuba</i>	AGTTAATGAG CTTGAACAAG CGTATGTTTT GAAAACATAA GATAGAATTT AATTTTCTAT TAACTT
<i>melanogaster</i>	.....T... .A..... .....
<i>affinis</i>	..... .A..... .....
<i>algonquin</i>	..... .A..... .....
<i>azteca</i>	.....T... .A..... .....
<i>subobscura</i>	.....C G...T... .A..... .....
<i>madeirensis</i>	.....T... .A..... .....
<i>guanche</i>	.....T... ..G... ..A.....
<i>ambigua</i>	.....T... .A..... ..A.....
<i>obscura</i>	.....T... .A..... ..A.....
<i>tristis</i>	..... .A..... ..A...C.....
<i>subsilvestris</i>	.....T... ..T... ..A.....
<i>bifasciata</i>	.....T... .A..... ..C.....
<i>miranda</i>	.....T... .A..... .....
<i>ps. bogotana</i>	.....T... .A..... .....
<i>persimilis</i>	.....T... .A..... .....

**b)** Alineamiento de las secuencias de los genes tRNAs de Serina. Resto como en la Figura 12.

	65
<i>yakuba</i>	ACTATTTTGG CAGATTAGTG CAATAAATTT AGAATTTATA TATGTAATTT TTATTACAAA TAGTA
<i>melanogaster</i>	.....G..... .....
<i>affinis</i>	G..... ..T... ..A.....
<i>algonquin</i>	G..... ..T... ..A.....
<i>azteca</i>	G..... ..T... ..A.....
<i>subobscura</i>	G..... ..T... ..A.....
<i>madeirensis</i>	G..... ..T... ..A.....
<i>guanche</i>	G..... ..T... ..A.....
<i>ambigua</i>	G..... ..T... .....
<i>obscura</i>	G..... ..T... .....
<i>tristis</i>	G..... ..T... .....
<i>subsilvestris</i>	G..... ..T... ..A.....
<i>bifasciata</i>	G..... .G...G... ..T... ..AG.....
<i>miranda</i>	G..... ..T... .....
<i>ps. bogotana</i>	G..... ..T... .....
<i>persimilis</i>	G..... ..T... .....





	GGA	GAC	CCA	GAT	AAC	TTT	ATT	CCT	GCT	AAT	CCT	TTA	GTA	ACA	CCA	GCT	CAC	ATT	CAA	CCA
<i>yakuba</i>	...	...	..T	...	...	...	...	..A	..A	..C	...	...	...	...	..T	..C	..T	...	...	...
<i>melanogaster</i>	...	...	...	..T	...	..C	..A	...	...	..A	...	..T	..C	...	..C	..T	...	...	..T	...
<i>affinis</i>	...	...	...	..T	...	..C	..A	...	...	..A	...	..T	..C	...	..C	..T	...	...	..T	...
<i>algonquin</i>	...	...	...	..T	...	..C	..A	...	...	..A	...	..T	..C	...	..T	...	...	...	..T	...
<i>azteca</i>	...	..T	...	..T	...	...	..A	...	...	..A	...	...	..C	...	..T	...	...	...	..T	...
<i>subobscura</i>	...	..T	...	..T	...	...	..A	...	...	..A	...	...	..T	..T	..G	..T	...	...	..T	...
<i>madeirensis</i>	...	...	...	..T	...	...	..A	...	...	..A	...	...	..C	..T	..A	..T	...	...	..T	...
<i>guanche</i>	...	..T	...	..T	...	...	..A	..C	...	..A	...	...	..T	..A	..T	...	...	...	..T	...
<i>ambigua</i>	...	...	...	..T	...	..C	..A	...	..C	...	...	...	..C	...	..C	...	...	...	..T	...
<i>obscura</i>	..G	...	...	..C	..T	..C	...	..A	...	..C	...	...	..C	...	..C	...	...	...	..T	...
<i>subsilvestris</i>	...	...	...	..T	...	...	..A	...	..C	...	...	..T	..C	..T	..C	..T	..C	...	..C	...
<i>tristis</i>	...	..T	...	..T	..C	..C	..A	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	..T	...
<i>bifasciata</i>	...	...	...	..T	...	...	..A	..A	...	..A	...	..G	..T	...	..T	...	...	...	..T	...
<i>miranda</i>	...	...	..T	...	..T	..C	...	..A	...	..A	...	..T	...	...	...	...	...	...	..T	...
<i>ps. bogotana</i>	...	..T	..T	...	..T	..C	...	..A	...	..G	...	..T	...	...	..T	...	...	...	..C	...
<i>persimilis</i>	...	...	..T	...	..T	..C	...	..A	...	..A	...	..T	...	..C	...	..T	...	...	..C	...

	GAA	TGA	TAT	TTT	TTA	TTT	GCT	TAC	GCA	ATT	CTT	CGT	TCA	ATT	CCT	AAT	AAA	TTA	GGA	GGA
<i>yakuba</i>	...	...	...	...	...	...	..T	..T	...	..T	..A	..A	..T	...	..A	...	...	...	...	...
<i>melanogaster</i>	...	...	...	...	...	...	..T	..T	...	..A	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>affinis</i>	...	...	...	...	..C	...	..T	..T	...	..A	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>algonquin</i>	...	...	...	...	..C	...	..T	..T	...	..A	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>azteca</i>	...	...	...	...	..C	...	..T	..T	...	..A	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>subobscura</i>	...	...	...	...	...	..C	...	..T	...	..A	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>madeirensis</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>guanche</i>	...	...	...	...	...	..C	...	..T	...	..A	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ambigua</i>	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	..A	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>obscura</i>	...	...	..G	...	...	..C	...	...	...	..A	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>subsilvestris</i>	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	..A	..G	..T	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>tristis</i>	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	..A	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>bifasciata</i>	...	...	..C	...	...	...	..T	...	..T	..A	..A	...	...	...	...	...	...	..C	...	...
<i>miranda</i>	...	...	...	...	...	...	..T	...	..T	..A	...	..A	...	...	...	...	...	...	..T	...
<i>ps. bogotana</i>	...	...	...	...	..C	...	...	...	..T	..A	...	..C	..A	...	...	...	...	...	..T	...
<i>persimilis</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	..A	...	..A	...	...	...	...	...	...	..T	...

	GTT	ATT	GCA	TTA	GTT	TTA	TCA	ATT	GCA	ATT	TTA	ATA	ATT	TTA	CCT	TTT	TAT	AAT	TTA	AGA
<i>yakuba</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..T	...	...	...	...	...
<i>melanogaster</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..T	...	...	...	...	...
<i>affinis</i>	..A	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>algonquin</i>	..A	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>azteca</i>	..A	..C	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>subobscura</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>madeirensis</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>guanche</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ambigua</i>	..A	...	..T	...	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...
<i>obscura</i>	..A	..C	..T	...	..A	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...
<i>subsilvestris</i>	..A	..C	...	..C	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...
<i>tristis</i>	..G	...	..T	...	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...
<i>bifasciata</i>	..A	...	..C	..A	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...
<i>miranda</i>	..A	...	...	..G	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..CA	...	..AA	...
<i>ps. bogotana</i>	..A	...	...	..A	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...
<i>persimilis</i>	..A	...	...	..A	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...





	TGA	TGA	GAT	AAT	TTA	TTA	AAT	TAA
<i>yakuba</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>melanogaster</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>affinis</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>algonquin</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>azteca</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>subobscura</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>madeirensis</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>guanche</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ambigua</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>obscura</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>subsilvestris</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>tristis</i>	...	...	...	...	...	C.	...	...
<i>bifasciata</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>miranda</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ps. bogotana</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>persimilis</i>	...	...	...	...	...	...	...	...



<i>yakuba</i>	CCT	AAT	AAA	GTT	GGT	TTA	ATA	GGA	ATT	CCT	CAA	CCT	TTT	TGT	GAT	GCA	ATT	AAA	TTA	TTT
<i>melanogaster</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...
<i>affinis</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>algonquin</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>azteca</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...
<i>subobscura</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...
<i>madeirensis</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...
<i>guanche</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...
<i>ambigua</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...
<i>obscura</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...
<i>tristis</i>	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...
<i>subsilvestris</i>	..A	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...
<i>bifasciata</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...
<i>miranda</i>	..A	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ps. bogotana</i>	..A	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>persimilis</i>	..A	...	...	..A	...	...	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

<i>yakuba</i>	ACA	AAA	GAA	CAA	ACT	TAT	CCA	TTA	TTA	TCA	AAT	TAT	TTA	AGA	TAT	TAT	ATT	TCT	CCT	ATT
<i>melanogaster</i>	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...
<i>affinis</i>	...	..G	...	...	...	...	..T	C..T	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...
<i>algonquin</i>	...	..G	...	..G	...	...	..T	C..T	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...
<i>azteca</i>	...	..G	...	...	...	...	..T	C..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>subobscura</i>	...	..G	...	...	...	...	..T	C..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>madeirensis</i>	...	..G	...	...	...	...	..T	C..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>guanche</i>	...	..G	...	...	...	...	..T	C..T	...	..T	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...
<i>ambigua</i>	...	..G	...	...	...	...	..T	C..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...
<i>obscura</i>	...	...	...	...	..C	..T	C..T	..G	..T	...	...	...	...	...	...	..C	...	..A	...	...
<i>tristis</i>	...	...	...	...	...	..T	C..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>subsilvestris</i>	...	...	...	...	...	..T	C..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...
<i>bifasciata</i>	...	...	...	...	...	..T	C..T	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..A	...
<i>miranda</i>	...	...	...	...	...	..T	C..T	..G	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ps. bogotana</i>	...	...	...	...	...	..T	C..T	..G	..GT	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>persimilis</i>	...	...	...	...	...	..T	C..T	..G	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

<i>yakuba</i>	TTT	TCT	TTA	TTT	TTA	TCT	TTA	TTT	STT	TGA	ATA	TGT	ATA	CCT	TTT	TTT	GTT	AAA	TTA	TAC
<i>melanogaster</i>	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	..A	...	...	..T	...
<i>affinis</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...
<i>algonquin</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...
<i>azteca</i>	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...
<i>subobscura</i>	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...
<i>madeirensis</i>	...	...	...	...	..A	..G	...	..G	...	..C	...	...	...	...	...	..G	...	..T	...	...
<i>guanche</i>	..C	...	...	...	..A	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..T	...
<i>ambigua</i>	..C	..A	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...
<i>obscura</i>	...	..A	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	..T	...
<i>tristis</i>	...	..A	...	..G	...	...	..G	...	..G	...	..G	...	...	...	...	...	...	..T	...	...
<i>subsilvestris</i>	...	...	...	..G	...	...	..G	...	..G	...	..G	...	...	..G	..G	..T	...	...	...	...
<i>bifasciata</i>	...	..A	...	..G	...	..A	...	..G	...	...	...	...	...	..G	..GT	..T	...	...	...	...
<i>miranda</i>	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...
<i>ps. bogotana</i>	...	..A	...	..G	..GA	...	..G	...	...	...	...	...	...	..C	...	..T	...	...	...	...
<i>persimilis</i>	...	..A	...	..G	..A	...	..G	...	...	...	...	...	...	..C	...	..T	...	...	...	...

<i>yakuba</i>	TCT	TTT	AAT	TTA	GGT	GGA	TTA	TTT	TTT	TTA	TGT	TGT	ACA	AGA	TTA	GGA	GTT	TAT	ACA	GTT
<i>melanogaster</i>	...	...	...	..G	...	..T	...	...	...	...	...	...	..T	...	..G	..G	...	...	..T	...
<i>affinis</i>	..A	...	...	...	..A	..T	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	..G	...	...	...	...
<i>algonquin</i>	..A	...	...	...	..A	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...
<i>azteca</i>	..A	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	..T	...	...	...	...
<i>subobscura</i>	..A	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	..T	...	...	...	...
<i>madeirensis</i>	..A	...	...	...	...	..T	...	...	...	..C	...	..T	...	...	..T	...	...	...	...	...
<i>guanche</i>	..A	...	...	...	..G	..T	...	...	...	...	...	..T	...	..G	..T	..A	..C	...	...	...
<i>ambigua</i>	...	...	...	...	..G	..T	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	..T	...
<i>obscura</i>	...	...	...	...	..G	..T	...	...	...	...	...	..T	...	C..	..T	...	...	..T	...	...
<i>tristis</i>	...	...	...	..G	..G	..T	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	..T	...	...
<i>subsilvestris</i>	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	..T	...	..G	...	...	...	..T	..G	...
<i>bifasciata</i>	...	...	..C	...	..G	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	..T	...	...
<i>miranda</i>	...	...	..C	...	..A	...	...	...	..C	...	..T	...	...	...	...	...	...	..T	..A	...
<i>ps. bogotana</i>	...	...	...	...	..G	..G	..G	...	...	..C	...	..T	...	...	...	...	...	..T	..A	...
<i>persimilis</i>	...	...	...	...	..G	..G	..G	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	..T	..A	...

<i>yakuba</i>	ATA	GTA	GCT	GGC	TGA	TCT	TCT	AAT	TCT	AAT	TAT	GCT	TTA	TTA	GGG	GGT	TTA	CGA	GCT	GTG
<i>melanogaster</i>	...	...	...	..T	..G	..G	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	..G	...	...	...	...
<i>affinis</i>	...	..T	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...
<i>algonquin</i>	...	..T	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	..A	...
<i>azteca</i>	...	...	...	..T	...	...	...	..A	...	...	...	...	..A	...	...	..G	...	...	...	...
<i>subobscura</i>	...	...	...	..T	...	...	...	..A	...	...	...	..A	...	...	..G	...	...	...	...	...
<i>madeirensis</i>	..G	...	...	..T	..G	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...
<i>guanche</i>	...	..G	...	..T	...	..A	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...
<i>ambigua</i>	...	...	...	..T	..G	...	..A	...	...	...	..G	...	..T	..G	...	...	...	..T	...	...
<i>obscura</i>	...	...	...	..T	..G	...	..A	...	...	...	..G	...	..G	...	...	...	...	..T	...	...
<i>tristis</i>	...	..T	...	..T	G..G	...	...	...	...	..C	...	..A	..G	..G	..G	...	...	..T	...	...
<i>subsilvestris</i>	...	..T	...	..T	...	..A	..A	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	..T	...	...	...
<i>bifasciata</i>	...	...	...	..T	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>miranda</i>	...	A..T	...	..T	..G	...	..A	...	...	...	...	..T	..A	...	...	...	..T	...	...	...
<i>ps. bogotana</i>	..G	A..T	...	..T	..G	...	..A	...	...	...	...	..T	..A	...	...	...	..T	...	...	...
<i>persimilis</i>	..G	A..T	...	..T	..G	...	..A	...	...	...	...	..A	..A	...	...	...	..T	...	...	...



<i>yakuba</i>	GCT CAA ACT ATT TCT TAT GAA GTT AGA TTA GCT TTA ATT GGG TTT AAA ATT TTA TTA TTT
<i>melanogaster</i>	... .G ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .C. ... ..
<i>affinis</i>	... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... ..
<i>algonquin</i>	... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... ..
<i>azteca</i>	... .. .T ... .. .A ... .. .T ... .. .C. ... ..
<i>subobscura</i>	... .. .T ... .. .A ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... ..
<i>madeirensis</i>	... .. .T ... .. .A ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... ..
<i>guanche</i>	... .. .T ... .. .A ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... ..
<i>ambigua</i>	... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... ..
<i>obscura</i>	... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... ..
<i>tristis</i>	... .G .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... ..
<i>subsilvestris</i>	... .. .A ... .. .T ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... ..
<i>bifasciata</i>	... .. .C ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... .. .T ... ..
<i>miranda</i>	... .. .A ... .. .A .T ... .. .A C.G ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... ..
<i>ps. bogotana</i>	... .. .A ... .. .A .T ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... ..
<i>persimilis</i>	... .. .A ... .. .A .T ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... .. .A ... ..

<i>yakuba</i>	TCT TTT TTA TTG TGA ATT TTT TTT AGT AAA AAG TTA ATA GAA AAT TAA
<i>melanogaster</i>	... .A ... .A. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>affinis</i>	... .A ... .A. ... .. .A. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>algonquin</i>	... .A ... .A. ... .. .A. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>azteca</i>	... .. .A. ... .. .A. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>subobscura</i>	... .A .G .AA AT. .C. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>madeirensis</i>	..C .A .G .AA GT. ... .. .A ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>guanche</i>	... .A .G .AA AT. ... .. .A ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>ambigua</i>	... .. .G .AA AT. ... .. .A ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>obscura</i>	... .. .G .AA AT. ... .. .A ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>tristis</i>	... .A .G .AA AT. ... .. .A ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>subsilvestris</i>	... .A .G .AA AT. ... .. .A ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>bifasciata</i>	... .A .G .A. .T. ... AAA ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>miranda</i>	... .A ... .A. ... .. .AA ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>ps. bogotana</i>	... .. .A. ... .. .AA ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..
<i>persimilis</i>	... .. .A. ... .. .AA ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... .. .T. ... ..





<i>yakuba</i>	GCT	ATA	ACT	AAA	AGA	GCT	CAA	ATT	CCT	TTT	TCT	TCT	TGA	TTA	CCA	GCT	GCT	ATA	GCT	GCC
<i>melanogaster</i>	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	..G	...	..T	..A	...	...	...	..T
<i>affinis</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	..T
<i>algonquin</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	..T
<i>azteca</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	..T
<i>subobscura</i> I	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	..G	..T	...	...	...	..A	...	...
<i>subobscura</i> II	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	..A	...	..G	..T	...	...	...	..A	...	...	...
<i>madeirensis</i>	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	..T	...	...	...	..A	..A	...	...
<i>guanche</i>	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	..A	..G	...	..T	...	...	...	..A	..T	...	...
<i>ambigua</i>	...	...	..A	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	..A	...	...
<i>obscura</i>	...	...	..A	..G	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	..A
<i>subsilvestris</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	..A
<i>tristis</i>	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	..G	...	..T	...	...	...	...	...	...	..T
<i>bifasciata</i>	...	...	...	...	...	...	..A	..A	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T
<i>miranda</i>	T..	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	..T
<i>ps. bogotana</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>persimilis</i>	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T

<i>yakuba</i>	CCT	ACT	CCT	GTC	TCT	GCT	TTA	GTC	CAT	TCT	TCT	ACT	TTA	GTA	ACA	GCA	GGA	GTT	TAT	TTA
<i>melanogaster</i>	...	..A	...	..T	...	...	...	..T	...	...	...	..A	...	..T	...	..T	..T	..A	...	...
<i>affinis</i>	...	..C	...	..T	...	...	...	..T	...	...	..A	..A	..G	..T	...	..T	..G	...	...	C..T
<i>algonquin</i>	...	...	...	..T	...	...	...	..T	...	...	..A	..A	..G	..T	...	..T	..G	...	...	C..T
<i>azteca</i>	...	...	...	..T	...	...	..G	..T	...	...	..A	..A	...	..T	...	..T	..G	...	...	C..T
<i>subobscura</i> I	...	..A	...	..T	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	..T	..T	..T	...	...	...	C..T
<i>subobscura</i> II	...	..A	...	..T	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	..T	..T	..T	...	...	...	C..T
<i>madeirensis</i>	...	..A	...	..T	...	...	...	..A	...	...	...	C..	...	..T	..T	..T	...	...	...	C..T
<i>guanche</i>	...	..A	...	..T	...	...	...	..T	...	...	..A	...	...	..T	..C	..T	...	...	...	C..T
<i>ambigua</i>	...	..A	..A	..T	...	...	...	..T	...	...	..A	..G	..T	...	..T	..G	...	...	...	C..T
<i>obscura</i>	..C	..A	..A	..T	...	...	...	..T	...	...	..A	C..G	..T	...	..C	..G	...	...	...	C..T
<i>subsilvestris</i>	...	..A	...	..T	...	...	...	..T	...	...	..A	...	..T	...	..C	...	...	...	...	C..T
<i>tristis</i>	..A	..C	..G	..T	...	...	...	..T	...	...	..A	..G	..T	...	..T	..T	...	...	...	C..C
<i>bifasciata</i>	...	..G	..A	..T	...	...	..G	..T	...	...	..A	..A	..G	..T	...	..T	..T	...	...	C..T
<i>miranda</i>	...	...	...	..T	...	..G	..G	..T	...	...	...	...	..G	..T	...	..T	..G	..A	...	C..T
<i>ps. bogotana</i>	...	...	...	..T	...	..A	..G	..T	...	...	...	...	..G	..T	...	..T	..G	..A	...	C..T
<i>persimilis</i>	...	...	...	..T	...	C..	..T	...	...	...	...	..G	..T	...	..T	...	..A	...	...	C..T

<i>yakuba</i>	TTA ATT CGA TTT AAT ATT GTT TTA AGT ACT TCT TGA TTA GGA CAA TTA TTG TTG TTA TTA
<i>melanogaster</i>	... .. A.C ... ..A ... ..G ... .. A.A ..A ... ..
<i>affinis</i>	... ..T ... .. T.A ... ..A .G. ... .. C.. ..T ... ..T C.T C.T ... ..
<i>algonquin</i>	... ..T ... .. T.A ... ..A .G. ... .. ..T ... ..T C.T C.T ... ..
<i>azteca</i>	... .. .. T.A ... ..A ... ..A ... .. .. C.T C.T ... ..
<i>suboscuro I</i>	... .. .. T.A ... ..A ... .. ..C ..G ..G ..A C.A ... ..
<i>suboscuro II</i>	... .. .. T.A ... ..A ... .. ..T ..G ..G ..A C.A ... ..
<i>madeirensis</i>	... .. .. T.A ... ..A ... .. ..T ..G ... ..A ..A ... ..G
<i>guaniche</i>	... .. .. T.A ... ..A ... .. .. ..A ..A ... ..
<i>ambigua</i>	... ..T ... ..A T.G ... ..A ... .. ..G ... ..A ..A ... ..
<i>obscura</i>	... ..T ... .. T.G ... ..A ... .. ..G ..G ... ..A ..A ... C.G
<i>subsilvestris</i>	... .. .. T.G ... ..A ... .. ..T ... .. C.T ... .. C..
<i>tristis</i>	... ..T ... .. T.G ... ..A T.. ... .. ..G ..T ..A ... ..
<i>bifasciata</i>	... ..T ... .. T.A ... ..A ... .. .G A.G ..T ... .. C.T ..A ..G ...
<i>miranda</i>	... ..G ... .. T.A ... ..A ... .. ..T ... ..A ..A ... ..
<i>ps. bogotana</i>	... ..G ... .. T.A ... ..A ... .. ..T ... ..A ..A ... C..
<i>persimilis</i>	... ..G ... .. T.A ... ..A ... .. ..T ... ..A ..A ... ..

<i>yakuba</i>	TCA GGT TTA ACT ATA TTT ATA GCA GGA CTG GGG GCT AAT TTT GAG TTT GAT TTA AAG AAA
<i>melanogaster</i>	..T ..A ... ..A ... .. ..T ... T.A ..A ... ..A ... ..A ...
<i>affinis</i>	..T ... ..A ... ..G ..T ... T.A ... ..A ... ..
<i>algonquin</i>	..T ... ..A ... ..G ..T ... T.A ..A ... ..A ... ..
<i>azteca</i>	..T ... ..A ... ..T ... T.. ..A ... ..A ... ..A ...
<i>suboscuro I</i>	..T ... ..A ... ..T ... T.A ... ..A ... ..
<i>suboscuro II</i>	..T ... ..A ... ..T ... T.A ... ..A ... ..
<i>madeirensis</i>	..T ... ..A ... .. T.A ..A ... ..A ... ..
<i>guaniche</i>	..T ... ..G ..A ... ..T ... T.A ..A ... ..A ... ..A ...
<i>ambigua</i>	..T ... ..T T.A ... ..A ... ..A ... ..
<i>obscura</i>	..T ... ..T T.A ... ..A ... ..A ... ..
<i>subsilvestris</i>	... ..G ... ..A ... ..T ..T T.A ..A ... ..A ... ..A ...
<i>tristis</i>	..T ... ..A ... ..T T.A ... ..A ... ..A ... ..
<i>bifasciata</i>	..T ..G ... ..T ... ..A ... ..A ... ..A ... ..
<i>miranda</i>	..T ... ..T ..T T.A ..T ... ..A ... ..A ... ..
<i>ps. bogotana</i>	..T ... ..G ..T ..T T.A ... ..A ... ..C ... ..A ...
<i>persimilis</i>	..T ... ..G ..T ..T T.A ..A ... ..A ... ..A ... ..

<i>yakuba</i>	ATT	ATT	GCG	TTG	TCA	ACT	CTT	AGT	CAA	TTA	GGA	TTA	ATA	ATA	AGA	ATT
<i>melanogaster</i>	...	...	.T	.A	.T	...	T.A	...	...	...	.T	...	...	...	...	...
<i>affinis</i>	...	...	.T	.A	...	...	T.A	.A	...	...	.T	...	...	.G	...	...
<i>algonquin</i>	...	...	.T	.A	...	...	T.A	.A	...	...	.T	...	...	.G	...	...
<i>azteca</i>	...	...	.T	.A	...	...	T.A	.A	...	...	.T	...	...	...	...	...
<i>subobscura I</i>	...	...	.T	.A	...	...	T.G	.A	...	...	.G	...	...	...	...	...
<i>subobscura II</i>	...	...	.T	.A	...	...	T.G	.A	...	...	.G	...	...	...	...	...
<i>madeirensis</i>	...	...	.C	.A	...	...	T.G	.A	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>guanche</i>	...	...	.T	.A	...	.A	T.A	.A	...	...	.G	...	...	.G	...	...
<i>ambigua</i>	...	...	.T	...	...	...	T.G	.A	...	...	.G	...	...	.G	...	...
<i>obscura</i>	...	...	.T	...	...	...	T.G	.A	...	...	.G	...	...	.G	...	...
<i>subsilvestris</i>	...	...	.T	.A	...	...	T.A	.A	...	...	.T	...	...	...	...	...
<i>tristis</i>	...	...	.T	...	...	...	T.A	.A	...	...	.G	...	...	.G	...	...
<i>bifasciata</i>	...	...	.T	.A	.G	...	T.A	.A	...	...	.T	...	.G	...	...	...
<i>miranda</i>	...	...	.T	.A	...	...	.A	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ps. bogotana</i>	...	...	.T	.A	...	...	.A	...	...	...	.G	...	.G	...	...	...
<i>persimilis</i>	...	...	.T	...	...	...	.A	...	...	...	.G	...	...	...	...	...

**Figura 17a.** Región intergénica 1 (entre los genes Ser-tRNA y cytb).

<i>yakuba</i>	AATTAA
<i>melanogaster</i>	.T----
<i>affinis</i>	T-----
<i>algonquin</i>	T-----
<i>azteca</i>	T-----
<i>subobscura</i>	..-----
<i>madeirensis</i>	..-----
<i>guanche</i>	G.-----
<i>ambigua</i>	..-----
<i>obscura</i>	..-----
<i>subsilvestris</i>	..-----
<i>tristis</i>	..-----
<i>bifasciata</i>	..-----
<i>miranda</i>	..-----
<i>ps. bogotana</i>	..-----
<i>persimilis</i>	..-----

**Figura 17b.** Región intergénica 2 (entre los genes ND1 y Ser-tRNA). Para *D. yakuba* es codificante.

<i>yakuba</i>	tgaatttttttagtaaaaaagttaatagaaaattaa
<i>melanogaster</i>	.....-.....
<i>affinis</i>	.....A.....--.....
<i>algonquin</i>	.....A.....--.....
<i>azteca</i>	.....A.....--.....
<i>subobscura</i>	AT..C.....--.....T.
<i>madeirensis</i>	GT.....A.....--.....T.
<i>guanche</i>	AT.....A.....--.....T.
<i>ambigua</i>	AT.....A.....--.....T.
<i>obscura</i>	AT.....A.....--.....T.
<i>subsilvestris</i>	AT.....A.....--.....G..T.
<i>tristis</i>	AT.....A.....--.....T.
<i>bifasciata</i>	.T...AAA.....--.....G....
<i>miranda</i>	.....AA.....--.....
<i>ps. bogotana</i>	.....AA.....--.....
<i>persimilis</i>	.....AA.....--.....

**Figura 17 c.** Región intergénica 3 (genes Leu-tRNA y ND1). En minúscula se señala la parte de la secuencia del gen Leu-tRNA que forma parte del sitio de restricción *ScaI* conservado en todas las especies de *Drosophila* analizadas por restricción.

	<i>ScaI</i>
<i>yakuba</i>	_____
<i>melanogaster</i>	agtaCTTGTTTT
<i>affinis</i>	.....
<i>algonquin</i>	.....
<i>azteca</i>	.....
<i>subobscura</i>	.....
<i>madeirensis</i>	.....
<i>guanche</i>	.....
<i>ambigua</i>	.....
<i>obscura</i>	.....
<i>subsilvestris</i>	.....
<i>tristis</i>	.....
<i>bifasciata</i>	.....
<i>miranda</i>	.....
<i>ps. bogotana</i>	.....
<i>persimilis</i>	.....

**Figura 17 d.** Región intergénica 4 (genes lrRNA y Leu-tRNA):

<i>yakuba</i>	TATATAATAA
<i>melanogaster</i>	....----AA
<i>affinis</i>	...G..TA..
<i>algonquin</i>	...G..TA..
<i>azteca</i>	.....--..
<i>subobscura</i>	....-----
<i>madeirensis</i>	....-----
<i>guanche</i>	C....-----
<i>ambigua</i>	....--A..
<i>obscura</i>	.....TA..
<i>subsilvestris</i>	....--TA..
<i>tristis</i>	.....TA..
<i>bifasciata</i>	.TA..T....
<i>miranda</i>	....A.TA..
<i>ps. bogotana</i>	.....TA..
<i>persimilis</i>	.....TA..

alineamiento de las regiones intergénicas. En todas ellas se han incorporado las secuencias de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985a) y *D. melanogaster* (Garesse, 1988), especies del grupo *melanogaster*, como referencia externa al grupo *obscura*.

### 3.1. Variabilidad del gen del RNA ribosómico grande mitocondrial.

En la Figura 12 se muestra el alineamiento de las secuencias correspondientes a la región 5' del gen del RNA ribosómico grande 16S (1rRNA) mitocondrial de las especies del grupo *obscura*. Esta región corresponde a las posiciones nucleotídicas 13438 a 13139 (secuenciado a partir del sitio *EcoRI*-1, Figura 10) y 12833 a 12733 (a partir del sitio *EcoRI*-2) de la secuencia de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985a).

En la Figura 18 se representa la estructura secundaria propuesta para el gen del rRNA 16S de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985b). En ella se señalan con un círculo las sustituciones nucleotídicas ocurridas en las distintas especies del grupo *obscura*. La mayoría de los cambios observados (46.7%) se producen en posiciones nucleotídicas de regiones desapareadas, es decir, en lazos de la estructura secundaria propuesta sin función o implicados en las estructuras terciaria y/o cuaternaria (interacción con otros RNAs o proteínas ribosómicas). Otra fracción (8.9%) mantiene la estructura secundaria, siendo la mayor parte de ellos transiciones A-G o C-T que implican reemplazamientos de los pares A-U por G-U o G-C por G-U, o viceversa, y en un único caso (sustituciones 9 y 10 de la Figura 18), se ha observado un reemplazamiento del par A-U por el G-C (*D. ambigua*, *D. obscura*, *D. tristis*, *D. subsilvestris* y *D. bifasciata*). Una única sustitución (la 28 de T a A de la Figura 18) recupera un apareamiento a partir de un par desapareado en *D. azteca*, *D. guanche* y *D. subsilvestris*.

Otras sustituciones (8.9%) ocurren en una región de la que se desconoce la secuencia de la hebra complementaria, por no incluirse entre las regiones secuenciadas en el presente estudio.

Es de resaltar la fracción de sustituciones que implican la ruptura de la estructura de algunos de los dominios ribosómicos (28.9%). De entre estos





cambios, destacan los acontecidos en el extremo 3' del gen (50%), donde se postula la existencia de una horquilla en *D. yakuba*. En el resto de especies de *Drosophila* se observa, para esta zona, una serie de sustituciones y deleciones que desorganizan la estructura secundaria postulada. Más bien podría tratarse de una secuencia intergénica entre los genes lrRNA y Leu-tRNA.

Otra de las regiones, cuya estructura se ve afectada por las sustituciones, es la horquilla remarcada en la Figura 18 (letra A). Por ello pensamos que la estructura propuesta por Clary y Wolstenholme (1985b) para *D. yakuba*, al menos para esa región, es incorrecta. Dado que dicha región ha sido secuenciada en otras especies de *Drosophila* (Garesse, 1988; DeSalle et al., 1987), hemos comprobado también el efecto de las sustituciones nucleotídicas observadas en esas especies sobre la estructura secundaria propuesta para esta horquilla. La Figura 19 recoge los resultados de este análisis. En a) se contempla la estructura propuesta por Clary y Wolstenholme (1985b), y en b) la estructura determinada para cada una de las especies secuenciadas, mediante el análisis de la estabilidad según los criterios de mínima energía de Zucker (ver Jaeger et al., 1990), utilizando el programa FOLDING del paquete GCG.

Por último, en la Tabla 8 se muestran las sustituciones nucleotídicas y sus varianzas por sitio, determinadas por el método de Kimura de 2 parámetros (1980) para la región secuenciada del gen lrRNA mitocondrial entre pares de genes de las distintas especies.

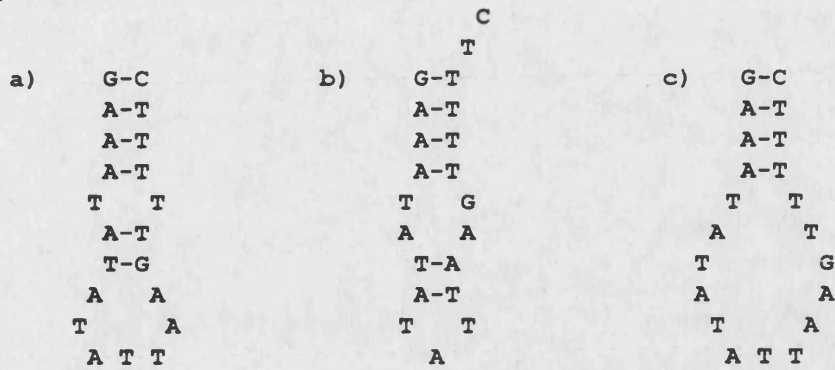
### 3.2. Variabilidad de los genes codificantes de tRNAs.

Las regiones secuenciadas contienen dos genes codificantes para tRNAs, el de la Serina para la familia de codones UCN y el de la Leucina para la familia de codones CUN, cuyos alineamientos se muestran en la Figura 13. La estructura propuesta para estos tRNAs en *D. yakuba* (Clary et al., 1983) se recoge en la Figura 20. En ella, se señalan las sustituciones nucleotídicas acontecidas en la evolución de las especies del grupo *obscura*.

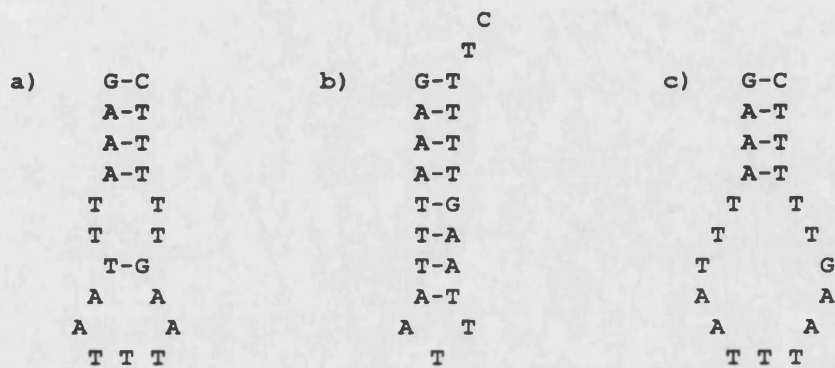
En el gen Leu-tRNA, la mayoría de las sustituciones se dan en zonas desapareadas (62.5%), siendo la región más variable el lazo Timina-



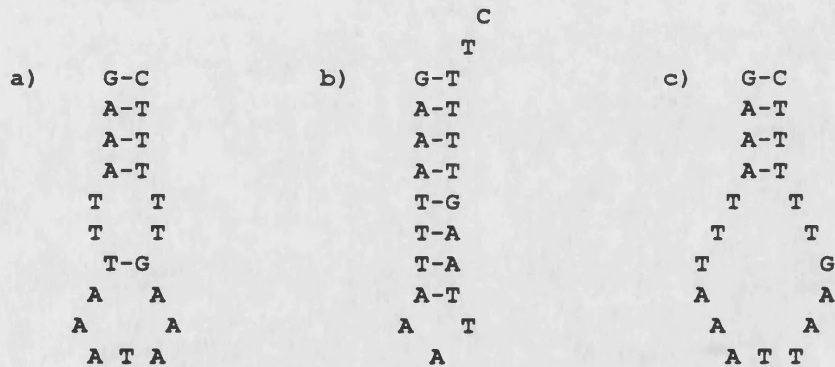
*D. yakuba*:



*D. ambigua*, *D. obscura* y *D. bifasciata*:



Restantes especies del grupo *obscura*:



**Figura 19.** Estructuras secundarias alternativas a la propuesta por Clary y Wolstenholme (1985b) para la región del rRNA 16S mitocondrial de *D. yakuba* comprendida entre las posiciones 13375 y 13395 de la secuencia completa del genoma mitocondrial (Clary y Wolstenholme, 1985a), deducidas a partir de la comparación de las secuencias de dicha región entre diferentes especies de *Drosophila*. En a) estructura propuesta por Clary y Wolstenholme (1985b), en b) estructura más estable obtenida mediante el método de Zucker (ver Jaeger et al., 1990), en c) estructura secundaria más estable manteniendo los apareamientos del modelo de Clary y Wolstenholme.

**Tabla 8.** Divergencias nucleotídicas y sus varianzas para la región secuenciada del gen lrRNA entre pares de especies de *Drosophila* del grupo *obscura*. Las divergencias fueron determinadas por el método de Kimura (1980) de 2 parámetros.

MATRIZ DE DISTANCIAS DE KIMURA (2 PARAMETROS).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BiF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0358	-														
AFF	0.0437	0.0530	-													
ALG	0.0495	0.0590	0.0107	-												
AZT	0.0412	0.0504	0.0054	0.0108	-											
SUB	0.0416	0.0477	0.0136	0.0192	0.0191	-										
MAD	0.0416	0.0477	0.0136	0.0192	0.0191	0.0000	-									
GUA	0.0472	0.0533	0.0191	0.0247	0.0191	0.0054	0.0054	-								
AMB	0.0470	0.0533	0.0301	0.0302	0.0301	0.0219	0.0219	0.0274	-							
OBS	0.0493	0.0530	0.0325	0.0326	0.0272	0.0247	0.0247	0.0302	0.0027	-						
SSV	0.0437	0.0473	0.0325	0.0326	0.0272	0.0247	0.0247	0.0302	0.0135	0.0107	-					
TRI	0.0522	0.0502	0.0353	0.0354	0.0300	0.0275	0.0275	0.0330	0.0108	0.0080	0.0134	-				
BIF	0.0465	0.0530	0.0522	0.0495	0.0469	0.0387	0.0387	0.0443	0.0245	0.0243	0.0298	0.0325	-			
MIR	0.0437	0.0502	0.0107	0.0216	0.0108	0.0191	0.0191	0.0246	0.0301	0.0325	0.0325	0.0353	0.0522	-		
BOG	0.0437	0.0589	0.0325	0.0382	0.0356	0.0247	0.0247	0.0302	0.0329	0.0353	0.0381	0.0381	0.0353	0.0325	-	
PER	0.0437	0.0589	0.0325	0.0382	0.0356	0.0247	0.0247	0.0302	0.0329	0.0353	0.0381	0.0381	0.0353	0.0325	0.0000	-

MATRIZ DE VARIANZAS DE LAS DISTANCIAS.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0001	-														
AFF	0.0001	0.0002	-													
ALG	0.0001	0.0002	0.0000	-												
AZT	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	-											
SUB	0.0001	0.0001	0.0000	0.0001	0.0001	-										
MAD	0.0001	0.0001	0.0000	0.0001	0.0001	0.0000	-									
GUA	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	-								
AMB	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-							
OBS	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	-						
SSV	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	-					
TRI	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	-				
BIF	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-			
MIR	0.0001	0.0001	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-		
BOG	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-	
PER	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	-

Abreviaturas: YAK, *yakuba*; MEL, *melanogaster*; AFF, *affinis*; ALG, *algonquin*; AZT, *azteca*; SUB, *subobscura*; MAD, *madeirensis*; GUA, *guanche*; AMB, *ambigua*; OBS, *obscura*; SSV, *subsilvestris*; TRI, *tristis*; BIF, *bifasciata*; MIR, *miranda*; BOG, *pseudoobscura bogotana*; PER, *persimilis*.



Pseudouracilo-Citosina (37.5%), donde todas las sustituciones observadas son transversiones: 66.7% T-A y 33.3% T-G.

Las únicas sustituciones que se producen en las zonas apareadas son transiciones G -A (50%), ya que mantienen el apareamiento. De este modo el par A-U pasa a G-U. Entre las posiciones donde han tenido lugar este tipo de transición destaca el primer nucleótido del gen que discrimina los grupos *obscura* y *melanogasteres* (G en todas las especies del grupo *obscura*, y A en las dos del *melanogaster*).

El gen Ser-tRNA muestra un menor número de sitios polimórficos que el del Leu-tRNA (6 y 8 respectivamente). No obstante, las sustituciones en el gen Ser-tRNA afectan a un número mayor de especies, lo que implica una mayor variabilidad (Tabla 9). El 66.7% de las sustituciones tienen lugar en lazos desapareados (Figura 20). Los dos únicos cambios en zonas apareadas, se localizan en la proximidad del lazo del anticodón, y son una transición G-A (en *D. guanche*) y una C-T (en *D. subsilvestris*) que mantienen la estructura secundaria, ya que el par U-A pasa a U-G y el G -C a G-U.

Los genes codificantes de tRNAs son los más conservados de los secuenciados. Las Tabla 9a y 9b muestran las estimas de las divergencias nucleotídicas, con sus varianzas, siguiendo el método de Kimura de 2 parámetros entre pares de especies para los genes Ser-tRNA y Leu-tRNA, respectivamente.

### **3.3. Variabilidad de los genes codificantes de proteínas.**

Las diferentes zonas secuenciadas de los genomas mitocondriales de las especies de *Drosophila* del grupo *obscura*, contenían la secuencia parcial de los genes de las siguientes cadenas polipeptídicas: subunidades 1 y 5 del complejo de la NADH-Deshidrogenasa, y el citocromo b del complejo b-c<sub>1</sub> (ver Figura 11).

#### **3.3.1. Variabilidad del gen del citocromo b.**

**Tabla 9a.** Divergencias nucleotídicas y varianzas para la región secuenciada del gen tRNA de la Serina (UCN) entre pares de especies de *Drosophila* del grupo *obscura*.

MATRIZ DE DISTANCIAS DE KIMURA (2 PARAMETROS).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	TRI	SSV	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0309	-														
AFF	0.0153	0.0153	-													
ALG	0.0153	0.0153	0.0000	-												
AZT	0.0309	0.0000	0.0153	0.0153	-											
SUB	0.0799	0.0469	0.0632	0.0632	0.0469	-										
MAD	0.0469	0.0153	0.0309	0.0309	0.0153	0.0309	-									
GUA	0.0469	0.0469	0.0632	0.0632	0.0469	0.0632	0.0309	-								
AMB	0.0469	0.0153	0.0309	0.0309	0.0153	0.0309	0.0000	0.0309	-							
OBS	0.0469	0.0153	0.0309	0.0309	0.0153	0.0309	0.0000	0.0309	0.0000	-						
TRI	0.0469	0.0469	0.0309	0.0309	0.0469	0.0632	0.0309	0.0632	0.0309	0.0309	-					
SSV	0.0469	0.0469	0.0632	0.0632	0.0469	0.0632	0.0309	0.0309	0.0309	0.0309	0.0632	-				
BIF	0.0469	0.0153	0.0309	0.0309	0.0153	0.0632	0.0309	0.0632	0.0309	0.0309	0.0309	0.0632	-			
MIR	0.0309	0.0000	0.0153	0.0153	0.0000	0.0469	0.0153	0.0469	0.0153	0.0153	0.0469	0.0469	0.0153	-		
BOG	0.0309	0.0000	0.0153	0.0153	0.0000	0.0469	0.0153	0.0469	0.0153	0.0153	0.0469	0.0469	0.0153	0.0000	-	
PER	0.0309	0.0000	0.0153	0.0153	0.0000	0.0469	0.0153	0.0469	0.0153	0.0153	0.0469	0.0469	0.0153	0.0000	0.0000	-

MATRIZ DE VARIANZAS DE LAS DISTANCIAS.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	TRI	SSV	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0005	-														
AFF	0.0002	0.0002	-													
ALG	0.0002	0.0002	0.0000	-												
AZT	0.0005	0.0000	0.0002	0.0002	-											
SUB	0.0013	0.0007	0.0010	0.0010	0.0007	-										
MAD	0.0007	0.0002	0.0005	0.0005	0.0002	0.0005	-									
GUA	0.0007	0.0007	0.0010	0.0010	0.0007	0.0010	0.0005	-								
AMB	0.0007	0.0002	0.0005	0.0005	0.0002	0.0005	0.0000	0.0005	-							
OBS	0.0007	0.0002	0.0005	0.0005	0.0002	0.0005	0.0000	0.0005	0.0000	-						
TRI	0.0007	0.0007	0.0005	0.0005	0.0007	0.0010	0.0005	0.0010	0.0005	0.0005	-					
SSV	0.0007	0.0007	0.0010	0.0010	0.0007	0.0010	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0010	-				
BIF	0.0007	0.0002	0.0005	0.0005	0.0002	0.0010	0.0005	0.0010	0.0005	0.0005	0.0005	0.0010	-			
MIR	0.0005	0.0000	0.0002	0.0002	0.0000	0.0007	0.0002	0.0007	0.0002	0.0002	0.0007	0.0007	0.0002	-		
BOG	0.0005	0.0000	0.0002	0.0002	0.0000	0.0007	0.0002	0.0007	0.0002	0.0002	0.0007	0.0007	0.0002	0.0000	-	
PER	0.0005	0.0000	0.0002	0.0002	0.0000	0.0007	0.0002	0.0007	0.0002	0.0002	0.0007	0.0007	0.0002	0.0000	0.0000	-

Abreviaturas como en la Tabla 8.

**Tabla 9b.** Divergencias nucleotídicas y varianzas para la región secuenciada del gen tRNA de la Leucina (CUN) de las especies de *Drosophila* del grupo *obscura*. Las divergencias fueron determinadas por el método de Kimura (1980) de 2 parámetros.

MATRIZ DE DISTANCIAS DE KIMURA (2 PARAMETROS).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	TRI	SSV	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0155	-														
AFF	0.0476	0.0642	-													
ALG	0.0476	0.0642	0.0000	-												
AZT	0.0476	0.0642	0.0000	0.0000	-											
SUB	0.0476	0.0642	0.0314	0.0314	0.0314	-										
MAD	0.0476	0.0642	0.0314	0.0314	0.0314	0.0000	-									
GUA	0.0476	0.0642	0.0314	0.0314	0.0314	0.0000	0.0000	-								
AMB	0.0314	0.0476	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	-							
OBS	0.0314	0.0476	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0000	-						
TRI	0.0314	0.0476	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0000	0.0000	-					
SSV	0.0476	0.0642	0.0314	0.0314	0.0314	0.0000	0.0000	0.0000	0.0155	0.0155	0.0155	-				
BIF	0.0985	0.1163	0.0812	0.0812	0.0812	0.0476	0.0476	0.0476	0.0642	0.0642	0.0642	0.0476	-			
MIR	0.0314	0.0476	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0000	0.0000	0.0000	0.0155	0.0642	-		
BOG	0.0314	0.0476	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0000	0.0000	0.0000	0.0155	0.0642	0.0000	-	
PER	0.0314	0.0476	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0155	0.0000	0.0000	0.0000	0.0155	0.0642	0.0000	0.0000	-

MATRIZ DE VARIANZAS DE LAS DISTANCIAS.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	TRI	SSV	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0002	-														
AFF	0.0008	0.0011	-													
ALG	0.0008	0.0011	0.0000	-												
AZT	0.0008	0.0011	0.0000	0.0000	-											
SUB	0.0008	0.0011	0.0005	0.0005	0.0005	-										
MAD	0.0008	0.0011	0.0005	0.0005	0.0005	0.0000	-									
GUA	0.0008	0.0011	0.0005	0.0005	0.0005	0.0000	0.0000	-								
AMB	0.0005	0.0008	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	-							
OBS	0.0005	0.0008	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0000	-						
TRI	0.0005	0.0008	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0000	0.0000	-					
SSV	0.0008	0.0011	0.0005	0.0005	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0002	0.0002	-				
BIF	0.0017	0.0020	0.0014	0.0014	0.0014	0.0008	0.0008	0.0008	0.0011	0.0011	0.0011	0.0008	-			
MIR	0.0005	0.0008	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0011	-		
BOG	0.0005	0.0008	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0011	0.0000	-	
PER	0.0005	0.0008	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0011	0.0000	0.0000	-

Abreviaturas como en la Tabla 8.

Entre las regiones secuenciadas en el presente estudio se halla la zona 3' del gen del citocromo b, cuyo alineamiento se puede observar en la Figura 14.

A partir de estas secuencias, se obtuvo la secuencia aminoacídica para cada una de las especies del grupo *obscura*. La Figura 21 muestra el alineamiento de los aminoácidos de la región carboxilo terminal del citocromo b de las especies estudiadas, del residuo 211 al 378 y último. Como se puede observar, sólo son variables, entre las especies del grupo *obscura* un 6.6% de los aminoácidos, que se eleva a un 11.4% si consideramos las especies de referencia, *D.yakuba* y *D. melanogaster*. La mayor parte de reemplazamientos son entre aminoácidos de similares características (59.1%), y entre ellos destacan los reemplazamientos entre aminoácidos apolares grandes (92.3% de entre los de similares características).

Cuando situamos los reemplazamientos en el modelo estructural del citocromo b de Howell y Gilbert (1988) de ocho hélices alfa de transmembrana, tal como se recoge en la Figura 22, se observa que la mayor parte de los reemplazamientos entre aminoácidos no modifican el plegamiento postulado para la proteína, ya que los reemplazamientos en las hélices son entre aminoácidos de características semejantes que no modifican la estructura secundaria. Estos análisis se realizaron utilizando los programas RAOARGOS, SOAP y HELIXMEM del PCGENE, basados en los métodos de Rao y Argos (1986), Klein et al. (1983) y Eisenberg et al. (1984), respectivamente. En el caso de reemplazamientos entre aminoácidos de características muy diferentes, éstos tienen lugar en las zonas interhélices de conformación extendida situadas, bien hacia la matriz mitocondrial, bien hacia el espacio intermembranoso.

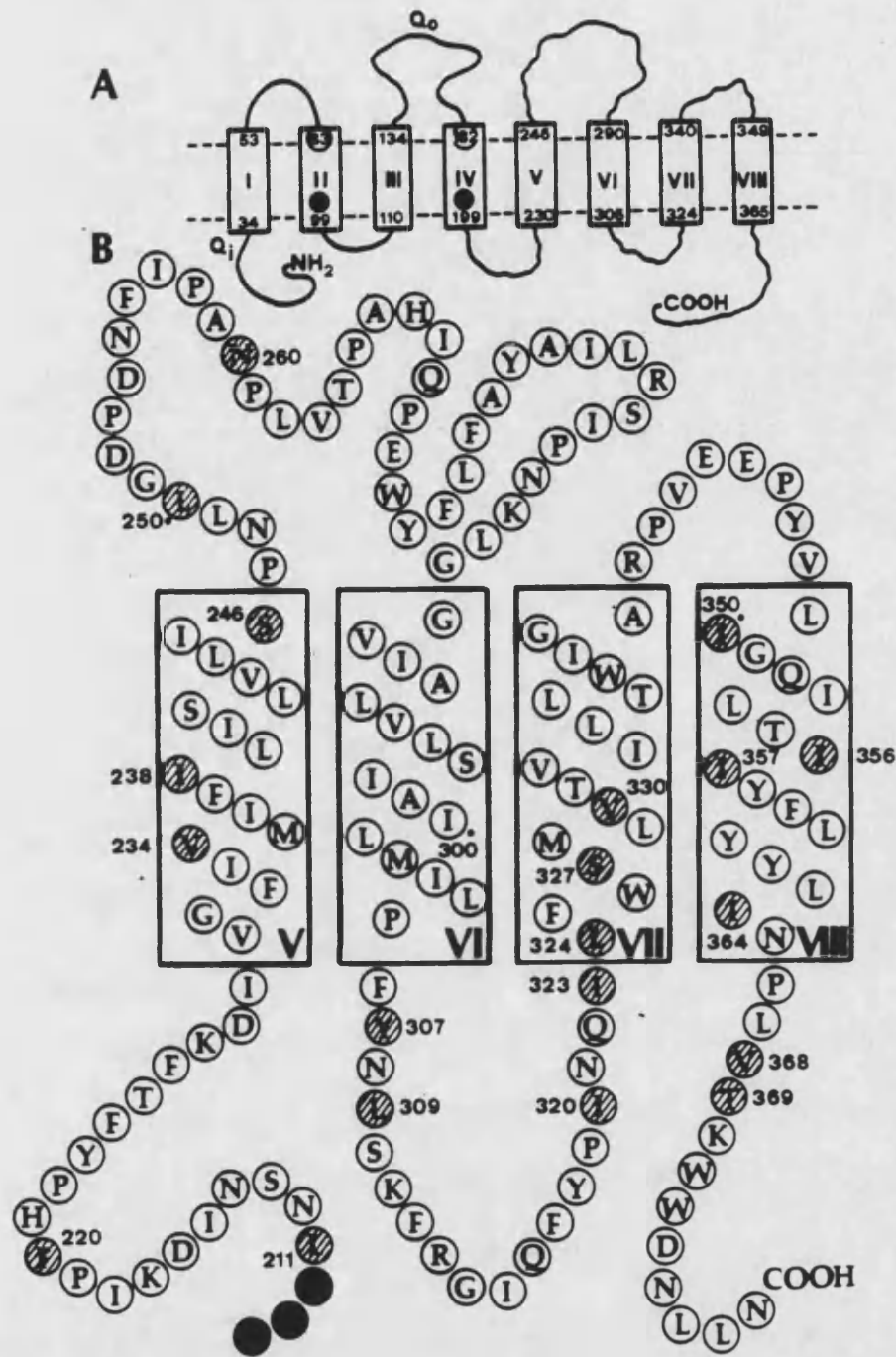
Por otra parte, según el modelo de Howell y Gilbert (1988), los aminoácidos implicados en la unión con los grupos hemo son las His83 e His182 para el centro hemo b566, y las His97 e His196 para el hemo b562; y los aminoácidos involucrados en la interacción y oxidación de la ubiquinona ( $Q_o$ ) sería la serie altamente conservada situada entre la Gly142 y la Thr147, y el centro de reducción de la ubiquinona ( $Q_i$ ) se situaría en el primer dominio de transmembrana y en la zona de extramembrana amino terminal. Por tanto, según el modelo, los dominios C-terminal no estarían implicados en el transporte de electrones, y aunque su función no está precisada, parece no



**Figura 21.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la región secuenciada del citocromo b (extremo Ct).







**Figura 22.** Modelo estructural de la enzima citocromo b según Howell y Gilbert (1988). En A) se representa la estructura global de los ocho dominios de alfa hélice con las posiciones que los delimitan. Con círculos se indican las posiciones de las His implicadas en la unión a los hemo. Qi y Qo señalan las zonas de los centros activos implicados en la reducción y oxidación, respectivamente, de la ubiquinona. En B) se representan las posiciones aminoacídicas del gen *cytb* de *D. yakuba* correspondientes a la región secuenciada. En sombreado se muestran los aminoácidos que han sido reemplazados en las especies del grupo *obscura*.

existir ningún tipo de constricción funcional, ya que se trata de la región más variable de la proteína. Así, en las especies de *Drosophila* se observa que la variabilidad aminoacídica se concentra, principalmente, en los últimos 75 residuos (69.2% en el grupo *obscura*).

Finalmente, las Tablas 10 y 11 muestran las divergencias nucleotídicas determinadas para la zona secuenciada codificante del citocromo b entre las distintas especies analizadas. La Tabla 10 muestra las divergencias globales y la Tabla 11 el número de sustituciones por sitio sinónimas y no sinónimas. Para las estimaciones de estas dos últimas hemos seguido el procedimiento de Nei y Gojobori (1986).

### **3.3.2. Variabilidad del gen de la subunidad 1 de la NADH-Deshidrogenasa.**

La NADH-Deshidrogenasa constituye el mayor de los complejos enzimáticos respiratorios, de unos 800 KDa, formado por más de 22 cadenas polipeptídicas. De ellas, 7 componentes de la fracción hidrofóbica se encuentran codificadas en el genoma mitocondrial (del ND1 al ND6 y el ND4L). Entre las regiones analizadas en el presente trabajo, se encuentran las secuencias parciales de dos de dichas subunidades, ND1 y ND5.

Del gen ND1 se ha secuenciado el extremo 5' y una pequeña parte del extremo 3', tal como se puede observar en la Figura 11. El alineamiento de las secuencias de este gen queda recogido en la Figura 15.

Cuando se traducen a aminoácidos las regiones secuenciadas (ver alineamiento en la Figura 23), destaca la menor longitud del extremo carboxilo terminal de las especies del grupo *obscura* y *D. melanogaster* respecto a *D. yakuba* que posee 12 aminoácidos más.

La sustitución de una T por una A en la segunda posición del codón TTG de la Leu313 de *D. yakuba* genera un codón de parada TAG en las especies de los subgrupos *affinis*, *pseudoobscura* y en *D. bifasciata*, y por posterior transición G -A en la tercera base, un codón de parada TAA en el resto de especies analizadas. Este mismo fenómeno se observa en *D. melanogaster*, y ya fué señalado por Garesse (1988).

**Tabla 10.** Divergencias nucleotídicas y varianzas para la región secuenciada del gen citocromo b (cyt b) entre pares de especies de *Drosophila* del grupo *obscura*.

MATRIZ DE DISTANCIAS DE KIMURA (2 PARAMETROS).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0886	-														
AFF	0.1111	0.1226	-													
ALG	0.1065	0.1203	0.0120	-												
AZT	0.1111	0.1273	0.0263	0.0222	-											
SUB	0.1019	0.1179	0.0729	0.0707	0.0729	-										
MAD	0.0996	0.1156	0.0796	0.0729	0.0796	0.0285	-									
GUA	0.1065	0.1203	0.0929	0.0817	0.0929	0.0346	0.0367	-								
AMB	0.1045	0.1443	0.0865	0.0865	0.0910	0.1024	0.1000	0.1114	-							
OBS	0.1233	0.1615	0.1025	0.1072	0.1049	0.1140	0.1163	0.1280	0.0368	-						
SSV	0.1322	0.1274	0.0844	0.0798	0.0866	0.0843	0.0865	0.0933	0.0935	0.0981	-					
TRI	0.1282	0.1642	0.1114	0.1162	0.1185	0.1070	0.1069	0.1117	0.0827	0.0941	0.1386	-				
BIF	0.0998	0.1276	0.0865	0.0775	0.0910	0.0753	0.0686	0.0730	0.1076	0.1193	0.0977	0.1170	-			
MIR	0.1391	0.1463	0.1065	0.0973	0.1041	0.1088	0.1087	0.1110	0.1323	0.1470	0.1138	0.1372	0.1088	-		
BOG	0.1298	0.1345	0.1020	0.0974	0.1088	0.0998	0.0997	0.1020	0.1254	0.1327	0.1001	0.1328	0.1066	0.0670	-	
PER	0.1274	0.1297	0.0929	0.0884	0.0996	0.0975	0.0929	0.1043	0.1230	0.1254	0.1003	0.1229	0.0996	0.0581	0.0243	-

MATRIZ DE VARIANZAS DE LAS DISTANCIAS.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0002	-														
AFF	0.0002	0.0003	-													
ALG	0.0002	0.0003	0.0000	-												
AZT	0.0002	0.0003	0.0001	0.0000	-											
SUB	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	-										
MAD	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	-									
GUA	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	-								
AMB	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0003	-							
OBS	0.0003	0.0004	0.0002	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003	0.0003	0.0001	-						
SSV	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	-					
TRI	0.0003	0.0004	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0003	-				
BIF	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002	0.0002	0.0003	0.0002	0.0003	-			
MIR	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002	-		
BOG	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003	0.0002	0.0003	0.0002	0.0001	-	
PER	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003	0.0002	0.0003	0.0002	0.0001	0.0001	-

Abreviaturas como en la Tabla 8.

**Tabla 11. a)** Número de sustituciones sinónimas por sitio para el gen *cytb* (bajo la diagonal) y varianzas (sobre la diagonal).

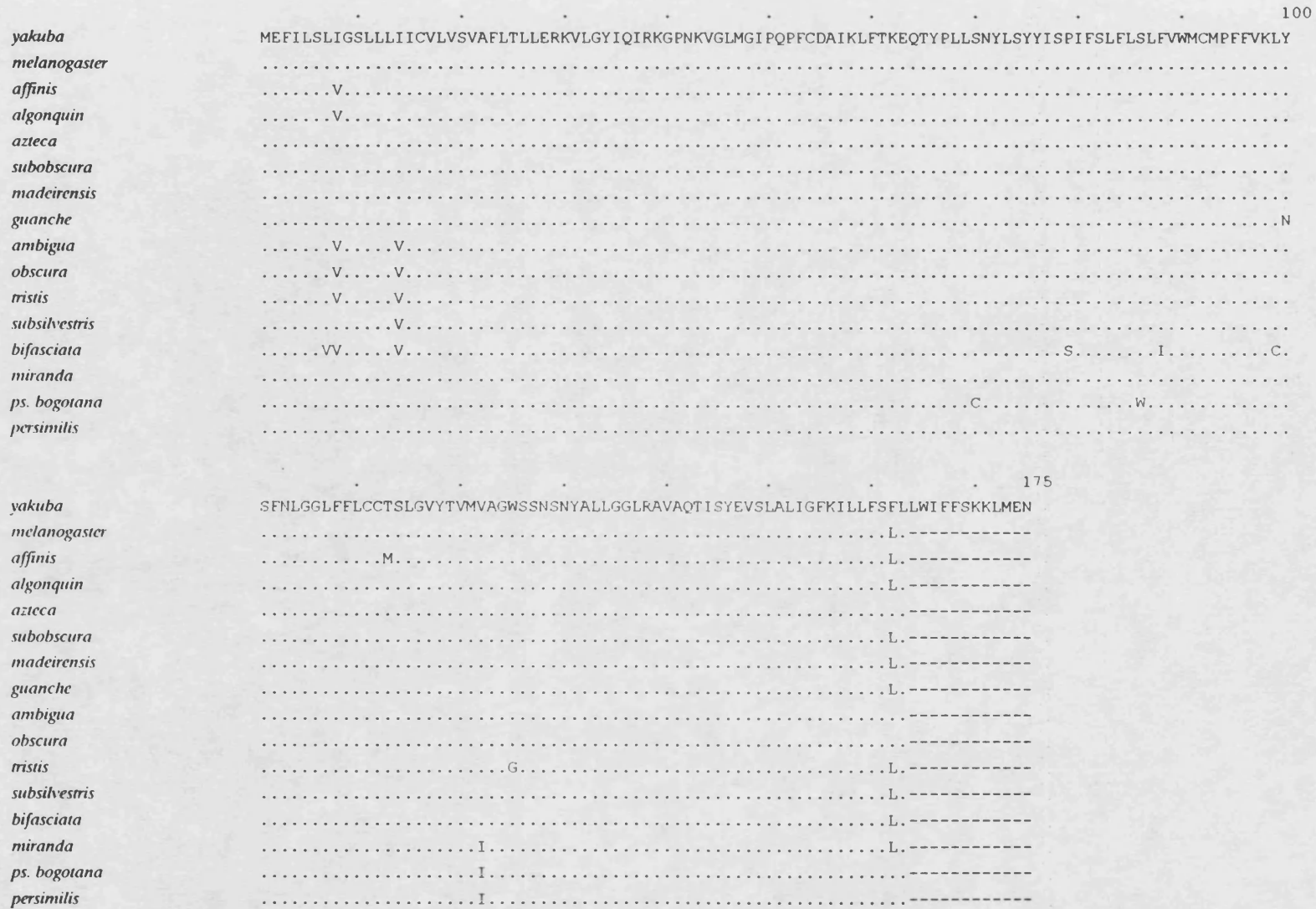
	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	---	0.005	0.010	0.008	0.010	0.006	0.006	0.007	0.008	0.011	0.013	0.011	0.006	0.010	0.010	0.011
MEL	0.348	---	0.010	0.009	0.011	0.006	0.006	0.006	0.001	0.020	0.010	0.016	0.008	0.008	0.008	0.008
AFF	0.553	0.532	---	0.001	0.002	0.005	0.005	0.008	0.008	0.011	0.008	0.012	0.006	0.009	0.010	0.008
ALG	0.494	0.513	0.061	---	0.001	0.004	0.005	0.006	0.008	0.012	0.007	0.013	0.005	0.007	0.008	0.007
AZT	0.553	0.573	0.139	0.116	---	0.005	0.005	0.008	0.010	0.012	0.008	0.015	0.007	0.008	0.012	0.010
SUB	0.405	0.396	0.348	0.318	0.333	---	0.001	0.002	0.012	0.014	0.007	0.009	0.005	0.007	0.007	0.007
MAD	0.388	0.380	0.372	0.325	0.372	0.116	---	0.002	0.009	0.012	0.006	0.010	0.004	0.007	0.006	0.006
GUA	0.430	0.405	0.475	0.388	0.475	0.151	0.175	---	0.013	0.017	0.007	0.010	0.005	0.007	0.008	0.008
AMB	0.484	0.628	0.494	0.475	0.532	0.595	0.523	0.628	---	0.002	0.010	0.006	0.009	0.014	0.019	0.017
OBS	0.584	0.791	0.573	0.595	0.595	0.662	0.605	0.724	0.163	---	0.009	0.008	0.010	0.020	0.022	0.017
SSV	0.639	0.532	0.475	0.439	0.494	0.422	0.396	0.448	0.532	0.513	---	0.022	0.007	0.009	0.010	0.009
TRI	0.577	0.716	0.616	0.639	0.686	0.523	0.553	0.542	0.396	0.466	0.820	---	0.010	0.013	0.015	0.013
BIF	0.396	0.484	0.405	0.341	0.439	0.325	0.310	0.341	0.523	0.563	0.430	0.563	---	0.007	0.008	0.008
MIR	0.542	0.494	0.503	0.430	0.484	0.439	0.439	0.448	0.662	0.791	0.503	0.639	0.457	---	0.003	0.003
BOG	0.553	0.494	0.532	0.494	0.595	0.457	0.413	0.466	0.763	0.820	0.556	0.686	0.484	0.260	---	0.001
PER	0.573	0.494	0.494	0.457	0.553	0.439	0.396	0.484	0.737	0.737	0.513	0.639	0.466	0.227	0.105	---

**b)** Número de sustituciones reemplazantes por sitio para el gen *cytb* (bajo la diagonal) y varianzas (sobre la diagonal).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MEL	0.035	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AFF	0.003	0.047	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ALG	0.003	0.047	0.000	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AZT	0.031	0.047	0.000	0.000	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SUB	0.041	0.061	0.016	0.019	0.019	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MAD	0.041	0.061	0.020	0.020	0.020	0.008	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
GUA	0.043	0.063	0.020	0.020	0.020	0.008	0.005	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AMB	0.032	0.059	0.010	0.013	0.010	0.015	0.022	0.022	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
OBS	0.040	0.060	0.018	0.020	0.018	0.020	0.029	0.029	0.008	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SSV	0.044	0.052	0.010	0.010	0.010	0.018	0.024	0.024	0.013	0.020	---	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TRI	0.046	0.070	0.023	0.026	0.023	0.029	0.026	0.032	0.019	0.022	0.031	---	0.000	0.000	0.000	0.000
BIF	0.040	0.059	0.023	0.023	0.023	0.023	0.018	0.018	0.029	0.037	0.032	0.035	---	0.000	0.000	0.000
MIR	0.064	0.079	0.032	0.032	0.032	0.044	0.044	0.045	0.041	0.044	0.040	0.049	0.041	---	0.000	0.000
BOG	0.052	0.065	0.023	0.023	0.023	0.031	0.037	0.032	0.023	0.026	0.018	0.039	0.035	0.024	---	0.000
PER	0.047	0.060	0.018	0.018	0.018	0.031	0.032	0.032	0.023	0.026	0.023	0.033	0.029	0.020	0.005	---

Abreviaturas como en la Tabla 8.

**Figura 23.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la región secuenciada del gen NADH deshidrogenasa 1.



La existencia de un codón de parada, doce codones antes que en *D. yakuba*, da lugar a la pérdida del solapamiento de 12 nucleótidos de los extremos 3' de los genes ND1 y Ser-tRNA(UCN) en el resto de especies de *Drosophila*. En su lugar, aparece una secuencia intergénica de 18 pb entre ambos genes (Figuras 15 y 17). La existencia de dicha región intergénica viene reforzada por la aparición de fenómenos de inserción/delección en su secuencia.

La configuración estructural de esta subunidad es desconocida, aunque dada la riqueza de aminoácidos hidrofóbicos, debe de tratarse de una proteína integral de membrana bastante conservada (6.9% de residuos variables en las especies del grupo *obscura*).

Debido a que la predicción de las  $\alpha$ -hélices integrales de membrana de la citocromo b con los programas RAOARGOS, SOAP y HELIXMEM (Paquete PCGENE) se ajustaba con bastante precisión a la estructura propuesta para esta proteína, decidimos realizar un análisis semejante con las secuencias aminoacídicas de la ND1. El análisis de la secuencia completa de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985a) y *D. melanogaster* (Garesse, 1988), determinaban la posible existencia de un total de 8 alfa-hélices integrales de membrana, de las cuales las tres primeras y la octava y última, han sido secuenciadas en las restantes especies de *Drosophila*. Los reemplazamientos no dan lugar a cambios en la estructura, ya que se tratan, en gran parte, de sustituciones entre aminoácidos equivalentes (54.5%) o en regiones desestructuradas (27.3%).

Las Tablas 12 y 13 muestran respectivamente las divergencias nucleotídicas por sitio determinadas para la zona secuenciada codificante del ND1 de las distintas especies analizadas y las sustituciones por sitio sinónimas y no sinónimas.

### **3.3.3. Variabilidad del gen de la subunidad 5 de la NADH-Deshidrogenasa.**

Otra de las regiones secuenciadas corresponde a la zona central del gen de la subunidad 5 de la NADH-Deshidrogenasa (Figura 11). El



**Tabla 12.** Divergencias nucleotídicas y varianzas para la región secuenciada del gen NADH deshidrogenasa 1 (ND1) entre las especies de *Drosophila* del grupo *obscura*.

MATRIZ DE DISTANCIAS DE KIMURA (2 PARAMETROS).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	TRI	SSV	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0551	-														
AFF	0.0511	0.0656	-													
ALG	0.0511	0.0677	0.0096	-												
AZT	0.0532	0.0656	0.0390	0.0370	-											
SUB	0.0635	0.0718	0.0491	0.0471	0.0173	-										
MAD	0.0803	0.0846	0.0574	0.0595	0.0413	0.0333	-									
GUA	0.0844	0.0888	0.0614	0.0594	0.0451	0.0351	0.0474	-								
AMB	0.0739	0.0823	0.0655	0.0655	0.0697	0.0635	0.0655	0.0676	-							
OBS	0.0866	0.0910	0.0761	0.0740	0.0847	0.0783	0.0783	0.0762	0.0312	-						
TRI	0.0953	0.0844	0.0847	0.0803	0.0867	0.0761	0.0869	0.0932	0.0432	0.0639	-					
SSV	0.0866	0.0781	0.0761	0.0761	0.0761	0.0656	0.0719	0.0739	0.0492	0.0658	0.0471	-				
BIF	0.0888	0.0912	0.0718	0.0739	0.0909	0.0930	0.1107	0.1061	0.0823	0.0866	0.0909	0.0866	-			
MIR	0.0781	0.0845	0.0676	0.0676	0.0739	0.0845	0.0845	0.0931	0.0740	0.0869	0.0869	0.0741	0.0952	-		
BOG	0.0930	0.0974	0.0866	0.0866	0.0824	0.0974	0.0887	0.0974	0.0846	0.0976	0.0976	0.0868	0.1061	0.0352	-	
PER	0.0845	0.0866	0.0781	0.0781	0.0718	0.0866	0.0845	0.0888	0.0782	0.0891	0.0868	0.0761	0.1017	0.0332	0.0134	-

MATRIZ DE VARIANZAS DE LAS DISTANCIAS.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	TRI	SSV	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0001	-														
AFF	0.0001	0.0001	-													
ALG	0.0001	0.0001	0.0000	-												
AZT	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-											
SUB	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	-										
MAD	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-									
GUA	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-								
AMB	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-							
OBS	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	-						
TRI	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	-					
SSV	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	-				
BIF	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	-			
MIR	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	-		
BOG	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	-	
PER	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	0.0000	-

Abreviaturas como en la Tabla 8.

**Tabla 13. a) Sustituciones sinónimas para el gen NADH deshidrogenasa 1 (bajo la diagonal) y varianzas (sobre la diagonal).**

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005	0.004	0.007	0.007	0.007	0.005	0.006	0.007	0.008
MEL	0.295	-	0.004	0.005	0.005	0.005	0.007	0.007	0.005	0.007	0.006	0.006	0.005	0.008	0.009	0.007
AFF	0.216	0.330	-	0.000	0.001	0.002	0.003	0.003	0.004	0.005	0.006	0.005	0.004	0.005	0.005	0.006
ALG	0.228	0.368	0.038	-	0.002	0.002	0.004	0.003	0.004	0.005	0.006	0.006	0.004	0.005	0.007	0.006
AZT	0.254	0.338	0.161	0.167	-	0.000	0.002	0.002	0.004	0.007	0.006	0.005	0.005	0.006	0.006	0.005
SUB	0.267	0.352	0.173	0.179	0.029	-	0.002	0.002	0.004	0.006	0.005	0.005	0.005	0.006	0.007	0.006
MAD	0.383	0.448	0.248	0.281	0.179	0.144	-	0.003	0.004	0.006	0.007	0.006	0.009	0.007	0.006	0.006
GUA	0.383	0.448	0.248	0.254	0.179	0.144	0.228	-	0.005	0.005	0.008	0.006	0.007	0.008	0.007	0.006
AMB	0.323	0.383	0.288	0.309	0.323	0.281	0.309	0.338	-	0.002	0.002	0.003	0.005	0.004	0.005	0.005
OBS	0.431	0.465	0.375	0.383	0.448	0.399	0.415	0.383	0.156	-	0.005	0.005	0.005	0.006	0.007	0.007
SSV	0.440	0.391	0.423	0.415	0.407	0.360	0.457	0.492	0.191	0.338	-	0.003	0.007	0.006	0.006	0.005
TRI	0.431	0.399	0.375	0.399	0.383	0.338	0.399	0.399	0.241	0.368	0.222	-	0.005	0.005	0.005	0.005
BIF	0.338	0.383	0.281	0.309	0.383	0.368	0.539	0.465	0.338	0.383	0.431	0.383	-	0.007	0.007	0.007
MIR	0.391	0.474	0.345	0.368	0.391	0.407	0.440	0.474	0.316	0.423	0.407	0.368	0.440	-	0.001	0.002
BOG	0.457	0.510	0.407	0.431	0.415	0.431	0.399	0.440	0.345	0.465	0.407	0.383	0.440	0.139	-	0.005
PER	0.440	0.457	0.391	0.415	0.375	0.392	0.407	0.407	0.345	0.440	0.375	0.352	0.457	0.156	0.048	-

**b) Sustituciones reemplazantes (bajo la diagonal) para el gen NADH deshidrogenasa 1 y varianzas (sobre la diagonal).**

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MEL	0.005	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AFF	0.016	0.012	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ALG	0.013	0.008	0.004	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AZT	0.011	0.011	0.012	0.008	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SUB	0.021	0.016	0.023	0.019	0.016	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MAD	0.021	0.016	0.017	0.013	0.011	0.008	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
GUA	0.027	0.021	0.023	0.019	0.016	0.011	0.008	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AMB	0.024	0.024	0.020	0.016	0.019	0.019	0.016	0.013	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
OBS	0.021	0.021	0.017	0.013	0.016	0.016	0.013	0.016	0.003	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SSV	0.031	0.025	0.020	0.016	0.025	0.020	0.017	0.020	0.011	0.008	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TRI	0.021	0.016	0.017	0.013	0.016	0.011	0.008	0.011	0.008	0.005	0.009	-	0.000	0.000	0.000	0.000
BIF	0.040	0.035	0.029	0.027	0.035	0.040	0.035	0.040	0.032	0.029	0.027	0.029	-	0.000	0.000	0.000
MIR	0.017	0.012	0.012	0.008	0.012	0.023	0.017	0.023	0.025	0.023	0.025	0.016	0.031	-	0.000	0.000
BOG	0.025	0.023	0.025	0.021	0.019	0.035	0.029	0.033	0.033	0.029	0.039	0.029	0.044	0.012	-	0.000
PER	0.017	0.017	0.017	0.013	0.012	0.028	0.023	0.028	0.025	0.023	0.031	0.021	0.036	0.005	0.052	-

Abreviaturas como en la Tabla 8.



alineamiento de las secuencias de esta región del gen para las especies de *Drosophila* queda recogido en la Figura 16.

La traducción de esta región y el alineamiento de las secuencias aminoacídicas se muestra en la Figura 24. En este caso un 12.5% de las posiciones aminoacídicas son variables en las especies de *Drosophila* estudiadas (9.6% entre las especies del grupo *obscura*). Se trata, por tanto, de la proteína más variable entre las analizadas.

Su configuración tridimensional es también desconocida. Se trata de una proteína integral de membrana, la más grande de las codificadas en el genoma mitocondrial, cuya función en el complejo enzimático no está aún clarificada.

Aplicando los mismos análisis de predicción de estructura secundaria que en las proteínas analizadas anteriormente, la ND5 podría estar formada por 13 ó 14 hélices alfa conectadas por cortos tramos desestructurados. La región analizada correspondería a la secuencia situada entre las hélices cuarta y décima, ambas excluidas. Esta estructura se mantiene al analizar las secuencias de cada una de las especies. La variabilidad aminoacídica se concentra principalmente en dos zonas, las situadas entre los restos 170 al 182 (52.9% de los restos variables), y 233 al 244 (29.4%). Ambas zonas corresponden a posibles regiones desestructuradas. Aún así, los reemplazamientos son mayoritariamente (80%) entre aminoácidos de características semejantes.

Las Tablas 14 y 15 muestran, respectivamente las divergencias nucleotídicas entre las zonas secuenciadas del ND5 en las especies del grupo *obscura* y como las sustituciones por sitio sinónimas y reemplazantes.

### **3.4. Variabilidad de las secuencias intergénicas.**

En las zonas secuenciadas en el presente trabajo, existen cuatro regiones intergénicas situadas a ambos extremos de los genes de tRNAs (Figura 11).

**Figura 24.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región secuenciada del gen NADH deshidrogenasa 5.

	100
<i>yakuba</i>	ALLLAIAWMLNYGSWNYI FYLEVMQNEFSMLMIGSLVMLAAMTKSAQIPFSSWLPAAAMAAPT PVSALVHSSTLVTAGVYLLIRFNIVLSTSWLGQLLLLL
<i>melanogaster</i>	. . . S . . . . . I . . . . E . . . . . I . . . . . M . . .
<i>affinis</i>	. . . . . K . . . E . . . . . L . . . S . . . F . . .
<i>algonquin</i>	. . . . . K . . . E . . . . . L . . . S . . . F . . .
<i>azteca</i>	. . . . . K . . . E . . . . . L . . . . .
<i>subobscuraI</i>	. . . . . K . D . E . M . . . . . L . . . . .
<i>subobscuraII</i>	. . . . . K . D . E . M . . . . . L . . . . .
<i>madeirensis</i>	. . . . . K . . . E . . . . . L . . . . .
<i>guanche</i>	. . . . . K . D . E . M . . . . . L . . . . .
<i>ambigua</i>	. . . . . K . D . E . . . . . M L . . . . .
<i>obscura</i>	. . . . . K . D . D . . P . . . . . L . . . . .
<i>subsilvestris</i>	. . . . . K . D . E . . . . . L . . . . .
<i>tristis</i>	. F . . . . . K . DYE . . I . DF . . . . . L . . S . . . F . . .
<i>bifasciata</i>	. . . . . K . D . E . . V . DF . . . . . L . . . . .
<i>miranda</i>	. . . . . K . DYE . . . F . . . S . . . . . L . . . . .
<i>ps. bogotana</i>	. . . . . K . DYE . . . DF . . . . . L . . . . .
<i>persimilis</i>	. . . . . K . DYE . . . DF . . . . . L . . . . .
<i>yakuba</i>	SGILTMFMAGLGANFEFDI.KKI IALSTLSQLGLMMSI
<i>melanogaster</i>	. . . . .
<i>affinis</i>	. . . . .
<i>algonquin</i>	. . . . .
<i>azteca</i>	. . . . .
<i>subobscuraI</i>	. . . . .
<i>subobscuraII</i>	. . . . .
<i>madeirensis</i>	. . . . .
<i>guanche</i>	. . . . .
<i>ambigua</i>	. . . . .
<i>obscura</i>	. . . . .
<i>subsilvestris</i>	. . . . .
<i>tristis</i>	. . . . .
<i>bifasciata</i>	. . . . .
<i>miranda</i>	. . . . .
<i>ps. bogotana</i>	. . . . .
<i>persimilis</i>	. . . . .

**Tabla 14.** Divergencias nucleotídicas y varianzas para la región secuenciada del gen NADH deshidrogenasa 5 (ND5) entre las especies de *Drosophila* del grupo *obscura*.

MATRIZ DE DISTANCIAS DE KIMURA (2 PARAMETROS).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB 1	SUB 2	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-																
MEL	0.1223	-															
AFF	0.1486	0.1164	-														
ALG	0.1456	0.1107	0.0074	-													
AZT	0.1338	0.0995	0.0430	0.0352	-												
SUB 1	0.1280	0.1193	0.0911	0.0911	0.0856	-											
SUB 2	0.1280	0.1193	0.0856	0.0856	0.0828	0.0049	-										
MAD	0.1222	0.1136	0.0967	0.0911	0.0856	0.0431	0.0378	-									
GUA	0.1368	0.1023	0.0883	0.0829	0.0720	0.0431	0.0405	0.0561	-								
AMB	0.1397	0.1309	0.0911	0.0911	0.0967	0.0939	0.0911	0.0884	0.0939	-							
OBS	0.1579	0.1517	0.1137	0.1137	0.1225	0.1137	0.1108	0.1023	0.1051	0.0378	-						
SSV	0.1280	0.0995	0.0747	0.0693	0.0639	0.0939	0.0884	0.0939	0.0748	0.0830	0.0830	-					
TRI	0.1517	0.1280	0.0856	0.0884	0.1053	0.1051	0.1023	0.1165	0.0939	0.0774	0.0857	0.0856	-				
BIF	0.1761	0.1397	0.0913	0.0942	0.0856	0.1341	0.1282	0.1313	0.1223	0.1141	0.1348	0.0999	0.1197	-			
MIR	0.1280	0.1222	0.0884	0.0828	0.0801	0.0967	0.0911	0.0939	0.0911	0.0884	0.1053	0.0802	0.0968	0.1023	-		
BOG	0.1341	0.1368	0.0856	0.0829	0.0912	0.0996	0.0940	0.1080	0.0967	0.0884	0.0968	0.0831	0.0941	0.1052	0.0302	-	
PER	0.1252	0.1251	0.0913	0.0829	0.0913	0.1025	0.0968	0.0967	0.0939	0.0857	0.1055	0.0804	0.0913	0.1081	0.0301	0.0302	-

MATRIZ DE VARIANZAS DE LAS DISTANCIAS.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB 1	SUB 2	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-																
MEL	0.0003	-															
AFF	0.0004	0.0003	-														
ALG	0.0004	0.0003	0.0000	-													
AZT	0.0004	0.0003	0.0001	0.0001	-												
SUB 1	0.0004	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	-											
SUB 2	0.0004	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0000	-										
MAD	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	-									
GUA	0.0004	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	-								
AMB	0.0004	0.0004	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0003	-							
OBS	0.0005	0.0004	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0001	-						
SSV	0.0004	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0003	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	-					
TRI	0.0004	0.0004	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	-				
BIF	0.0005	0.0004	0.0002	0.0003	0.0002	0.0004	0.0004	0.0004	0.0003	0.0003	0.0004	0.0003	0.0003	-			
MIR	0.0004	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0003	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0003	0.0002	0.0003	0.0003	-		
BOG	0.0004	0.0004	0.0002	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002	0.0003	0.0002	0.0003	0.0003	0.0001	-	
PER	0.0004	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0003	0.0001	0.0001	-

Abreviaturas como en la Tabla 8.

**Tabla 15. a)** Sustituciones sinónimas para el gen NADH deshidrogenasa 5 (bajo la diagonal) y varianzas (sobre la diagonal).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB 1	SUB 2	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-	0.013	0.015	0.014	0.012	0.012	0.012	0.012	0.015	0.013	0.018	0.010	0.014	0.028	0.010	0.018	0.010
MEL	0.6000	-	0.007	0.006	0.005	0.010	0.010	0.010	0.013	0.011	0.015	0.005	0.007	0.010	0.008	0.010	0.008
AFF	0.6372	0.4145	-	0.001	0.002	0.007	0.006	0.008	0.006	0.007	0.010	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.006
ALG	0.6122	0.3777	0.0333	-	0.002	0.007	0.006	0.007	0.005	0.007	0.010	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005
AZT	0.5646	0.3340	0.1838	0.1432	-	0.007	0.006	0.007	0.004	0.010	0.014	0.005	0.007	0.006	0.005	0.007	0.007
SUB 1	0.5646	0.4984	0.3904	0.3904	0.3904	-	0.000	0.002	0.003	0.008	0.011	0.009	0.008	0.018	0.008	0.009	0.009
SUB 2	0.5646	0.4984	0.3546	0.3546	0.3723	0.0220	-	0.002	0.003	0.008	0.010	0.007	0.007	0.015	0.007	0.007	0.008
MAD	0.5646	0.4984	0.4473	0.4089	0.4089	0.1838	0.1565	-	0.004	0.007	0.008	0.009	0.011	0.016	0.007	0.011	0.008
GUA	0.6372	0.5880	0.3546	0.3205	0.2879	0.2121	0.1978	0.2567	-	0.008	0.009	0.005	0.006	0.013	0.007	0.008	0.007
AMB	0.6073	0.5531	0.4089	0.4089	0.4879	0.4633	0.4434	0.4240	0.4633	-	0.001	0.007	0.004	0.011	0.007	0.007	0.006
OBS	0.7064	0.6501	0.5090	0.5090	0.6246	0.5486	0.5264	0.4633	0.4837	0.1174	-	0.006	0.005	0.016	0.009	0.007	0.009
SSV	0.5198	0.3425	0.3374	0.3040	0.3040	0.4673	0.4279	0.4673	0.3374	0.4279	0.3723	-	0.005	0.009	0.006	0.006	0.005
TRI	0.6122	0.4051	0.3040	0.3205	0.4279	0.4473	0.4279	0.5308	0.3723	0.2800	0.3040	0.3289	-	0.012	0.007	0.008	0.007
BIF	0.8745	0.5155	0.3546	0.3723	0.3546	0.7037	0.6501	0.6764	0.6000	0.5419	0.6631	0.4775	0.5646	-	0.008	0.010	0.011
MIR	0.5198	0.4337	0.3374	0.3040	0.3205	0.4473	0.4089	0.4279	0.4089	0.3996	0.4673	0.3546	0.4279	0.4473	-	0.001	0.001
BOG	0.5646	0.5264	0.3205	0.3040	0.3904	0.4673	0.4279	0.5308	0.4473	0.3996	0.4279	0.3634	0.4473	0.5090	0.1174	-	0.002
PER	0.4984	0.4434	0.3546	0.3040	0.3904	0.4879	0.4473	0.4473	0.4279	0.3813	0.4879	0.3460	0.4279	0.5308	0.1174	0.1432	-

**b)** Sustituciones reemplazantes para el gen NDH deshidrogenasa 5 (bajo la diagonal) y errores estándar (sobre la diagonal).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB 1	SUB 2	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MEL	0.026	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AFF	0.051	0.048	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ALG	0.051	0.048	0.000	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AZT	0.044	0.043	0.006	0.006	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SUB 1	0.037	0.037	0.022	0.022	0.016	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SUB 2	0.037	0.037	0.022	0.022	0.016	0.000	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MAD	0.031	0.031	0.019	0.019	0.013	0.006	0.006	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
GUA	0.037	0.037	0.026	0.026	0.019	0.000	0.000	0.006	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AMB	0.045	0.042	0.019	0.019	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
OBS	0.052	0.052	0.029	0.029	0.022	0.023	0.023	0.023	0.023	0.016	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SSV	0.044	0.041	0.013	0.013	0.006	0.013	0.013	0.013	0.014	0.006	0.016	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TRI	0.058	0.063	0.032	0.032	0.032	0.029	0.029	0.029	0.029	0.027	0.032	0.027	-	0.000	0.000	0.000	0.000
BIF	0.054	0.058	0.029	0.029	0.022	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.031	0.018	0.027	-	0.000	0.000	0.000
MIR	0.044	0.051	0.029	0.029	0.022	0.019	0.019	0.019	0.019	0.018	0.026	0.016	0.022	0.026	-	0.000	0.000
BOG	0.044	0.053	0.029	0.029	0.022	0.019	0.019	0.019	0.019	0.018	0.022	0.018	0.016	0.019	0.006	-	0.000
PER	0.044	0.053	0.029	0.029	0.022	0.019	0.019	0.019	0.019	0.018	0.022	0.018	0.016	0.019	0.006	0.000	-

Abreviaturas como en la Tabla 8.

En la Figura 17 se muestran los alineamientos de las cuatro regiones intergénicas. La mayor (Figura 17a) es la que aparece entre los genes ND1 y Ser-tRNA (16 a 17 pb), que en *D. yakuba* corresponde a la secuencia codificante del extremo 3' del gen ND1, tal como ya se ha comentado (ver apartado 3.3.2.). *D. melanogaster* presenta una delección de una timina (respecto a *D. yakuba*), y las especies del grupo *obscura* de dos timinas.

La región intergénica menor es la situada entre los genes *cytb* y Ser-tRNA (Figura 17b), que aunque en *D. yakuba* es de 6 pb, en el resto de especies es de 1 pb (especies del subgrupo *affinis*) o 2 pb (resto de especies).

Por otra parte, la más conservada es la región situada entre los genes ND1 y Leu-tRNA, que no presenta delecciones o inserciones, y únicamente una transversión A-T en *D. bifasciata*. Además, a caballo entre la región intergénica y el final del gen Leu-tRNA se presenta un sitio de restricción *ScaI* (ver Figura 17c) que es universal en todas las especies del grupo *obscura* (Barrio et al., 1992a; ver Figura 2), del subgrupo *mulleri* (Barrio et al., 1992b), *D. virilis* (Clary et al., 1982), *D. melanogaster* (Garesse, 1988) y *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985a), y probablemente lo sea en muchas otras especies. No obstante en mosquito se pierde por una transición C-T (HsuChen et al., 1984).

La cuarta región intergénica (Figura 17d), situada entre los genes Leu-tRNA y lrRNA, no queda perfectamente delimitada ya que, según la estructura secundaria del lrRNA postulada por Clary y Wolstenholme (1985b), no existe una región intergénica. Sin embargo, en el extremo 3' del gen lrRNA de las especies del grupo *obscura*, así como de *D. melanogaster*, aparecen una serie de delecciones respecto a la secuencia de *D. yakuba* (ver Figura 23) que desestabilizan la estructura secundaria postulada y que indican la posibilidad de que se trate de una región intergénica.

#### **4. PATRONES DE DIVERGENCIA NUCLEOTIDICA EN EL GENOMA MITOCONDRIAL DE LAS ESPECIES DEL GRUPO *obscura*.**

A partir de las divergencias nucleotídicas entre las distintas regiones funcionales del genoma mitocondrial secuenciadas en el presente

trabajo (Tablas 8, 9, 10, 12, y 14), se puede observar que los genes más conservados corresponden a los que codifican RNAs, que son unas 4 veces más conservados que los que codifican para proteínas.

Entre los genes de proteínas, el más conservado es el de la ND1, que también lo es a nivel de aminoácidos. Los otros dos genes, *cytb* y ND5, presentan valores de divergencia nucleotídica similares, al igual que ocurre con los aminoácidos que codifican. Sin embargo, hay que señalar que la región secuenciada del gen *cytb* en el presente estudio corresponde a la región 3' del gen, o sea, la región carboxilo terminal de la proteína que codifica que es la más variable por no existir ningún tipo de restricción funcional. En cambio, en el gen ND5, la región secuenciada codifica para la zona central de la proteína, que aunque no se conoce su estructura y qué dominios están implicados en su función, cabe la posibilidad de que se encuentre implicada en el mantenimiento de su estructura o función con mayor probabilidad que las regiones terminales.

Las sustituciones nucleotídicas en las regiones codificantes se dan con mucha mayor frecuencia en las posiciones silenciosas, tal como se puede observar en las Tablas 11, 13 y 15. Las divergencias nucleotídicas silenciosas (que no implican cambio del aminoácido codificado) son de un orden de magnitud mayores que las reemplazantes.

Por último, de la comparación de secuencias se puede determinar los patrones de sustitución nucleotídica en la evolución del genoma mitocondrial de las especies del grupo obscura de *Drosophila*. La Tabla 16 recoge los distintos tipos de sustitución nucleotídica observados.

Se puede comprobar que las transiciones son mayoritarias entre las especies menos divergentes, como por ejemplo entre *D. persimilis* y *D. ps. bogotana* (24 transiciones y 4 transversiones, tiempo de divergencia de unos 2 millones de años) o entre *D. affinis* y *D. algonquin* (14 y 4) o entre *D. subobscura* y *D. madeirensis* (38 y 8). Pero a medida que aumenta la divergencia, las transversiones enmascaran las transiciones llegando a superarlas. Por ejemplo, entre las especies del subgrupo *melanogaster* y las del subgrupo *obscura* (tiempo de divergencia de unos 35 millones de años), las transversiones suponen el 59.9% de las sustituciones nucleotídicas.

**Tabla 16a.** Matriz de transiciones (bajo la diagonal) y transversiones (sobre la diagonal) determinadas al comparar las secuencias del total de regiones analizadas del genoma mitocondrial de las especies del grupo *obscura*. Contiene secuencias parciales de los genes lrRNA, Ser-tRNA, Leu-tRNA, cytb, ND1 y ND5.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB 1	SUB 2	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	--	71	95	97	93	94	93	95	105	92	96	104	97	105	109	101	101
MEL	62	--	96	98	98	98	99	101	105	104	107	94	108	101	113	108	107
AFF	59	62	--	4	14	62	63	63	72	66	71	59	70	68	78	78	76
ALG	56	60	14	--	14	62	63	63	72	66	69	59	70	70	82	80	78
AZT	57	58	30	26	--	62	63	59	68	68	69	63	74	73	83	80	78
SUB 1	53	59	41	43	42	--	1	9	20	70	73	61	72	79	87	78	76
SUB 2	54	60	40	40	42	3	--	8	19	69	72	60	71	78	86	77	75
MAD	57	61	51	49	55	39	38	--	23	67	72	62	73	78	90	79	77
GUA	62	62	50	44	49	38	38	47	--	74	75	67	74	86	91	83	81
AMB	67	75	58	58	59	56	56	57	62	--	13	47	36	66	79	75	75
OBS	85	91	73	76	78	72	72	70	76	37	--	48	39	73	81	77	75
SSV	69	67	64	60	56	59	58	62	56	61	69	--	55	70	66	65	61
TRI	87	79	72	73	76	70	68	76	76	59	73	74	--	76	78	76	76
BIF	76	83	69	66	67	68	67	73	69	80	89	72	86	--	96	88	88
MIR	63	65	50	44	41	55	54	51	58	67	83	70	81	66	--	24	26
BOG	74	77	60	57	61	62	61	60	64	70	80	73	83	71	50	--	4
PER	68	69	57	52	55	60	59	56	63	66	79	72	74	68	46	24	--

**Tabla 16b.** Matriz de transiciones AG (bajo la diagonal) y TC (sobre la diagonal) para las mismas secuencias que en 16a.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB 1	SUB 2	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	--	44	35	36	35	35	36	37	41	48	57	50	64	52	40	51	47
MEL	8	--	45	46	43	41	42	43	41	60	67	50	62	61	46	55	51
AFF	4	17	--	10	24	30	31	38	34	47	52	52	56	55	35	39	41
ALG	0	14	4	--	24	33	32	37	31	50	58	51	59	54	33	40	40
AZT	2	15	6	2	--	31	32	41	34	51	59	45	61	52	29	43	42
SUB 1	8	18	11	10	11	--	1	27	23	46	52	44	56	50	38	44	45
SUB 2	8	18	9	8	10	2	--	28	24	47	53	45	55	51	39	45	46
MAD	0	18	13	12	14	12	10	--	34	45	50	46	64	57	38	45	43
GUA	1	21	16	13	15	15	14	13	--	51	57	42	62	52	40	43	47
AMB	9	15	11	8	8	10	9	12	11	--	24	51	50	68	53	56	55
OBS	8	24	21	18	19	20	19	20	19	13	--	52	55	67	58	58	58
SSV	9	17	12	9	11	15	13	16	14	10	17	--	59	57	52	55	55
TRI	3	17	16	14	15	14	13	12	14	9	18	15	--	73	66	66	61
BIF	4	22	14	12	15	18	16	16	17	12	22	15	13	--	52	52	54
MIR	3	19	15	11	12	17	15	13	18	14	25	18	15	14	--	36	35
BOG	3	22	21	17	18	18	16	15	21	14	22	18	17	19	14	--	1 5
PER	1	18	16	12	13	15	13	13	16	11	21	17	13	14	11	9	--



**Tabla 16c.** Matriz de transversiones AT (bajo de la diagonal) y AC (sobre la diagonal) de las mismas secuencias que en 16a.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB 1	SUB 2	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	--	5	9	9	8	8	8	13	8	16	15	13	14	14	12	11	12
MEL	65	--	8	8	7	8	8	13	11	14	15	9	14	10	11	12	12
AFF	81	81	--	1	1	5	5	6	7	7	6	5	9	7	8	6	7
ALG	83	84	3	--	0	4	4	4	5	7	5	5	9	10	7	6	7
AZT	81	85	12	13	--	3	3	3	5	5	3	5	8	10	5	3	5
SUB 1	78	83	53	55	56	--	0	1	1	6	5	5	8	9	9	9	9
SUB 2	79	86	54	56	58	1	--	1	1	6	6	5	8	9	9	9	9
MAD	75	84	54	57	55	7	6	--	2	8	7	6	11	10	11	10	9
GUA	92	90	62	65	62	18	18	21	--	8	6	8	7	9	9	8	7
AMB	71	86	57	58	61	60	60	58	65	--	2	8	7	11	12	9	11
OBS	72	84	60	60	62	61	60	61	65	7	--	7	5	11	13	10	11
SSV	84	79	51	52	57	51	50	53	57	37	37	--	10	7	10	9	10
TRI	77	87	59	59	64	59	59	60	64	27	28	41	--	10	12	10	12
BIF	88	87	57	58	63	69	68	68	77	54	58	61	63	--	16	14	15
MIR	94	98	66	71	74	75	74	77	80	65	64	52	62	75	--	4	6
BOG	86	92	71	73	76	68	67	68	75	63	61	53	63	71	19	--	2
PER	86	92	68	70	72	66	65	68	74	63	60	50	62	70	19	2	--

**Tabla 16d.** Matriz de Transversiones CG (bajo la diagonal) y GT (sobre la diagonal) de las mismas secuencias que en 16a.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB 1	SUB 2	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-	1	2	2	2	7	5	5	4	3	5	5	5	2	3	3	2
MEL	0	--	4	3	4	5	3	3	3	1	3	3	5	3	4	3	2
AFF	3	3	--	0	0	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	0	0
ALG	3	3	0	--	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0
AZT	2	2	1	1	--	2	1	0	0	1	1	1	1	0	3	1	1
SUB 1	1	2	3	2	1	--	0	1	1	2	2	3	4	1	2	1	1
SUB 2	1	2	3	2	1	0	--	1	0	1	2	3	3	1	2	1	1
MAD	2	1	2	2	1	0	0	--	0	0	1	2	2	0	1	1	0
GUA	1	1	2	2	1	0	0	0	--	0	1	1	3	0	1	0	0
AMB	2	3	1	1	1	2	2	1	1	--	2	2	2	1	1	3	1
OBS	4	5	3	3	3	5	4	3	3	2	--	2	5	3	1	5	3
SSV	2	3	1	1	0	2	2	1	1	0	2	--	3	2	3	3	1
TRI	1	2	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	--	2	3	3	2
BIF	1	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	--	4	3	3
MIR	0	0	2	2	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	--	0	0
BOG	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	--	0
PER	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	-



Entre las transversiones la más frecuente es la A-T (Tabla 16c) y entre las transiciones la C-T (Tabla 16b). Por lo tanto, entre especies próximas predominan las transiciones C-T, y entre especies divergentes las transversiones A-T, que se reflejan principalmente en posiciones silenciosas (que no implican cambio del aminoácido codificado), tal como también se observa en las terceras bases de los codones (Figuras 14, 15 y 16).

## **5. INFERENCIA DE RELACIONES FILOGENETICAS DE LAS ESPECIES DEL GRUPO *obscura* BASADA EN EL POLIMORFISMO DE SECUENCIA DEL mtDNA.**

Existen multitud de métodos para la reconstrucción de filogenias a partir de secuencias nucleotídicas (Felsenstein, 1988), el problema consiste en escoger el o los más apropiados. Tal como señalan Swofford y Olsen (1990), el análisis filogenético es considerado, a menudo, como una caja negra, en la que se introducen una serie de datos y de la cuál surge "El árbol", sin considerarse las asunciones y principios en que se basan cada uno de los métodos.

Como ya hemos señalado, las dos aproximaciones a la inferencia filogenética son la basada en distancias y la basada en caracteres (entre la que destacan los métodos de parsimonia). Recientemente, se ha incorporado una nueva aproximación a la inferencia filogenética basada en métodos estadísticos, destacando los métodos de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981; Saitou, 1990).

En nuestro análisis de las relaciones evolutivas entre las especies del grupo *obscura* hemos hecho uso de las tres aproximaciones a partir de la misma fuente de resultados, los alineamientos de secuencias de todas las zonas secuenciadas. Alineamiento múltiple que se consiguió utilizando el programa CLUSTAL V (Higgins y Sharp, 1988).

En los análisis se han utilizado dos especies de referencia externas o "outgroups", *D. yakuba* y *D. melanogaster*. Para la utilización de estas dos especies externas se han considerado los consejos de Swofford y Olsen (1990). Estos autores recomiendan utilizar dos especies más relacionadas entre sí que respecto a las del grupo a analizar, pero que no estén

excesivamente próximas entre sí ni excesivamente alejadas al grupo a analizar. De este modo se evitan efectos como el de atracción de las ramas alejadas ("long branches attracting", Hendy y Penny, 1989). La posibilidad de utilizar las secuencias de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985a) y *D. melanogaster* (Garesse, 1988) nos permite poseer las mejores especies externas para el análisis ya que ambas son del grupo *melanogaster*, el más próximo al *obscura*, pero pertenecen a dos linajes divergentes.

### 5.1. Árboles filogenéticos basados en matrices de distancias.

Tal como señalan Li y Gouy (1990), aunque es habitual utilizar datos de secuencias de diferentes regiones del genoma para obtener reconstrucciones filogenéticas basadas en distancias genéticas, esta práctica es incorrecta si las tasas de sustitución nucleotídicas son muy variables entre las distintas regiones. Ello es debido a que las distancias internodales que definen las reconstrucciones filogenéticas dependen considerablemente de las tasas de evolución. Sin embargo, tal como demuestran Martin et al. (1990), la utilización de cortas secuencias (250-300 pb) para obtener estimas de distancias genéticas producen grandes errores. Estos autores proponen dos posibles soluciones a este problema: a) utilizar mayor cantidad de información, bien secuenciando fragmentos mayores, bien secuenciando distintos fragmentos de un mismo genoma; o b) secuenciar pequeños fragmentos en grupos de especies que han divergido al mismo tiempo, presentando lo que se denomina "filogenia en estrella".

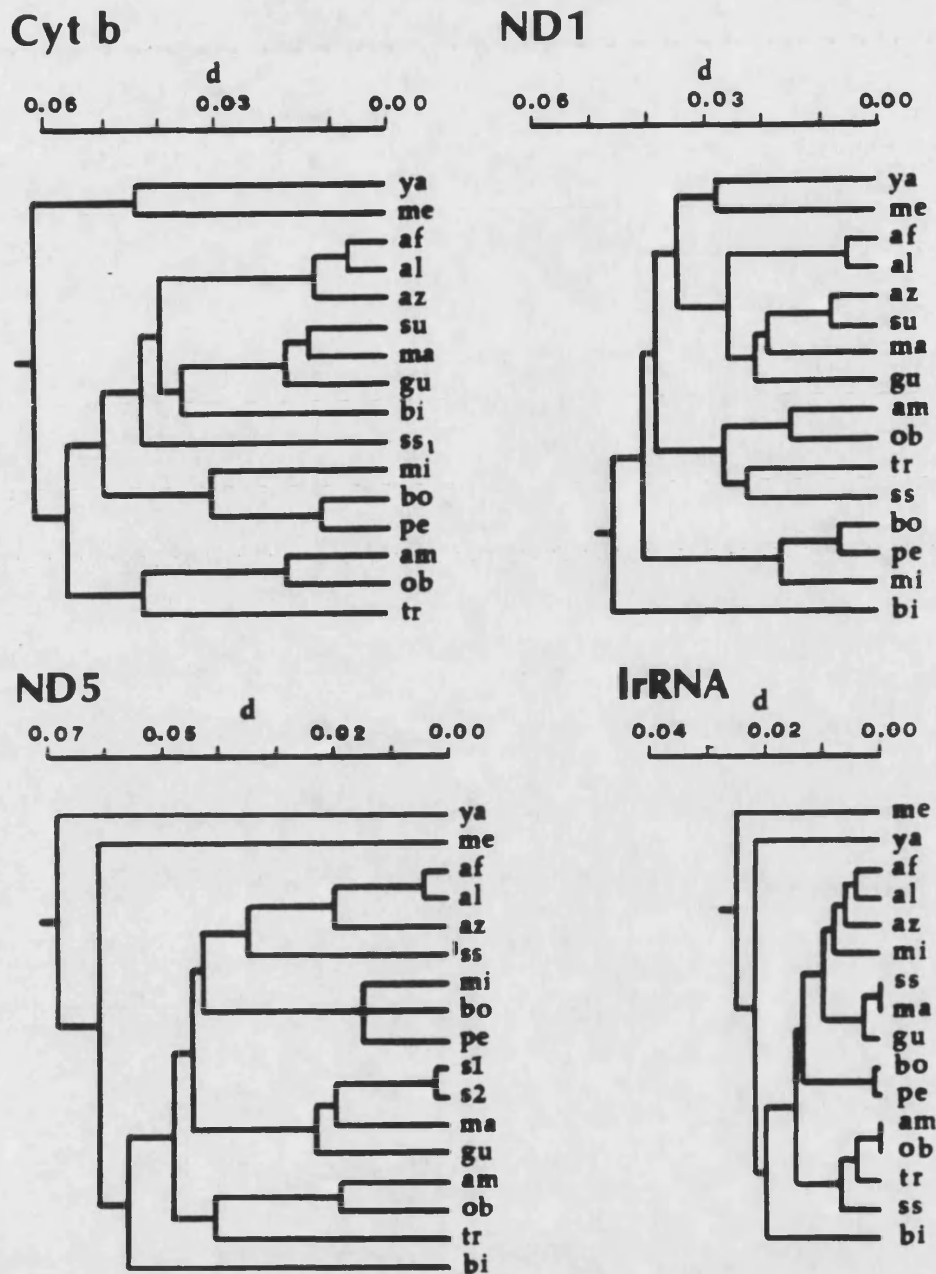
Está perfectamente comprobado que las distintas regiones y genes del genoma mitocondrial muestran diferentes tasas de sustitución nucleotídica (Simon, 1991), tal como ocurre en las especies del grupo *obscura* (ver Tablas 8, 9, 10, 12 y 14 que muestran las divergencias nucleotídicas para las distintas regiones secuenciadas). E incluso, la dinámica de fijación de mutaciones es distinta para las diversas zonas del genoma mitocondrial con diferentes constricciones funcionales, lo que conduce a la observación de diferencias en las tasas de sustitución nucleotídica. Ello se puede observar al comparar las divergencias nucleotídicas sinónimas, que mantienen el nucleótido codificado, y reemplazantes, que dan lugar a un cambio de aminoácido, entre las diferentes regiones funcionales (Tablas 11, 13 y 15). Sin embargo, no debemos olvidar que la pretensión de los análisis

filogenéticos es la reconstrucción de la historia evolutiva y las relaciones que ésta implica entre las especies consideradas. Por ello, como un paso previo decidimos determinar si las distintas regiones del genoma mitocondrial reflejan las mismas relaciones filogenéticas, obtenidas bajo las asunciones de los métodos de reconstrucción basados en matrices de distancias. Para ello se realizó el análisis con los datos de divergencia nucleotídica entre las distintas zonas secuenciadas del genoma mitocondrial de las especies del grupo *obscura*.

En la Figura 25 se muestra las filogenias obtenidas por el método de UPGMA utilizando los valores de divergencia nucleotídica de: a) la región correspondiente al gen *lrRNA* (Tabla 8), b) de la secuencia parcial del gen *cytb* (Tabla 10), c) del gen *ND1* (Tabla 12) y d) del gen *ND5* (Tabla 14). Y en la Figura 26 los árboles obtenidos al realizar el análisis con los datos de divergencia (Tabla 17) entre las posiciones primera y segunda (a) y las terceras (b) de los codones de los tres genes codificantes de proteínas.

A la vista de estos análisis, podemos concluir que las topologías obtenidas en los distintos árboles son semejantes, salvo algún caso de posible convergencia. Así, aparecen agrupaciones definidas en la mayoría de árboles, tales como los subgrupos *pseudoobscura* y *affinis*, el trío *subobscura-madeirensis-guanche* y el par *ambigua-obscura*. No obstante, la posición del resto de especies del heterogéneo subgrupo *obscura*, la relación entre los subgrupos y linajes, así como las relaciones entre las especies de algunas de las agrupaciones (por ejemplo, el trío *subobscura-madeirensis-guanche*) no quedan definidas debido a las varianzas de las distancias internodales. Además al ser análisis basados en estimas de divergencias a partir de pocos nucleótidos (300-500), y que en varios casos se trata de regiones muy conservadas (*lrRNAs*, 1ª y 2ª posiciones del codón), las reconstrucciones obtenidas pueden ser poco fiables. Por ejemplo, 9 de las 12 distancias internodales del árbol obtenido con las 1ª y 2ª bases del codón de todas las proteínas secuenciadas no son significativas (Figura 26).

Basándonos en todo lo expuesto previamente, decidimos utilizar toda la información disponible para obtener las estimas de divergencia. De este modo, incluimos en el análisis regiones correspondientes a las distintas zonas del genoma mitocondrial secuenciadas (*rRNA*, *tRNAs*, genes



**Figura 25.** Dendrogramas obtenidos mediante el análisis de agrupamiento según el método UPGMA, utilizando, para cada uno de ellos, los valores de divergencia nucleotídica de las regiones secuenciadas de cada gen mitocondrial de las especies del grupo *obscura*, que se indica en la parte superior izquierda del correspondiente dendrograma. Las divergencias nucleotídicas de cada gen fueron obtenidas por el método de Kimura de 2 parámetros (Tablas 8, 10, 12 y 14). *D. yakuba* (ya) y *D. melanogaster* (me) son las especies externas de referencia. Resto de abreviaturas: af, *D. affinis*; al, *D. algonquin*; azt, *D. azteca*; su, *D. subobscura*, en caso de haber diferencias entre los haplotipos I y II, se señalan como s1 y s2, respectivamente; ma, *D. madeirensis*; gu, *D. guanche*; am, *D. ambigua*; ob, *D. obscura*; tr, *D. tristis*; ss, *D. subsilvestris*; bi, *D. bifasciata*; mi, *D. miranda*; bo, *D. ps. bogotana*; pe, *D. persimilis*.

**Tabla 17a.** Divergencias nucleotídicas y sus varianzas obtenidas mediante el método de Kimura de 2 parámetros (1980) a partir de las 1ª y 2ª posiciones de los codones de las regiones secuenciadas de los genes cyt b, ND1 y ND5 del genoma mitocondrial entre las especies del grupo *obscura* estudiadas.

MATRIZ DE DISTANCIAS DE KIMURA (2 PARAMETROS).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0207	-														
AFF	0.0352	0.0329	-													
ALG	0.0318	0.0284	0.0054	-												
AZT	0.0318	0.0306	0.0097	0.0065	-											
SUB	0.0284	0.0284	0.0174	0.0141	0.0119	-										
MAD	0.0273	0.0273	0.0218	0.0163	0.0163	0.0086	-									
GUA	0.0273	0.0273	0.0207	0.0152	0.0152	0.0054	0.0054	-								
AMB	0.0262	0.0306	0.0141	0.0108	0.0130	0.0163	0.0141	0.0152	-							
OBS	0.0397	0.0420	0.0252	0.0240	0.0263	0.0274	0.0251	0.0285	0.0130	-						
SSV	0.0352	0.0318	0.0152	0.0097	0.0141	0.0196	0.0196	0.0185	0.0119	0.0207	-					
TRI	0.0397	0.0420	0.0263	0.0252	0.0229	0.0218	0.0229	0.0229	0.0185	0.0262	0.0252	-				
BIF	0.0420	0.0431	0.0307	0.0262	0.0308	0.0284	0.0262	0.0251	0.0263	0.0364	0.0229	0.0341	-			
MIR	0.0385	0.0396	0.0273	0.0217	0.0240	0.0239	0.0240	0.0228	0.0229	0.0363	0.0251	0.0307	0.0340	-		
BOG	0.0329	0.0374	0.0251	0.0196	0.0218	0.0218	0.0218	0.0206	0.0174	0.0273	0.0207	0.0251	0.0295	0.0141	-	
PER	0.0329	0.0374	0.0252	0.0196	0.0196	0.0196	0.0218	0.0207	0.0174	0.0274	0.0229	0.0207	0.0296	0.0141	0.0065	-

MATRIZ DE VARIANZAS DE LAS DISTANCIAS.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRI	BIF	MIR	BOG	PER
YAK																
MEL	0.0000															
AFF	0.0000	0.0000														
ALG	0.0000	0.0000	0.0000													
AZT	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000												
SUB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000											
MAD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000										
GUA	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000									
AMB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000								
OBS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000							
SSV	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000						
TRI	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000					
BIF	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000				
MIR	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
BOG	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
PER	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	

Abreviaturas como en la Tabla 8.

**Tabla 17b.** Divergencias nucleotídicas y sus varianzas obtenidas mediante el método de Kimura de 2 parámetros (1980) a partir de la 3ª posición de los codones de las regiones secuenciadas de los genes *cyt b*, ND1 y ND5 del genoma mitocondrial entre las especies del grupo *obscura* estudiadas.

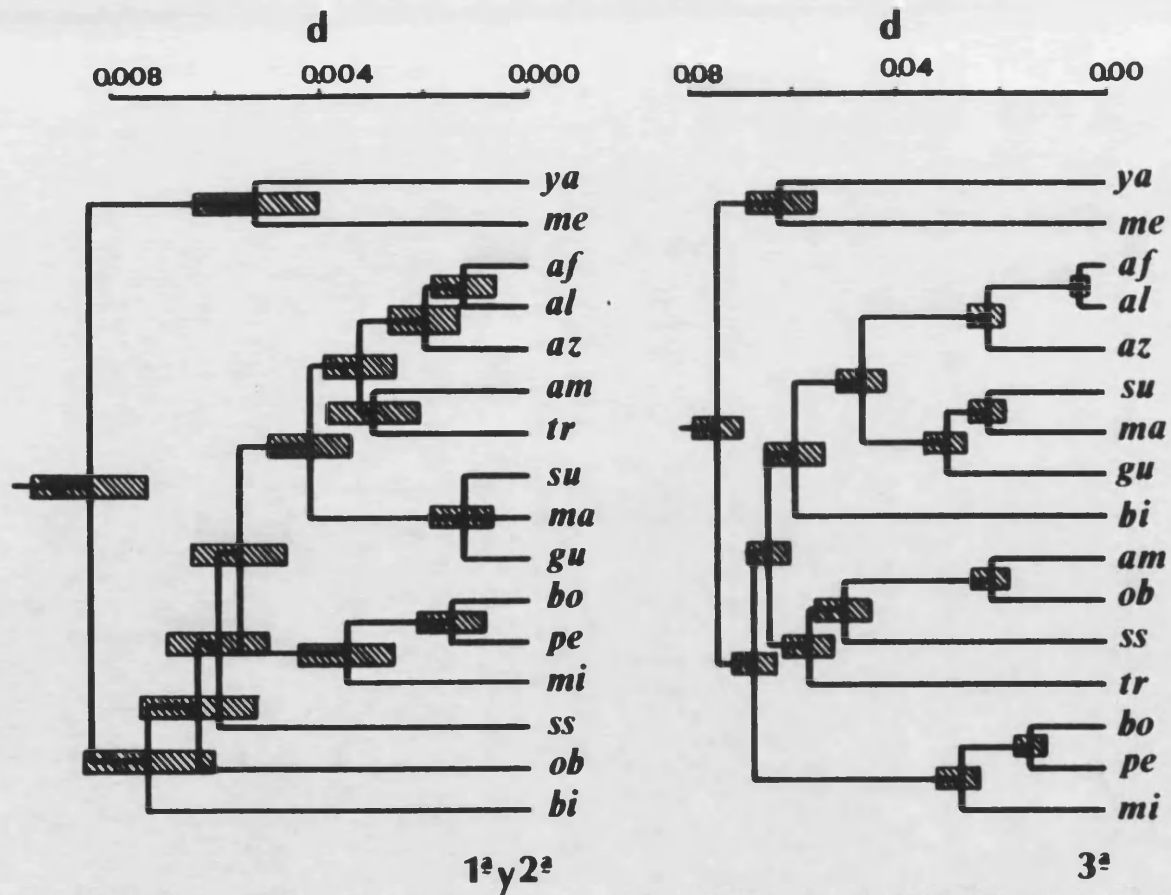
MATRIZ DE DISTANCIAS DE KIMURA (2 PARAMETROS).

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRJ	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.2379	-														
AFF	0.2492	0.2582	-													
ALG	0.2492	0.2642	0.0196	-												
AZT	0.2462	0.2522	0.0937	0.0864	-											
SUB	0.2403	0.2642	0.1753	0.1780	0.1409	-										
MAD	0.2582	0.2765	0.1945	0.1974	0.1758	0.0852	-									
GUA	0.2890	0.2765	0.2113	0.2028	0.1863	0.1041	0.1376	-								
AMB	0.2771	0.3215	0.2289	0.2377	0.2497	0.2496	0.2526	0.2771	-							
OBS	0.3032	0.3491	0.2591	0.2656	0.2818	0.2779	0.2775	0.2871	0.0846	-						
SSV	0.3050	0.2612	0.2302	0.2270	0.2263	0.2322	0.2530	0.2557	0.2133	0.2259	-					
TRJ	0.3030	0.3052	0.2377	0.2498	0.2775	0.2562	0.2777	0.2651	0.1877	0.2142	0.2419	-				
BIF	0.2860	0.2864	0.1950	0.2006	0.2200	0.2467	0.2714	0.2647	0.2667	0.2826	0.2628	0.2697	-			
MIR	0.2922	0.3017	0.2285	0.2257	0.2344	0.2554	0.2582	0.2736	0.2713	0.2912	0.2486	0.2658	0.2613	-		
BOG	0.3256	0.3284	0.2522	0.2583	0.2707	0.2713	0.2739	0.2804	0.2941	0.3048	0.2608	0.2915	0.2894	0.1158	-	
PER	0.2988	0.2922	0.2344	0.2344	0.2493	0.2621	0.2463	0.2680	0.2777	0.2918	0.2365	0.2718	0.2767	0.1023	0.0562	-

MATRIZ DE VARIANZAS DE LAS DISTANCIAS.

	YAK	MEL	AFF	ALG	AZT	SUB	MAD	GUA	AMB	OBS	SSV	TRJ	BIF	MIR	BOG	PER
YAK	-															
MEL	0.0007	-														
AFF	0.0007	0.0007	-													
ALG	0.0007	0.0007	0.0000	-												
AZT	0.0007	0.0007	0.0002	0.0002	-											
SUB	0.0007	0.0007	0.0005	0.0005	0.0003	-										
MAD	0.0007	0.0008	0.0005	0.0005	0.0005	0.0002	-									
GUA	0.0008	0.0008	0.0006	0.0005	0.0005	0.0003	0.0004	-								
AMB	0.0008	0.0010	0.0006	0.0007	0.0007	0.0007	0.0007	0.0008	-							
OBS	0.0009	0.0011	0.0007	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.0002	-						
SSV	0.0009	0.0007	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0007	0.0007	0.0006	0.0006	-					
TRJ	0.0009	0.0009	0.0007	0.0007	0.0008	0.0007	0.0008	0.0008	0.0005	0.0006	0.0007	-				
BIF	0.0008	0.0008	0.0005	0.0005	0.0006	0.0007	0.0008	0.0008	0.0008	0.0009	0.0008	0.0008	-			
MIR	0.0009	0.0009	0.0006	0.0006	0.0006	0.0007	0.0007	0.0008	0.0008	0.0009	0.0007	0.0008	0.0007	-		
BOG	0.0010	0.0010	0.0007	0.0007	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.0009	0.0009	0.0008	0.0009	0.0009	0.0003	-	
PER	0.0009	0.0009	0.0006	0.0006	0.0007	0.0008	0.0007	0.0008	0.0008	0.0009	0.0007	0.0008	0.0008	0.0003	0.0001	-

Abreviaturas como en la Tabla 8.



**Figura 26.** Dendrogramas obtenidos mediante el análisis de agrupamiento según el método UPGMA, utilizando, en uno de ellos, los valores de divergencia nucleotídica de las primeras y segundas posiciones de los codones de las regiones secuenciadas de los genes mitocondriales codificantes de proteínas (cytb, ND1 y ND5) de las especies del grupo *obscura*, y en el otro, las correspondientes a las terceras posiciones de los mismos codones. Las divergencias nucleotídicas utilizadas, obtenidas por el método de Kimura de 2 parámetros, se muestran en la Tabla 17. Con recuadros rayados se señalan los errores estándar de los nodos. *D. yakuba* (ya) y *D. melanogaster* (me) son las especies externas de referencia. Las restantes abreviaturas se corresponden con las reseñadas en la Figura 25.

proteínicos conservados y variables, regiones intergénicas) que nos permitieron obtener una distancia genética global entre mtDNAs.

Las estimas de divergencia se realizaron utilizando métodos que, a partir de modelos estocásticos de sustitución nucleotídica, permiten estimar el número de sustituciones nucleotídicas acontecidas, teniendo en cuenta las sustituciones múltiples, superimpuestas y revertidas que no se detectan al comparar dos secuencias. Se han propuesto distintos métodos de estima de divergencias nucleotídicas, que parten de idénticas o diferentes tasas de sustitución entre los cuatro nucleótidos (para una revisión ver Gojobori et al., 1990).

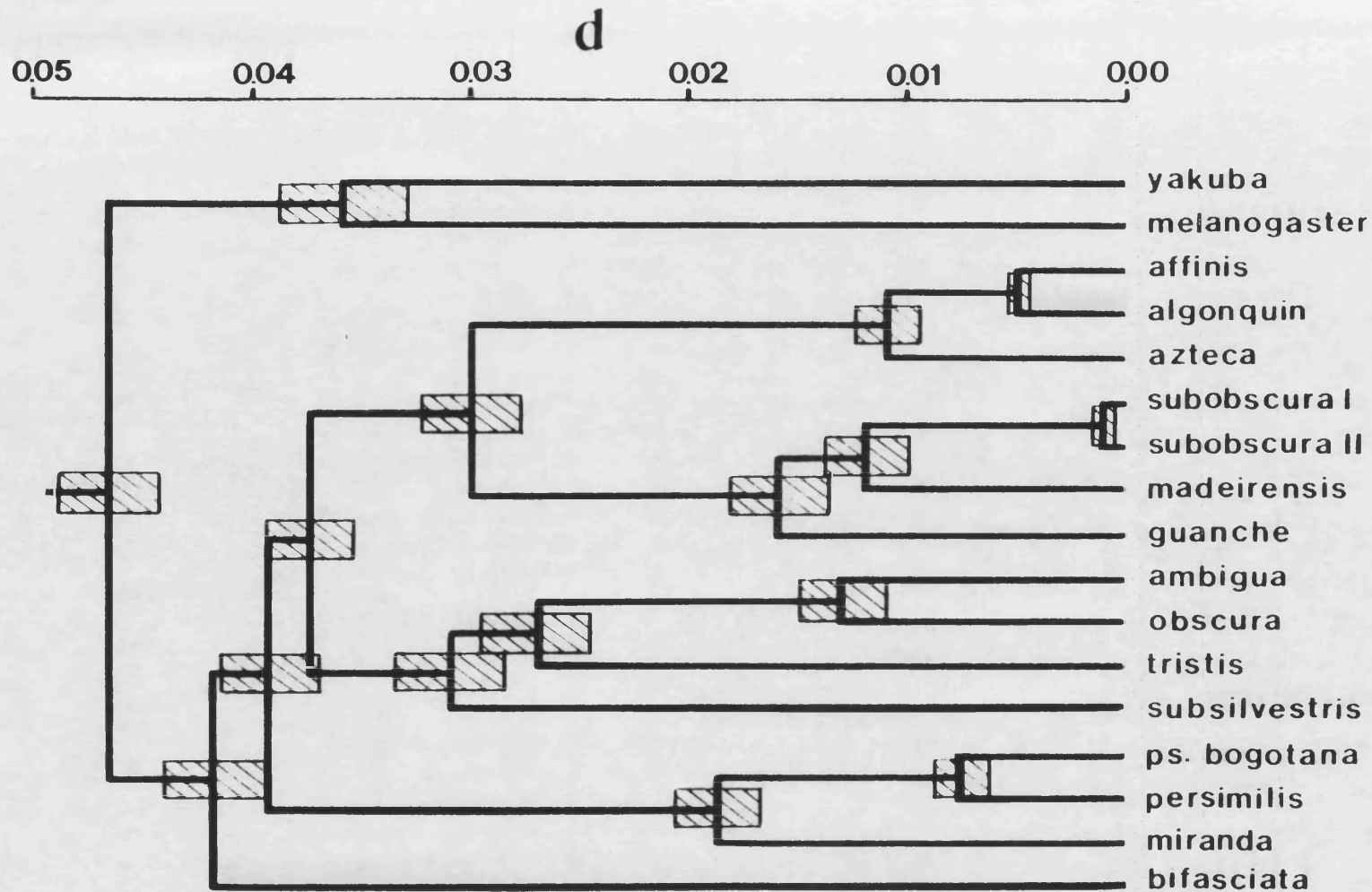
Al disponer del programa DISTANCE (López-Bueno y González-Candelas, 1992), que permite realizar las estimas con los distintos métodos, se utilizaron todos los disponibles, desde el más sencillo de Jukes y Cantor (1969) que considera una única tasa para todas las posibles sustituciones, hasta el de Kimura de 6 parámetros (Gojobori et al., 1982) que tiene en consideración la composición nucleotídica de las secuencias y utiliza hasta 6 tasas distintas. Al comparar las estimas obtenidas con los distintos métodos, se observó que no diferían entre sí más de un 1% (datos no mostrados). Los propios autores de los métodos (Gojobori et al., 1990) aconsejan utilizar los métodos de 4 y 6 parámetros únicamente cuando las sustituciones dependan del tipo de nucleótido, o cuando la divergencia nucleotídica (sustituciones nucleotídicas por sitio) sea mayor de 1,0. Cuando las diferencias entre transiciones y transversiones sean patentes, recomiendan el uso de los métodos de 2 o de 3 parámetros, ya que las diferencias entre ambos son mínimas. Por tanto, decidimos utilizar uno de los métodos más simples y cuya varianza, a su vez, es fácilmente estimable: el de Kimura de 2 parámetros (1980), que asume distinta tasa de sustitución para las transiciones y las transversiones (Tabla 18). Por otro lado este fue el método que veníamos utilizando para las estimas de divergencia para genes individuales.

El primer método utilizado fue el de la distancia promedio o UPGMA a partir de los valores de distancias de la Tabla 18. La Figura 27 muestra el resultado obtenido señalándose en los nodos las desviaciones estándar (Nei et al., 1985).



**Tabla 18.** Matriz de divergencias nucleotídicas (bajo la diagonal) y errores estándar (sobre la diagonal) obtenidos mediante el método de Kimura de 2 parámetros (1980) a partir del total de regiones secuenciadas del genoma mitocondrial de las especies del grupo *obscura*

	<i>yak</i>	<i>mel</i>	<i>aff</i>	<i>alg</i>	<i>azt</i>	<i>subI</i>	<i>subII</i>	<i>mad</i>	<i>gua</i>	<i>amb</i>	<i>obs</i>	<i>ssv</i>	<i>tri</i>	<i>bif</i>	<i>mir</i>	<i>bog</i>	<i>per</i>
<i>yakuba</i>	---	0.0063	0.0069	0.0068	0.0068	0.0067	0.0067	0.0068	0.0072	0.0070	0.0075	0.0073	0.0076	0.0075	0.0073	0.0074	0.0072
<i>melanogaster</i>	0.0722	---	0.007	0.0007	0.00069	0.0070	0.0070	0.0071	0.0072	0.0075	0.0080	0.0071	0.0077	0.0076	0.0075	0.0077	0.0074
<i>affinis</i>	0.0843	0.0869	---	0.0022	0.0035	0.0055	0.0055	0.0058	0.0060	0.0061	0.0066	0.0060	0.0065	0.0064	0.0062	0.0064	0.0063
<i>algonquin</i>	0.0838	0.0870	0.0093	---	0.0033	0.0055	0.0055	0.0057	0.0059	0.0061	0.0066	0.0059	0.0066	0.0064	0.0062	0.0064	0.0062
<i>azteca</i>	0.0821	0.0859	0.0230	0.0209	---	0.0055	0.0055	0.0058	0.0059	0.0062	0.0067	0.0059	0.0068	0.0065	0.0061	0.0065	0.0063
<i>subobscura I</i>	0.0805	0.0864	0.0554	0.0565	0.0560	---	0.0010	0.0036	0.0040	0.0061	0.0066	0.0060	0.0065	0.0067	0.0066	0.0065	0.0064
<i>subobscura II</i>	0.0805	0.0876	0.0554	0.0554	0.0565	0.0021	---	0.0036	0.0040	0.0061	0.0066	0.0059	0.0065	0.0066	0.0065	0.0064	0.0063
<i>madeirensis</i>	0.0834	0.0894	0.0615	0.0604	0.0615	0.0252	0.0241	---	0.0044	0.0061	0.0065	0.0061	0.0067	0.0068	0.0065	0.0065	0.0063
<i>guanche</i>	0.0921	0.0924	0.0661	0.0627	0.0632	0.0305	0.0300	0.0370	---	0.0064	0.0068	0.0060	0.0068	0.0069	0.0067	0.0067	0.0066
<i>ambigua</i>	0.0872	0.0992	0.0671	0.0671	0.0688	0.0683	0.0677	0.0671	0.0739	---	0.0037	0.0056	0.0052	0.0066	0.0067	0.0066	0.0065
<i>obscura</i>	0.0998	0.1104	0.0782	0.0787	0.0800	0.0790	0.0784	0.0773	0.0824	0.0262	---	0.0059	0.0057	0.0070	0.0071	0.0069	0.0068
<i>subsilvestris</i>	0.0955	0.0886	0.0664	0.0641	0.0642	0.0648	0.0637	0.0671	0.0665	0.0579	0.0628	---	0.0062	0.0065	0.0064	0.0064	0.0063
<i>tristis</i>	0.1016	0.1040	0.0771	0.0776	0.0818	0.0773	0.0756	0.0813	0.0818	0.0506	0.0599	0.0696	---	0.0070	0.0070	0.0070	0.0067
<i>bifasciata</i>	0.1000	0.1020	0.0742	0.0737	0.0761	0.0803	0.0791	0.0825	0.0849	0.0794	0.0884	0.0772	0.0885	---	0.0071	0.0070	0.0069
<i>miranda</i>	0.0949	0.0988	0.0693	0.0682	0.0672	0.0776	0.0764	0.0770	0.0816	0.0796	0.0897	0.0737	0.0868	0.0888	---	0.0046	0.0045
<i>ps. bogotana</i>	0.0964	0.1028	0.0749	0.0744	0.0768	0.0763	0.0751	0.0757	0.0803	0.0790	0.0856	0.0748	0.0868	0.0870	0.0390	---	0.0027
<i>persimilis</i>	0.0930	0.0975	0.0721	0.0704	0.0722	0.0740	0.0728	0.0723	0.0785	0.0767	0.0839	0.0719	0.0817	0.0853	0.0380	0.0145	---



**Figura 27.** Dendrograma obtenido mediante el análisis de agrupamiento según el método UPGMA, de las 15 secuencias del total de regiones estudiadas del mtDNA de especies del grupo *obscura*, utilizando los valores de divergencia obtenidas por el método de Kimura de 2 parámetros de la Tabla 18. Con recuadros rayados se señalan los errores estándar de los nodos. *D. yakuba* y *D. melanogaster* son las especies externas de referencia.



El árbol resultante del análisis de las distancias estimadas a partir de la totalidad de las regiones secuenciadas posee una topología concordante con la obtenida para los árboles determinados a partir de las distancias estimadas para cada región funcional secuenciada. Así, en la Figura 27 se observa que el grupo *obscura* es significativamente monofilético y está formado por cinco linajes, dos de ellos conducentes a agrupaciones definidas (subgrupos *affinis* y *pseudoobscura*), y los otros tres conducentes a las especies del heterogéneo subgrupo *obscura* (*D. bifasciata*, trío *D. guanche-D. madeirensis-D. subobscura*, cuarteto *D. obscura-D. ambigua-D. tristis-D. subsilvestris*).

La relación entre estos linajes no queda clara, tal como indican las desviaciones estándar de las distancias internodales. Únicamente aparece como significativa la relación entre el subgrupo *affinis* y el trío formado por *subobscura* y sus dos especies afines, *madeirensis* y *guanche*. Como se puede observar, el que las relaciones no sean significativas no es debida al error asociado al método, que es aproximadamente igual de grande en todos los nodos, sino a la longitud de las ramas.

Tampoco se clarifican algunas relaciones entre especies de un mismo linaje. Así, aunque el par *ambigua-obscura* es muy claro, la siguiente especie en unirse puede ser tanto *tristis* como *subsilvestris*. Lo mismo ocurre entre el trío *subobscura, madeirensis* y *guanche*.

Del análisis, así como de los valores de divergencia (Tabla 18 y por linajes en la Tabla 19), destaca el hecho de que la divergencia entre los linajes del subgrupo *obscura* (entre el cuarteto donde se encuentra *obscura* y el trío de *subobscura*,  $0.074 \pm 0.007$ ; entre el cuarteto de *obscura* y *D. bifasciata*,  $0.0837 \pm 0.005$ ; entre el trío *subobscura* y *D. bifasciata*  $0.823 \pm 0.002$ ) es del mismo orden que la observada entre especies de los tres subgrupos ( $0.072 \pm 0.003$  entre los subgrupos *pseudoobscura* y *affinis*,  $0.080 \pm 0.005$  entre *pseudoobscura* y *obscura*, y  $0.068 \pm 0.008$  entre *affinis* y *obscura*).

Ya que en el caso de existencia de tasas heterogéneas en los distintos linajes la reconstrucción filogenética obtenida por el método UPGMA (que asume tasa constante) no sería la correcta, se realizó el análisis mediante los métodos de Fitch y Margoliash (1967) y del vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987).

**Tabla 19.** Divergencia nucleotídica promedio con su error estándar en y entre agrupaciones de especies obtenidas a partir de las divergencias de la Tabla 18.

Especies comparadas (Nº de Comparaciones)	substituciones por sitio
En el subgrupo <i>affinis</i> (3)	0.0177 ± 0.0060
En el linaje <i>gua-mad-sub</i> (3)	0.0307 ± 0.0050
En el linaje <i>amb-bif-obs-ssv-tri</i> (10)	0,0664 ± 0.0050
En el cuarteto <i>amb-obs-ssv-tri</i> (6)	0.0548 ± 0.0139
En el linaje <i>amb-obs-tri</i> (3)	0.0459 ± 0.0144
En el subgrupo <i>pseudoobscura</i> (3)	0.0304 ± 0.0113
En el subgrupo <i>obscura</i> (28)	0.0675 ± 0.0181
Subgrupo <i>affinis</i> frente al linaje <i>gua-mad-sub</i> (9)	0.0592 ± 0.0036
Subgrupo <i>affinis</i> frente al linaje <i>amb-bif-obs-ssv-tri</i> (15)	0.0732 ± 0.0060
Subgrupo <i>affinis</i> frente al cuarteto <i>amb-obs-ssv-tri</i> (12)	0.0728 ± 0.0066
Subgrupo <i>affinis</i> frente al linaje <i>amb-obs-tri</i> (9)	0.0754 ± 0.0057
Subgrupo <i>affinis</i> frente al linaje <i>subsilvestris</i> (3)	0.0651 ± 0.0011
Subgrupo <i>affinis</i> frente al linaje <i>bifasciata</i> (3)	0.0746 ± 0.0010
Subgrupo <i>affinis</i> frente al subgrupo <i>pseudoobscura</i> (9)	0.0717 ± 0.0031
Subgrupo <i>affinis</i> frente al subgrupo <i>obscura</i> (24)	0.0683 ± 0.0081
El linaje <i>gua-mad-sub</i> frente al linaje <i>amb-bif-obs-ssv-tri</i> (15)	0.0756 ± 0.0069
El linaje <i>gua-mad-sub</i> frente al cuarteto <i>amb-obs-ssv-tri</i> (12)	0.0739 ± 0.0067
El linaje <i>gua-mad-sub</i> frente al linaje <i>amb-obs-tri</i> (9)	0.0756 ± 0.0056
El linaje <i>gua-mad-sub</i> frente al linaje <i>subsilvestris</i> (3)	0.0660 ± 0.0011
El linaje <i>gua-mad-sub</i> frente al linaje <i>bifasciata</i> (3)	0.0823 ± 0.0021
El linaje <i>gua-mad-sub</i> frente al subgrupo <i>pseudoobscura</i> (9)	0.0767 ± 0.0029
El linaje <i>amb-bif-obs-ssv-tri</i> frente al subgrupo <i>pseudoobscura</i> (15)	0.0820 ± 0.0056
El cuarteto <i>amb-obs-ssv-tri</i> frente al linaje <i>bifasciata</i> (4)	0.0837 ± 0.0053
El cuarteto <i>amb-obs-ssv-tri</i> frente al subgrupo <i>pseudoobscura</i> (12)	0.0809 ± 0.0057
El linaje <i>amb-obs-tri</i> frente al linaje <i>subsilvestris</i> (3)	0.0636 ± 0.0049
El linaje <i>amb-obs-tri</i> frente al linaje <i>bifasciata</i> (3)	0.0858 ± 0.0045
El linaje <i>amb-obs-tri</i> frente al linaje <i>pseudoobscura</i> (9)	0.0834 ± 0.0042
El linaje <i>subsilvestris</i> frente a el linaje <i>bifasciata</i> (1)	0.0774 ± 0.0000
El linaje <i>subsilvestris</i> frente al subgrupo <i>pseudoobscura</i> (3)	0.0735 ± 0.0013
El linaje <i>bifasciata</i> frente al subgrupo <i>pseudoobscura</i> (3)	0.0866 ± 0.0015
El subgrupo <i>pseudoobscura</i> frente al subgrupo <i>obscura</i> (24)	0.0800 ± 0.0054

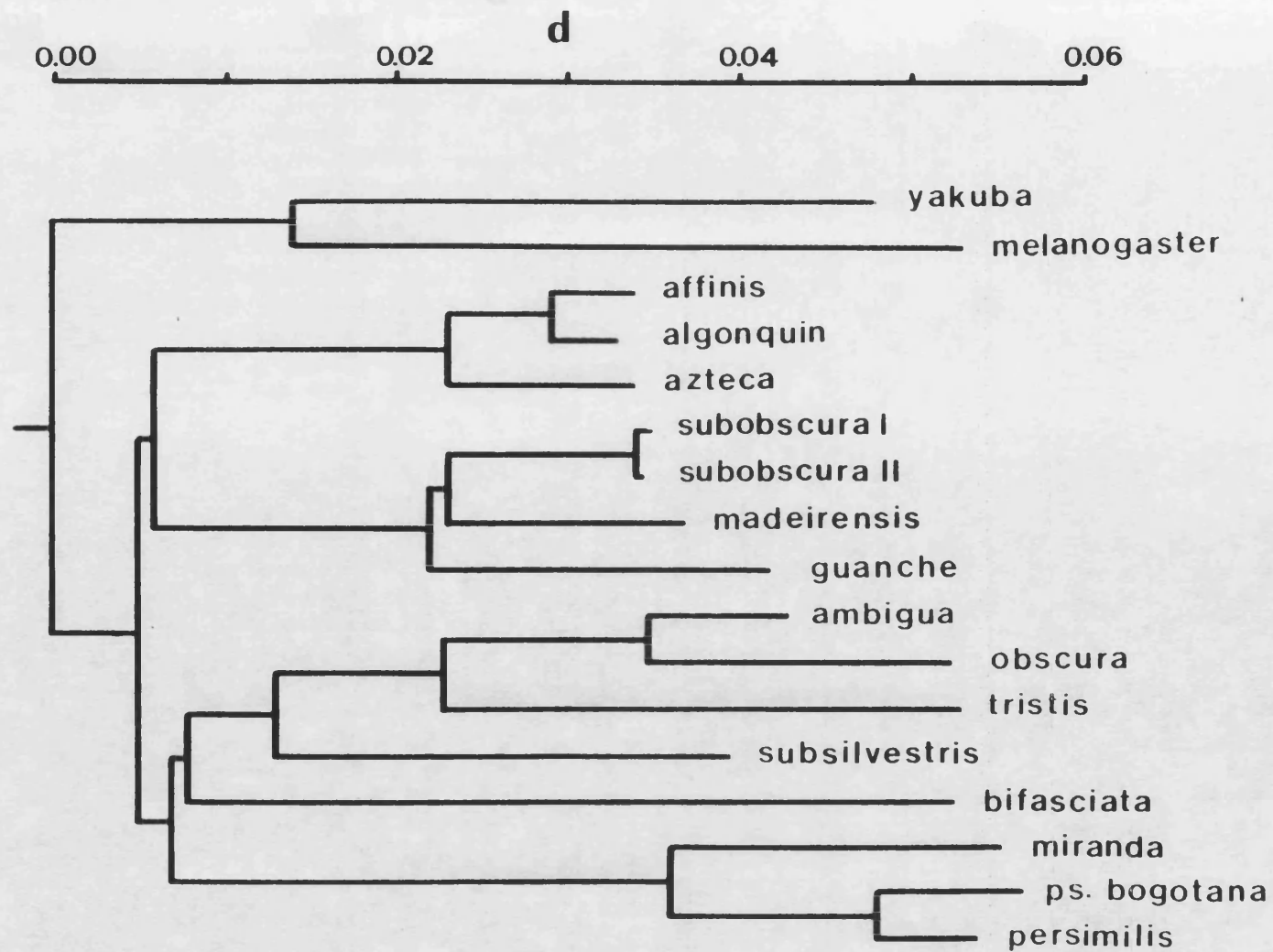
Abreviaturas: *amb* = *ambigua*, *bif* = *bifasciata*, *gua* = *ganche*, *mad* = *madeirensis*, *obs* = *obscura*, *sub* = *subobscura*, *ssv* = *subsilvestris*, *tri* = *tristis*.

El primero de ellos, construye el árbol escogiendo la topología que minimiza la diferencia entre las distancias de los taxones derivadas del árbol y las originales. En cambio, el segundo método utiliza un algoritmo de construcción de árboles semejante al del UPGMA pero sin asumir tasa constante (ultrametricidad). A partir de la matriz de distancias original obtiene una matriz modificada, en la que la divergencia de cada par de taxones es ajustada en base a la divergencia promedio de ambos taxones al resto, lo que equivale a la normalización de la divergencia de cada taxón por su tasa promedio. Así, partiendo de una topología en estrella se determinan las relaciones de vecindad o proximidad entre taxones. Para obtener los árboles por estos métodos, se han utilizado los programas FITCH y NEIGHBOR, respectivamente, del paquete de análisis filogenético PHYLIP 3.4 de Felsenstein. El resultado de estos análisis queda recogido en las Figura 28 y 29, respectivamente.

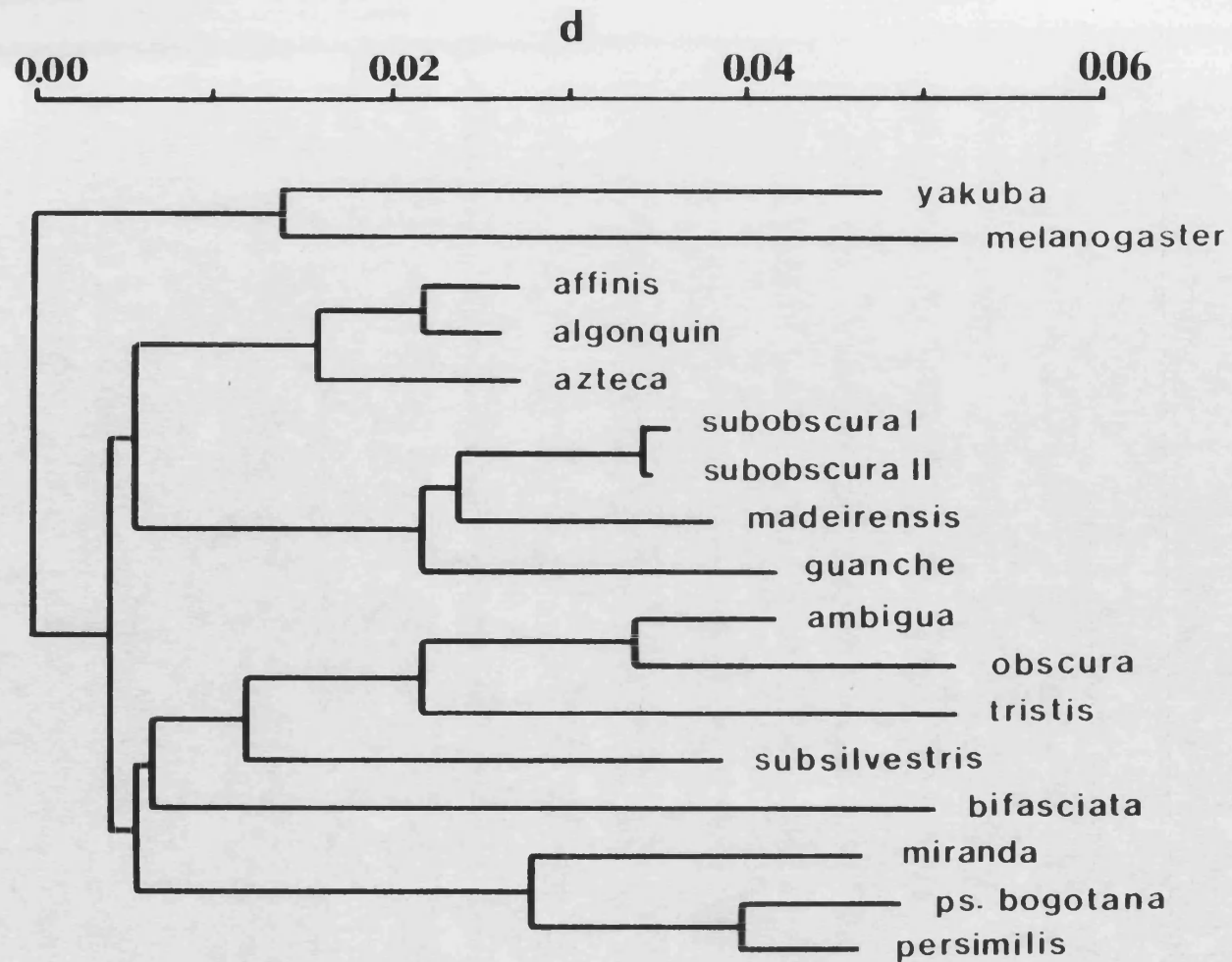
Ambos árboles muestran los mismos resultados, que a su vez, son semejantes a los obtenidos por el método UPGMA. Muestran la existencia de 5 linajes: el del subgrupo *affinis*, el del subgrupo *pseudoobscura*, y tres del polifilético subgrupo *obscura*. Las relaciones entre linajes son semejantes tanto con la asunción de tasa constante como sin ella. La única diferencia estriba en el linaje de *D. bifasciata* que, en los árboles obtenidos con los métodos de Fitch y Margoliash y del vecino más próximo, se une al cuarteto *D. obscura*-*D. ambigua*-*D. tristis*-*D. subsilvestris*, aunque la rama que los relaciona es muy corta. También son cortas las ramas que relacionan entre sí los distintos linajes. Por último, cabe destacar que el trío *subobscura-guanche-madeirensis* sigue diferenciándose de las otras especies del subgrupo *obscura*, del cual forman parte según la sistemática clásica del grupo *obscura*.

## 5.2. Árboles filogenéticos basados en caracteres.

De entre los métodos numéricos de inferencia filogenética basada en caracteres, los más utilizados, con diferencia, son los métodos basados en el principio de máxima parsimonia. Esto es, a partir de los alineamientos de secuencias, y considerando cada posición nucleotídica como un carácter independiente con cuatro posibles estados que se ganan o pierden por sustitución nucleotídica, podemos construir una filogenia que minimice el



**Figura 28.** Arbol filogenético sin raíz de las especies del grupo *obscura*, obtenido mediante el método de mínimas distancias cuadráticas de Fitch y Margoliash (1967), a partir de los valores de divergencia nucleotídica de las secuencias de todas las regiones analizadas de sus genomas mitocondriales (Tabla 18).



**Figura 29.** Arbol filogenético sin raíz obtenido mediante el análisis según el método del vecino más próximo (neighbor joining method), de las 15 secuencias del total de regiones estudiadas del mtDNA de especies grupo *obscura*, utilizando los valores de divergencia nucleotídica obtenidos por el método de Kimura de 2 parámetros de la Tabla 18. *D. yakuba* y *D. melanogaster* son las especies externas.



número de sustituciones nucleotídicas requeridas para conectar todas las especies.

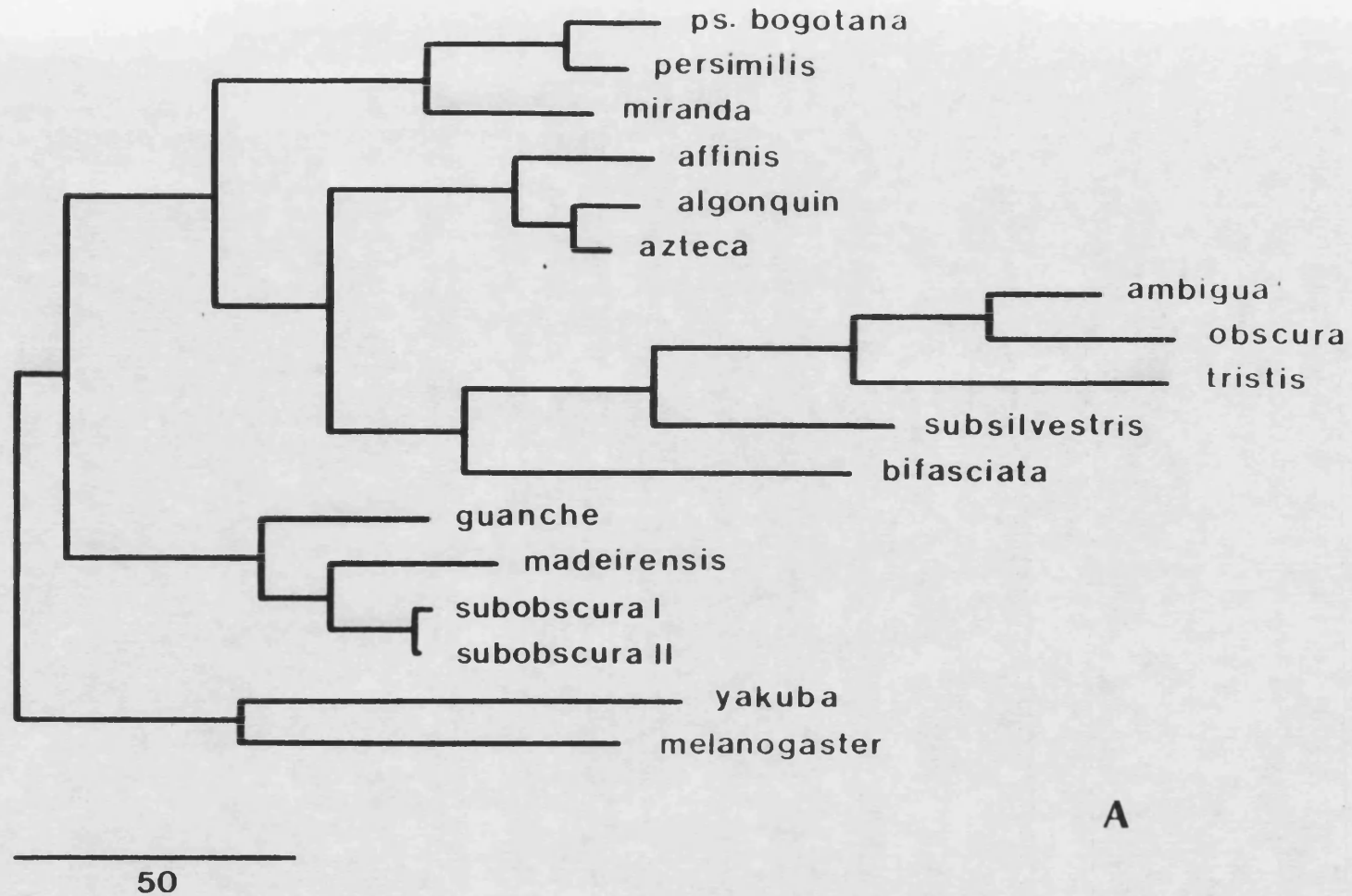
Dada la asunción de independencia de los caracteres, en este caso no hay duda de que se pueden analizar conjuntamente las secuencias de distintas regiones génicas (Swofford y Olsen, 1990).

Como ya se ha señalado para datos de restricción (apartado 1.4.2.), la parsimonia no es definible de forma única, depende de qué eventos evolutivos sean permitidos y de cómo minimizar su número. Así vimos que para el caso de cualquier carácter se definían distintos criterios: el de **Camin-Sokal** (para cada carácter se conoce el estado inicial, y sólo son permitidos los cambios al estado nuevo o derivado), el de **Wagner** (los cambios pueden ser reversibles), el de **Dollo**, (los caracteres complejos se adquieren difícilmente y se pierden con facilidad), y el de **compatibilidad**, que algunos autores no incluyen dentro de los de máxima parsimonia y que trata de minimizar las homoplasias.

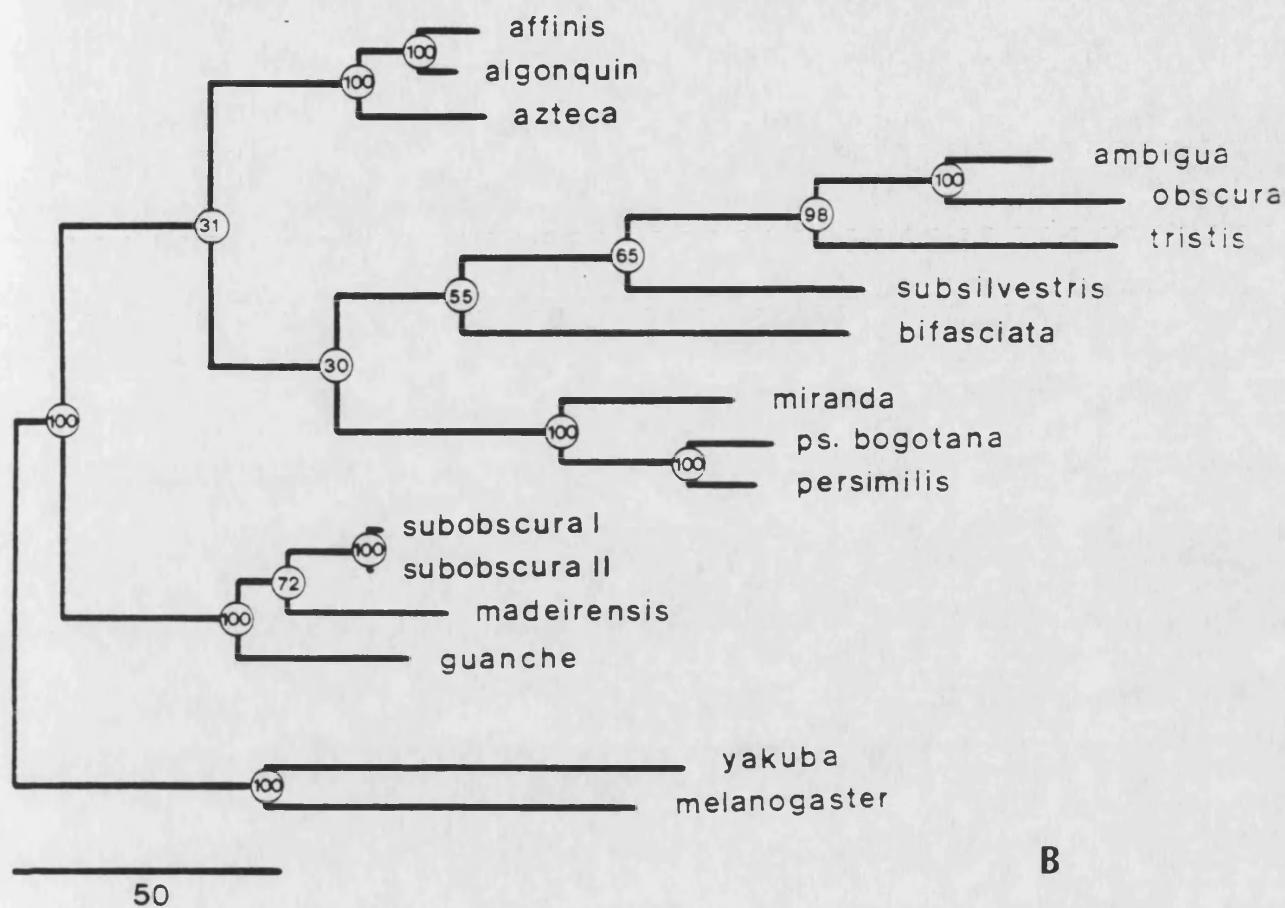
En la utilización de métodos parsimónicos a partir de secuencias, se utiliza siempre el criterio de Wagner, debido a que se considera igual de probable cualquier tipo de sustitución nucleotídica. Sin embargo, debido a las constricciones funcionales del genoma mitocondrial, así como al sesgo en la frecuencia de los distintos tipos de sustituciones nucleotídicas en *Drosophila* (Wolstenholme y Clary, 1985; DeSalle et al., 1987), dicha asunción no es del todo cierta, aumentando la probabilidad de reversión o convergencia (homoplasias). Cabe la posibilidad, por tanto, de obtener topologías erróneas con este método, y aunque se han propuesto distintos métodos para eliminar algunos efectos sobre la reconstrucción filogenética, como dar distinto peso a ciertas posiciones nucleotídicas (parsimonia generalizada) o sólo considerar las transversiones frente a las transiciones, más probables, que pueden generar sobreimposición o reversión (parsimonia de transversión), no existe ningún método que elimine el sesgo producido por la especial dinámica evolutiva del mtDNA de insectos (Simon, 1991).

La Figura 30 muestra una serie de árboles obtenidos mediante el principio de máxima parsimonia. El programa que se utilizó fue DNAPARS para obtener el más parsimónico, y el programa interactivo DNAMOVE para ensayar otras topologías que agruparan distintas combinaciones de los





**Figura 30 A.** Arbol filogenético sin raíz más parsimónico obtenido según el criterio de Wagner para las 15 secuencias del genoma mitocondrial de especies del grupo *obscura* estudiadas. Las longitudes de las ramas son proporcionales al número de pasos mutacionales requeridos para conectar todas las especies, cuya escala se representa en el ángulo inferior izquierdo. *D. yakuba* y *D. melanogaster* son las especies de referencia externa.



**Figura 30 B.** Arbol filogenético sin raíz obtenido por remuestreo de 2000 replicas según el método de "bootstrap" aplicando el criterio de Wagner de parsimonia para las 15 secuencias del genoma mitocondrial de especies del grupo *obscura*. Las longitudes de las ramas son proporcionales al número de pasos mutacionales requeridos para conectar todas las especies, cuya escala se representa en el ángulo inferior izquierdo. Los números en los nodos, rodeados por un círculo, indican el porcentaje de replicas en las que aparece la agrupación de especies, situadas a la izquierda del nodo, al realizar el análisis de remuestreo ("bootstrap"). Este árbol sólo requiere un paso mutacional más que el más parsimónico representado en la Figura 30 A. *D. yakuba* y *D. melanogaster* son las especies de referencia externa.

diferentes linajes del grupo *obscura*. Ambos programas son del paquete PHYLIP de Felstenstein. Una vez obtenidas las topologías se utilizó el programa PAUP de Swofford (1985), para determinar las sustituciones de cada rama de las distintas topologías definidas.

El árbol más parsimónico (Figura 30a) requirió 920 pasos mutacionales. La topología obtenida es semejante a la de los análisis basados en distancias. El árbol muestra, de nuevo, los subgrupos neárticos, *pseudoobscura* y *affinis*, como agrupamientos perfectamente definidos. No así el subgrupo *obscura*, que aparece como una agrupación heterogénea formada, en este caso, por dos linajes perfectamente diferenciados, el quinteto *obscura-ambigua-tristis-subsilvestris-bifasciata* (ya que *bifasciata* se une a él) y el trío *subobscura-madeirensis-guanche*, que sigue apareciendo como un agrupación separada del resto de especies del subgrupo *obscura*.

Para comprobar la fiabilidad del árbol, se procedió a realizar un procedimiento de remuestreo por el método de "bootstrap" (Felsenstein, 1985). Se realizaron 2000 remuestreos para que los resultados fueran estadísticamente fiables (Hedges, 1992). Los valores obtenidos se señalan en los nodos del árbol de la Figura 30b, tomándose como grupos significativamente monofiléticos aquellos que aparecieron como tales en más de un 95% de las replicas.

La topología obtenida en este caso es diferente, pero sólo implica 1 paso mutacional más (921) que el más parsimónico. En el análisis aparecen distintas agrupaciones como monofiléticamente significativas. Así, todo el grupo *obscura* es monofilético (100%) frente a las especies del subgrupo *melanogaster* de referencia. Sin embargo, no todos los linajes del grupo son monofiléticos.

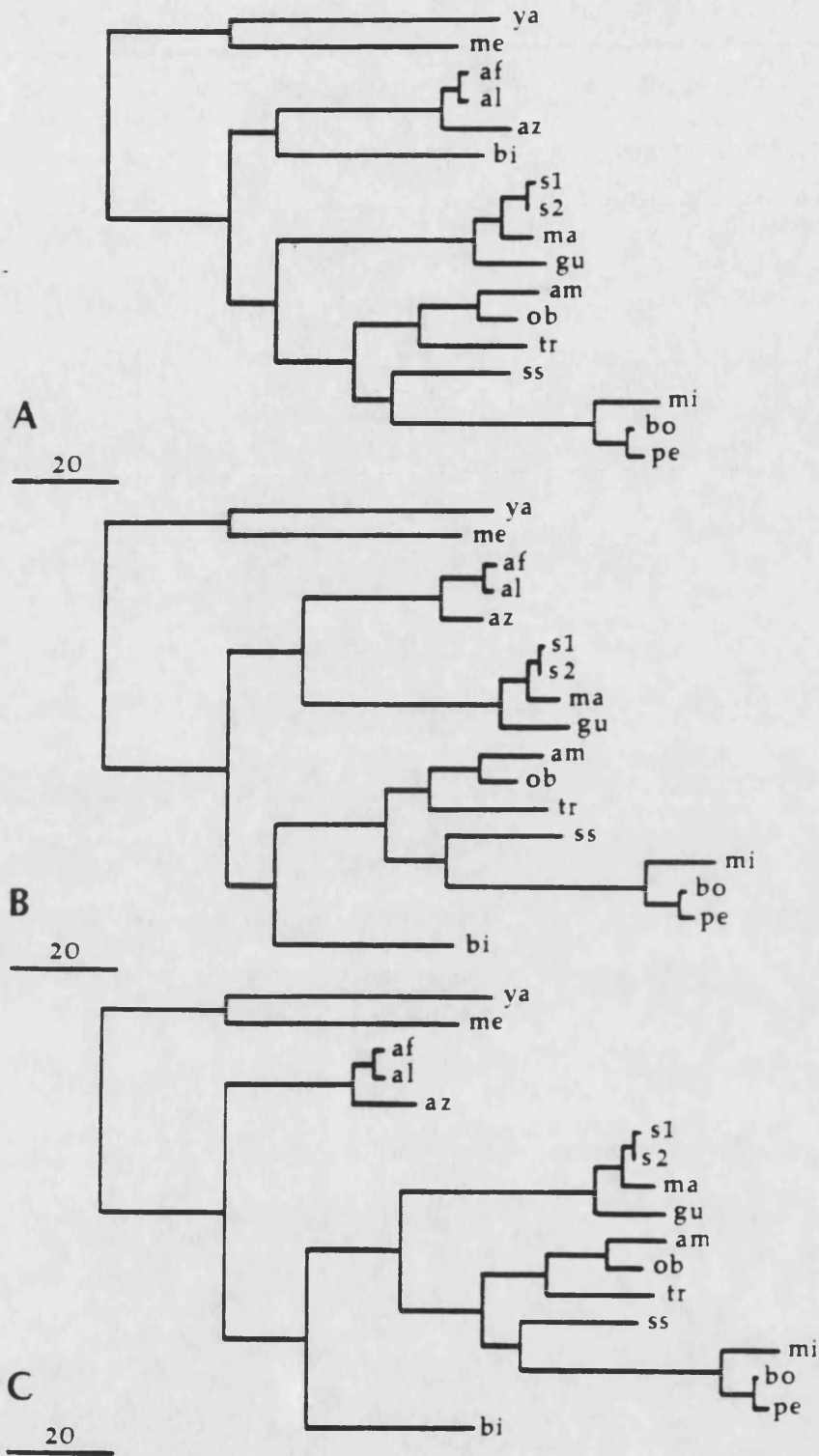
Tanto los subgrupos *affinis* como *pseudoobscura* son claramente monofiléticos (100%), y las relaciones entre sus especies quedan clarificadas. Así, en el subgrupo *affinis*, primero diverge *D. azteca*, y luego el par *affinis-algonquin*; y en el *pseudoobscura*, primero *D. miranda* y después el par *D. pseudoobscura bogotana* y *D. persimilis*. El linaje *subobscura* también es monofilético, pero las relaciones entre las tres especies del linaje son confusas (el par *subobscura-madeirensis* no es significativo, 71.83%).

Del resto de especies del subgrupo *obscura* únicamente el trío *obscura-ambigua-tristis* es monofilético (98.33%, el par *obscura-ambigua* 99.78%). El resto de nodos no son significativos, así *D. subsilvestris* se une al trío anterior en un 65.44% de los casos y *D. bifasciata* en un 55.23%. Por otra parte, tampoco son significativas las relaciones entre los linajes y subgrupos según el análisis parsimónico (<32%).

Ya que las relaciones entre linajes no quedaban refrendadas por el análisis de remuestreo ("bootstrap"), se ensayaron otras topologías que relacionaban de distintas formas dichos linajes (árboles no mostrados). El programa DNAPARS para árboles definidos permite realizar un análisis estadístico que determina si las diferencias entre los árboles son significativas o no (Felsenstein, 1985). Del resultado se desprende que las distintas topologías que relacionan distintas combinaciones de linajes no son significativamente diferentes entre sí, de acuerdo con los resultados del remuestreo. Este análisis corrobora el hecho de que las relaciones no son claras debido al escaso número de caracteres implicados en las ramas internodales que diferencian los distintos linajes.

En las inferencias filogenéticas entre especies divergentes se recomienda también la utilización de la parsimonia de transversión para evitar el efecto de la saturación por transiciones convergentes (DeSalle, 1992; Liu y Beckenbach, 1992), debida a la mayor tasa de transición que de transversión observada en los genomas mitocondriales (para primates ver Brown et al., 1982; para *Drosophila* ver DeSalle et al., 1987). Los posibles 4 estados (G,A,T,C) de cada carácter (posición nucleotídica) se redujeron a dos estados permitidos (purina o pirimidina). De este modo sólo se consideraron las transversiones (purina a pirimidina, o viceversa) en el análisis de parsimonia mediante el programa MIX del paquete PHYLIP de Felsenstein, utilizando el criterio de Wagner que considera igual de probables las sustituciones en un sentido que en el otro, purina por pirimidina que pirimidina por purina.

Los resultados del análisis de parsimonia de transversión se muestran en la Figura 31. Estos resultados son semejantes a los obtenidos mediante otros métodos. Así, aparece, de nuevo, un subgrupo *obscura* polifilético, formado, en este caso, por cuatro linajes diferenciados (el del trío *subobscura-madeirensis-guanche*, el del trío *obscura-ambigua-tristis*, el de *D.*



**Figura 31.** Árboles filogenéticos equiparsimónicos, obtenidos por el método de parsimonia de transversión para las 15 secuencias del genoma mitocondrial de especies del grupo *obscura* estudiadas. Las longitudes de las ramas son proporcionales al número de pasos mutacionales, debidos a transversión, requeridos para conectar todas las especies, cuya escala se representa en el ángulo inferior izquierdo de cada árbol. *D. yakuba* (*ya*) y *D. melanogaster* (*me*) son las especies de referencia externa. El resto de abreviaturas se corresponden con las de la Figura 25.

*subsilvestris* y el de *D. bifasciata*), y los dos subgrupos neárticos claramente monofiléticos. De nuevo, distintas relaciones entre los 6 linajes son posibles e igualmente válidas, aunque la mayor relación entre los linajes del subgrupo *pseudoobscura*, de *D. subsilvestris* y del trío *obscura-ambigua-tristis* parece confirmarse en los tres árboles.

### 5.3. Árboles filogenéticos basados en máxima verosimilitud.

La última aproximación a la resolución de la filogenia del grupo *obscura* proviene de la aplicación de métodos estadísticos al problema evolutivo.

Aunque existen muchos métodos de inferencia estadística, sin duda el más utilizado en la obtención de filogenias es el principio de máxima verosimilitud, inicialmente propuesto por Cavalli-Sforza y Edwards (1967) para la resolución de filogénias basadas en datos de frecuencias génicas.

Felsenstein (1973, 1981), partiendo de la hipótesis de que los cambios en secuencias nucleotídicas o aminoacídicas podían acontecer según un modelo estocástico de sustitución que podía seguir una distribución de Poisson, desarrolló un algoritmo de máxima verosimilitud para la obtención de reconstrucciones filogenéticas. El método permite determinar, tanto la mejor topología que explique el modelo, como las longitudes de las ramas en término de número esperado de sustituciones (no el real), así como los límites de confianza para las longitudes de las mismas.

Aunque el método asume algunos supuestos poco realistas (independencia de las posiciones, igual probabilidad de sustitución para todos los reemplazamientos nucleotídicos, etc.), da unos resultados tan buenos como los métodos anteriores, y en las condiciones en que otros métodos empiezan a fallar (tasas de error altas, o muy distintas entre ramas), mantiene un poder predictivo de la filogenia bastante alto (Hasegawa y Yano, 1984).

Para el análisis se utilizó el programa DNAML (basado en el método de Felsenstein, 1981) del paquete PHYLIP 3.4 del propio Felsenstein. Así, se fueron ensayando distintas hipótesis de partida, a partir

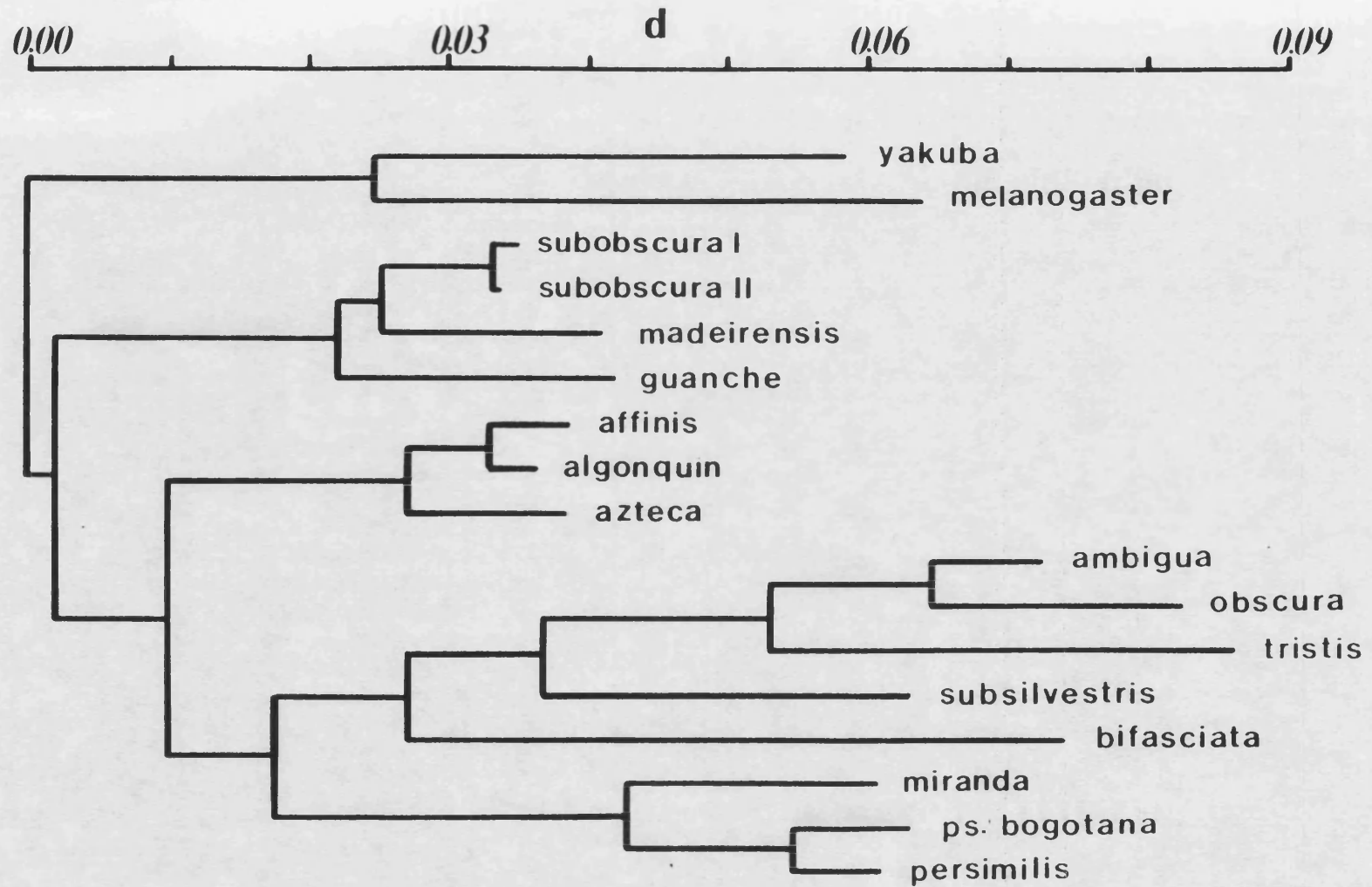
de las frecuencias nucleotídicas empíricas y distintas relaciones entre transiciones y transversiones (Ts/Tv), hasta conseguir el árbol máximo-verosímil de la Figura 32. La máxima verosimilitud se obtuvo con unas frecuencias nucleotídicas de A 41.1%, T 35.0%, G 10.2% y C 13.7%, y con una relación Ts/Tv de 1.0. Todas las ramas fueron significativas a  $P < 0.01$ , excepto la rama que conduce a *D. subobscura* II que lo fué a  $P < 0.05$ .

El árbol obtenido como más verosímil es coincidente con el obtenido en el análisis de "bootstrap", con la presencia de cuatro linajes. El primer linaje en divergir es el del trío *subobscura-madeirensis-guanche*, después el de las especies del subgrupo *affinis*, posteriormente el de las del subgrupo *pseudoobscura*, y por último el resto de especies del subgrupo *obscura*, donde se encuentra también *D. bifasciata*. Queda, de nuevo, patente la heterogeneidad del subgrupo *obscura*, formado por, al menos, dos linajes parafiléticos.

El programa DNAML permite ensayar varios árboles y determinar si las diferencias de verosimilitud son significativas o no según el test de Kishino y Hasegawa (1989). Se ensayaron las mismas topologías analizadas por parsimonia, que relacionaban distintas combinaciones entre linajes (entre ellas las de las Figuras 30 y 31), y se obtuvo idéntico resultado: ninguna de las topologías es significativamente peor que las otras. Ello nos lleva, de nuevo, a la imposibilidad de resolver las relaciones entre linajes.

#### **5.4. Métodos de los invariantes para la resolución de las relaciones entre linajes.**

En una reciente revisión, Li y Gouy (1990) recogen una serie de métodos estadísticos desarrollados para determinar la fiabilidad de las reconstrucciones filogenéticas. Algunos de ellos ya han sido aplicados en el apartado correspondiente, tales como la determinación de las varianzas internodales en árboles basados en distancias, el método de remuestreo "bootstrap" en árboles basados en caracteres, o el método de Kishino y Hasegawa (1989) para determinar si distintas reconstrucciones filogenéticas obtenidas por máxima verosimilitud son significativamente peores que la máximo-verosímil.



**Figura 32.** Análisis filogenético sin raíz obtenido mediante el método de máxima verosimilitud de Felsenstein (1981), a partir de los datos de 15 secuencias de especies del grupo *obscura*. El modelo partía de una proporción entre transiciones y transversiones de 1:1 y de las frecuencias nucleotídicas observadas en las secuencias.



Otro de los métodos que se recogen en la revisión es el de los Invariantes de Lake (1987), llamado también método de parsimonia evolutiva. Este método intenta eliminar el efecto de las homoplasias sobre las reconstrucciones filogenéticas basadas en parsimonia.

El método parte de un cuarteto de secuencias alineadas (llamémoslas A, B, C y D), que pueden agruparse en tres posibles topologías: A con B y C con D representado por ((A,B),(C,D)); ((A,C),(B,D)), y ((A,D),(B,C). De todas las posiciones nucleotídicas de las cuatro secuencias alineadas, únicamente aquellas que presentan dos purinas y dos pirimidinas (que implican transversiones) son utilizadas en el análisis, ya que las transiciones al ser más probables, pueden implicar sustituciones en paralelo, reversiones, o sobreimposiciones con mayor frecuencia.

El método asume que: a) las sustituciones en cada posición nucleotídica son independientes; b) los tipos de transversión están en equilibrio, o sea una purina puede ser sustituida por cualquiera de las dos pirimidinas con idéntica probabilidad, y viceversa (esta asunción no es cierta para el mitocondrial de insectos donde las transversiones A-T y T-A son más frecuentes); y c) los tipos de transición también están en equilibrio, o sea, una purina o pirimidina puede ser sustituida por la otra purina o pirimidina con la misma probabilidad que la segunda lo puede ser por la primera. Entonces, si las asunciones se cumplen, dos transversiones paralelas en dos ramas periféricas de un árbol (homoplasias) deberían dar con igual probabilidad tanto nucleótidos similares en las dos ramas como distintos. Por tanto, el total de transversiones paralelas que dan lugar a nucleótidos similares deben ser aproximadamente igual al total de transversiones paralelas que dan lugar a nucleótidos diferentes. Si contabilizamos ambos tipos de transversiones (las que dan lugar a nucleótidos similares y las que dan lugar a distintos nucleótidos), su diferencia debe ser 0. En cambio, cuando las transversiones no son paralelas y sí informativas, la diferencia entre transversiones que dan lugar a dos nucleótidos distintos y las que dan lugar a nucleótidos similares debe ser distinta de 0. En este caso el segundo tipo de transiciones será mayor, ya que dichas transversiones provendrán de un único suceso mutacional (según el criterio de parsimonia) que sólo puede generar dos nucleótidos idénticos.

Por tanto, contabilizando los dos tipos de transversiones (que dan lugar a dos nucleótidos distintos y que dan lugar a dos similares) en cada una de las tres topologías posibles, la correcta (refrendada por transversiones informativas) dará una diferencia distinta de 0 (el número de transversiones que dan lugar a dos nucleótidos idénticos será mayor), y las incorrectas (explicadas por transversiones en paralelo) darán una diferencia de 0.

El propio Lake (1987) sugirió la evaluación estadística mediante una prueba de Ji cuadrado con un grado de libertad de la diferencia entre ambos tipos de transversiones, para determinar si difiere o no significativamente de 0. No obstante, Holmquist et al. (1988) señalaron que cuando el número de transversiones es pequeño es más correcto utilizar el test de distribución binomial para determinar si el número de transversiones de cada tipo es o no significativamente distinto.

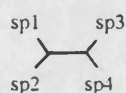
En el presente trabajo se utilizó el método de los invariantes de Lake para determinar las relaciones entre especies de los distintos linajes, así como entre especies de un mismo subgrupo cuya relación no quedaba claramente determinada por otros métodos. Para ello, se utilizó el programa DNAINVAR del paquete PHYLIP 3.4 de Felsenstein y combinaciones de 4 secuencias alineadas pertenecientes a las distintas especies cuyas relaciones se deseaba probar.

La Tabla 20 recoge los resultados obtenidos con distintos cuartetos de especies. Los resultados deben interpretarse con cautela, ya que algunas de las asunciones de las que parte el método no son ciertas para el análisis basado en secuencias del mtDNA de insectos por su especial dinámica evolutiva.

No obstante, los resultados surgidos del análisis de los invariantes de Lake concuerdan con los obtenidos mediante la aplicación de otros métodos de determinación de la fiabilidad de las reconstrucciones filogenéticas. Así, la topología determinada para las especies de los subgrupos *affinis* y *pseudobscura*, donde se incluyó *D. melanogaster* como "outgroup", es la misma que se determinó mediante parsimonia refrendada por el "bootstrap" y mediante UPGMA refrendado por las varianzas de las distancias internodales.

**Tabla 20.** Resultados del análisis de los invariantes de Lake para distintos cuartetos de especies del grupo *obscura*.

Topología I:



Cuartetos de especies analizados:

sp 1	<i>me</i>	<i>me</i>	<i>me</i>	<i>me</i>	<i>ob</i>	<i>af</i>	<i>af</i>	<i>su</i>	<i>su</i>	<i>su</i>	<i>af</i>
sp 2	<i>mi</i>	<i>af</i>	<i>su</i>	<i>ob</i>	<i>ss</i>	<i>ob</i>	<i>su</i>	<i>ob</i>	<i>ss</i>	<i>ob</i>	<i>su</i>
sp 3	<i>bo</i>	<i>al</i>	<i>ma</i>	<i>ss</i>	<i>tr</i>	<i>ss</i>	<i>ob</i>	<i>ss</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>ob</i>
sp 4	<i>pe</i>	<i>az</i>	<i>gu</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>bo</i>	<i>bo</i>	<i>bo</i>	<i>bo</i>

Transversiones a idénticos nucleótidos

estado del cuarteto de caracteres

sp	1	2	3	4							
AATT	2	0	2	5	1	9	4	6	4	7	7
AACC	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
GGTT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GGCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TTAA	4	0	0	2	4	7	5	2	5	2	8
TTGG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCAA	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
CCGG	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL:	8	1	2	7	5	16	10	9	10	11	15

Transversiones a distintos nucleótidos

estado del cuarteto de caracteres

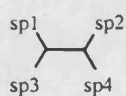
sp	1	2	3	4							
AGTT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AGCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GATT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GACC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TCAA	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
TCGG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTAA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
CTGG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AATC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AACT	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
GGTC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GGCT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TTAG	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
TTGA	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CCAG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCGA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL:	0	0	1	1	1	2	0	1	2	2	2

DIFERENCIA:	8**	1	1	6**	4	14**	10**	8**	8**	9**	13**
-------------	-----	---	---	-----	---	------	------	-----	-----	-----	------

\*\* Diferencia significativa.

Tabla 20. Continuación.

Topología II:



Cuartetos de especies analizados:

sp 1	<i>me</i>	<i>me</i>	<i>me</i>	<i>me</i>	<i>ob</i>	<i>af</i>	<i>af</i>	<i>su</i>	<i>su</i>	<i>su</i>	<i>af</i>
sp 2	<i>mi</i>	<i>af</i>	<i>su</i>	<i>ob</i>	<i>ss</i>	<i>ob</i>	<i>su</i>	<i>ob</i>	<i>ss</i>	<i>ob</i>	<i>su</i>
sp 3	<i>bo</i>	<i>al</i>	<i>ma</i>	<i>ss</i>	<i>tr</i>	<i>ss</i>	<i>ob</i>	<i>ss</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>ob</i>
sp 4	<i>pe</i>	<i>az</i>	<i>gu</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>bo</i>	<i>bo</i>	<i>bo</i>	<i>bo</i>

Transversiones a idénticos nucleótidos

estado del cuarteto de caracteres

sp	1	2	3	4							
ATAT	0	0	1	5	4	4	9	2	4	6	3
ACAC	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
GTGT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GCGC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TATA	0	0	2	6	4	5	5	7	6	8	5
TGTG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACA	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0	1
CGCG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL:	0	0	3	12	11	9	16	9	11	14	9

Transversiones a distintos nucleótidos

estado del cuarteto de caracteres

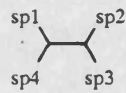
sp	1	2	3	4							
ATGT	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ACGC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GTAT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
GCAC	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
TACA	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
TGCG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CATA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
CGTG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATAC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACAT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
GTGC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GCGT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TATG	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TGTA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
CACG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CGCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL:	1	0	0	1	2	1	0	1	0	2	2

DIFERENCIA:	-1	0	3	11	9	8	16	8	11	12	7
-------------	----	---	---	----	---	---	----	---	----	----	---

\*\* Diferencia significativa.

**Tabla 20.** Continuación.

Topología III:



Cuartetos de especies analizados:

sp 1	<i>me</i>	<i>me</i>	<i>me</i>	<i>me</i>	<i>ob</i>	<i>af</i>	<i>af</i>	<i>su</i>	<i>su</i>	<i>su</i>	<i>af</i>
sp 2	<i>mi</i>	<i>af</i>	<i>su</i>	<i>ob</i>	<i>ss</i>	<i>ob</i>	<i>su</i>	<i>ob</i>	<i>ss</i>	<i>ob</i>	<i>su</i>
sp 3	<i>bo</i>	<i>al</i>	<i>ma</i>	<i>ss</i>	<i>tr</i>	<i>ss</i>	<i>ob</i>	<i>ss</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>ob</i>
sp 4	<i>pe</i>	<i>az</i>	<i>gu</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>bi</i>	<i>bo</i>	<i>bo</i>	<i>bo</i>	<i>bo</i>

Transversiones a idénticos nucleótidos

estado del cuarteto de caracteres

sp	1	2	3	4							
ATTA	0	1	3	9	2	4	8	7	4	3	5
ACCA	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
GTTG	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
GCCG	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TAAT	1	3	1	7	2	0	9	4	5	6	5
TGGT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAAC	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
CGGC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL:	1	5	4	17	4	5	17	12	10	9	10

Transversiones a distintos nucleótidos

estado del cuarteto de caracteres

sp	1	2	3	4							
ATTG	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ACCG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GTTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
GCCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TAAC	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
TGGC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAAT	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
CGGT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ATCA	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
ACTA	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
GTCG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GCTG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TAGT	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
TGAT	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
CAGC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CGAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL:	1	0	2	4	0	0	2	3	4	1	1

DIFERENCIA:	0	5 <sup>**</sup>	2	13 <sup>**</sup>	4	5 <sup>**</sup>	15 <sup>**</sup>	9 <sup>**</sup>	6 <sup>**</sup>	8 <sup>**</sup>	9 <sup>**</sup>
-------------	---	-----------------	---	------------------	---	-----------------	------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

<sup>\*\*</sup> Diferencia significativa.

En el caso de las relaciones entre el trío *D. subobscura*, *D. madeirensis* y *D. guanche*, así como de las relaciones entre distintas especies pertenecientes a los diferentes linajes del grupo *obscura*, el método de los invariantes no permite discernir entre las tres topologías posibles, tal como ocurre con los otros métodos de evaluación del nivel de confianza de las reconstrucciones filogenéticas. Sin embargo, existen diferencias entre los resultados de ambos tipos de análisis que no logran resolver la topología correcta (ver Tabla 20). Así, en el análisis de las relaciones entre el trío *subobscura-madeirensis-guanche*, en ninguna de las tres topologías la diferencia entre ambos tipos de transversiones es significativamente distinta de 0. En cambio, en el análisis de las relaciones entre representantes de los distintos linajes del grupo *obscura*, las diferencias entre los dos tipos de transversión para las tres topologías son significativamente distintas de 0.

Las relaciones entre *D. subobscura*, *D. madeirensis* y *D. guanche* no se pueden resolver porque en ninguna de las topologías el número de ambos tipos de transversiones es significativamente distinto, lo que indica que nos encontramos con una topología aparentemente en estrella. O sea, todas las transversiones han sido paralelas porque el tiempo transcurrido entre los dos sucesos de divergencia, representados por los nodos, ha sido muy corto sin que se hayan fijado transversiones informativas, únicamente transiciones (no contempladas en el método, como ya hemos señalado).

En las relaciones entre especies de distintos linajes, no podemos discernir entre topologías con el método de los invariantes de Lake debido al incumplimiento de las asunciones del método. El genoma mitocondrial de *Drosophila*, tal como hemos visto, se caracteriza por su gran riqueza en Adenina y Timina. Como consecuencia de ello, las transversiones A-T y T-A son las más frecuentes, especialmente en las ramas situadas en tiempos de divergencia mayores, tal como se podía observar en el análisis de parsimonia (Figura 30). Estas ramas son las que determinan las relaciones entre los linajes del grupo *obscura*. Al no cumplirse la asunción b del método y ser más probables las transiciones A-T y T-A, dos transversiones paralelas en dos ramas de un árbol (homoplasias) ya no darán con igual probabilidad tanto nucleótidos similares en las dos ramas como diferentes. Así, el total de transversiones paralelas en dos ramas que dan lugar a nucleótidos similares A desde T o T desde A será siempre mayor que el total de transversiones

paralelas que dan lugar a nucleótidos diferentes, y por tanto, no podremos discernir la topología correcta de entre las tres posibles.

Como se puede observar en la Tabla 20, la mayor parte de transversiones a idénticos nucleótidos que respaldan cada una de las tres posibles topologías que se pueden obtener con un cuarteto de especies del grupo *obscura*, son entre As y Ts, o están presentes. El sesgo es mayor cuando el análisis es entre especies representantes de linajes muy divergentes (entre especies de los distintos subgrupos o entre especies del subgrupo *obscura*).

Sin embargo, en el análisis de las relaciones entre las especies del subgrupo *affinis* y entre las especies del subgrupo *pseudoobscura*, en las que el método de los invariantes de Lake ha confirmado una de las topologías, ésta viene respaldada por una transversión a nucleótidos idénticos entre G y C, que por ser el tipo de transversión menos frecuente, es más probable que se trate de una transversión informativa (debida a un único suceso mutacional) que de dos transversiones en paralelo (dos sucesos mutacionales).

#### **5.5. Conversión de distancias en tiempo mediante máxima verosimilitud.**

A lo largo de todo el proceso de inferencia de las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura*, hemos observado que únicamente se pueden determinar con claridad las relaciones entre las especies de los subgrupos *affinis* y *pseudoobscura*. En el caso del trío *subobscura-madeirensis-guanche*, algunos análisis corroboran la más estrecha relación entre *madeirensis* y *subobscura* (métodos basados en distancias, o el análisis de las deleciones/inserciones), pero otros no permiten resolver la tricotomía (bootstrap, invariantes de Lake).

Cuando pretendemos resolver las relaciones entre especies de los 4 o 5 linajes que parecen formar el grupo *obscura*, cuyas divergencias son superiores a un 6 o 7%, cualquier relación puede ser válida pero ninguna de ellas significativa.

Dos explicaciones plausibles surgen. Según la primera, este hecho se explicaría si la aparición de los distintos linajes del grupo *obscura* hubiese acontecido en un intervalo corto de tiempo (radiación en estrella o arbusto) sin que se fijaran suficientes sucesos mutacionales como para poder ser detectados por los métodos de reconstrucción filogenética, entre la maraña de fenómenos evolutivos como reversión, sobreimposición, convergencia, introgresión, etc., normalmente acontecidos a lo largo de la historia evolutiva del grupo *obscura*, y que oscurecen las relaciones entre las especies. La segunda interpretación provendría del fenómeno descrito por DeSalle et al.(1987). Estos investigadores realizaron un estudio a partir de la comparación de las secuencias de una zona de 148 nucleótidos del gen ND1 mitocondrial de distintas especies de *Drosophila* (principalmente hawaianas), cuyos tiempos de divergencia aproximados eran conocidas. Al representar las divergencias nucleotídicas frente al tiempo de divergencia, observaron una tasa de sustitución rápida para tiempos de divergencia pequeños que, a medida que aumentaba el tiempo de divergencia, la tasa aparentemente disminuía.

Estos investigadores concluyeron que las sustituciones múltiples en el mtDNA de *Drosophila* oscurecen los cambios mutacionales, a una tasa mayor que la observada en mamíferos, debido a la gran preponderancia en adenina y timina en las secuencias del mtDNA de *Drosophila* (77-80%), que constriñe las probabilidades de cambios nucleotídicos. Así, aunque la tasa de sustitución nucleotídica sea alta en *Drosophila*, la tendencia al mantenimiento del alto contenido en A y T hace que el número de sitios capaces de fijar sustituciones nucleotídicas sea pequeño, y por tanto, la divergencia observada entre especies también. Tal como comentan DeSalle y colaboradores (1987): "en un momento dado, el número de sitios capaces de fijar sustituciones sinónimas es pequeño, debido a que estas sustituciones disminuirían el contenido en A-T. Cuando estas sustituciones revierten, o son compensadas, hasta alcanzar de nuevo un estado composicional aceptable, entonces, otros sitios pueden libremente fijar nuevas sustituciones. Pasado suficiente tiempo, realmente muchos de los sitios silenciosos han podido fijar mutaciones, pero el número de diferencias observables entre el estado inicial y el final será pequeño, debido al mantenimiento del alto contenido en A-T". Por tanto, a medida que el tiempo de divergencia entre dos especies es mayor, la sobreimposición de sustituciones bajo la restricción hacia un



mantenimiento del elevado contenido en A-T oscurece sus relaciones filogenéticas.

Para contrastar cual de las dos hipótesis podía explicar la imposibilidad de resolución de las relaciones entre los linajes del grupo *obscura*, decidimos utilizar el método de máxima verosimilitud desarrollado por Hasegawa y colaboradores (Hasegawa et al., 1985; Kishino y Hasegawa, 1990) que, a partir de un árbol filogenético definido, permite determinar los tiempos de divergencia entre linajes (en concreto, datar los nodos de un árbol filogenético), a la vez que contrastar la posible existencia de tasas de sustitución variables en los distintos linajes (como ejemplo de aplicación, además de los artículos reseñados, ver Elena et al., 1992).

De este modo, si la imposibilidad de resolución de la filogenia es debida a una radiación en estrella, los tiempos de divergencia estimados entre los diferentes linajes del grupo serían semejantes. En cambio, si se debe al efecto de saturación por constricciones funcionales o estructurales (riqueza en A+T), especies próximas mostrarán una tasa de sustitución aparentemente mayor que la que se observará entre especies de distintos linajes en las que se ha alcanzado la saturación.

Veamos en qué se basa el método de Hasegawa y colaboradores. El método asume que cada sitio de una secuencia nucleotídica evoluciona independientemente según un modelo markoviano, en el que un nucleótido  $x$  es reemplazado por otro nucleótido  $y$  en un intervalo de tiempo infinitesimal,  $dt$ , con una probabilidad dada por:

$$P_{xy}(dt) = \alpha \Pi_y dt \text{ si se trata de una transición.}$$

$$P_{xy}(dt) = \beta \Pi_y dt \text{ si se trata de una transversión.}$$

Siendo  $\Pi_y$  la proporción del nucleótido  $y$  en la secuencia,  $\alpha$  la tasa de transición y  $\beta$  la tasa de transversión.

Según el modelo, el número esperado de transiciones (S) y el de transversiones (V) entre dos secuencias  $i$  y  $j$  de  $r$  nucleótidos de longitud, que han divergido  $t$  unidades de tiempo con tasas de transición ( $\alpha$ ) y transversión ( $\beta$ ) constantes entre los dos linajes, vienen dados por:

(1)

$$S_{ij}(t) = 2fr \{ (\Pi_T \Pi_C + \Pi_A \Pi_G) + (\Pi_T \Pi_C \Pi_R / \Pi_Y + \Pi_A \Pi_G \Pi_Y / \Pi_R) e^{-2\beta t} - (\Pi_T \Pi_C / \Pi_Y) e^{-2t(\alpha \Pi_Y + \beta \Pi_R)} - (\Pi_A \Pi_G / \Pi_R) e^{-2t(\alpha \Pi_R + \beta \Pi_Y)} \}$$

(2)

$$V_{ij} = 2fr \Pi_Y \Pi_R \{ 1 - e^{-2\beta t} \}$$

Donde  $f$  es la probabilidad de que un sitio dado sea variable,  $\Pi_Y = \Pi_T + \Pi_C$  y  $\Pi_R = \Pi_A + \Pi_G$ .

En el caso de que se consideren modelos más complejos, con tasas de transición y transversión variables entre linajes, se pueden obtener fórmulas similares que resuelvan el número esperado de transiciones y transversiones (ver Kishino y Hasegawa, 1990).

En un árbol con raíz que relacione  $n$  secuencias hay  $n-1$  nodos, tomando el tiempo de divergencia  $t$  de uno de los nodos como referencia, el método pretende determinar los  $t_i$  tiempos de divergencia de los restantes  $n-2$  nodos y las tasas de transición ( $\alpha$ ) y transversión ( $\beta$ ) mediante máxima verosimilitud.

Para ello, trata de determinar el conjunto de parámetros  $(t_i, f, \alpha, \beta)$  que minimice las diferencias entre las sustituciones (transiciones y transversiones) observadas y las esperadas, y que expliquen las pautas de sustitución en los diferentes linajes del árbol filogenético analizado, según el modelo propuesto, mediante el método de mínimos cuadrados generalizado desarrollado por Hasegawa et al. (1985) y Kishino y Hasegawa (1990).

Este método de mínimos cuadrados generalizado utiliza el proceso iterativo del algoritmo de Newton para determinar los valores convergentes de los parámetros  $t_i, f, \alpha$  y  $\beta$ , a partir de unas estimas iniciales.

Las estimas iniciales de los valores aproximados de los tiempos de divergencia ( $t_i$ ), se consiguen a partir de la conversión de las divergencias nucleotídicas, obtenidas en una reconstrucción filogenética, en tiempo de divergencia. Para ello se utiliza el tiempo de divergencia de uno de los nodos tomado como referencia.

Un método para conseguir, por prueba y error, las estimas iniciales de las tasas  $\alpha$  y  $\beta$  consiste en representar gráficamente los valores observados de transiciones frente a los de transversiones para cada par de secuencias comparadas, y determinar los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  que hacen que los puntos de la curva de transiciones esperadas frente transversiones esperadas (obtenidos según las fórmulas 1 y 2) se ajusten lo mejor posible a los valores observados. Por último, la estima inicial de  $f$  se obtiene computando la fracción de sitios variables de las secuencias analizadas.

Para comparar las distintas topologías propuestas, o los resultados obtenidos al ensayar distintos modelos evolutivos con tasas constantes o variables mediante el método de Hasegawa y colaboradores, éstos autores proponen utilizar el criterio de Akaike (1974) para la comparación de modelos basado en la teoría de la información. El criterio de información de Akaike (AIC, Akaike information criterion) se define como:

$$\text{AIC} = -2(\log \text{ de la verosimilitud estimada}) \\ + 2(\text{inúm. de parámetros libres})$$

El modelo con menor AIC es considerado el más probable, ya que cuanto mejor es el ajuste del modelo a los datos experimentales, menor es el primer término; y cuanto menos complejo sea el modelo (menor número de parámetros requeridos), menor es el segundo término.

Como el método máximo-verosímil descrito requiere un gran tiempo de computación, no se utilizó toda la información disponible y se seleccionó una serie de especies que nos permitiera resolver la filogenia. Con las secuencias de estas especies se realizaron distintos análisis para resolver los dos problemas principales, en primer lugar, las relaciones entre linajes del grupo *obscura*, y en segundo lugar, las relaciones entre las especies del subgrupo *obscura*.

Así, para resolver las relaciones entre linajes, se seleccionaron dos especies de cada linaje principal, entre las cuales la divergencia nucleotídica fuera del mismo orden en todos los linajes. Del subgrupo *affinis* se tomaron *D. affinis* y *D. azteca* (2.3% de divergencia nucleotídica), del linaje de *D. subobscura* se tomaron *D. subobscura 1* y *D. madeirensis* (2.5%). Del linaje

*obscura*, *D. ambigua* y *D. obscura* (2.6%), y del subgrupo *pseudoobscura* se utilizaron *D. ps. bogotana* y *D. persimilis* (1.5%). Estas últimas especies se utilizaron, también, por disponer de estimas aproximadas del tiempo de divergencia entre ellas. Finalmente, como especie de referencia externa, se utilizó *D. yakuba*, en gran medida, por disponer de tiempos de divergencia entre los grupos *obscura* y *melanogaster*.

Para aplicar el método de Hasegawa y colaboradores se siguieron sus recomendaciones (ver Kishino y Hasegawa, 1990). En primer lugar, se obtuvo la topología que relaciona las especies seleccionadas mediante el método de máxima verosimilitud de Felsenstein (1981), asumiendo tasa constante (programa DNAMLK del paquete PHYLIP) y tasa variable (programa DNAML). Como la topología obtenida en cada método difería en las posiciones relativas entre el par *ambigua-obscura* y el par *ps. bogotana-persimilis*, se excluyó alternativamente del análisis cada uno de los pares (ver topologías 1 y 2 de la Figura 33).

A partir de los resultados de los análisis del DNAML y del DNAMLK, se estimaron las frecuencias nucleotídicas empíricas de las especies analizadas ( $\Pi_A$ ,  $\Pi_G$ ,  $\Pi_T$ ,  $\Pi_C$ ), la fracción de nucleótidos variables ( $f$ ), y los tiempos de divergencia aproximados ( $t_i$ ) tomando como referencia el tiempo de divergencia entre el grupo *melanogaster* (*D. yakuba*) y el grupo *obscura*, estimado en unos 35 millones de años (Ma). Es interesante señalar que el método de Newton, utilizado para la estima iterativa de los parámetros que definen el modelo de Hasegawa et al. (1985), no converge si las estimas iniciales de los parámetros no son suficientemente buenas. De hecho, el método permite encontrar óptimos locales para los parámetros, y por tanto, diferentes estimas iniciales pueden dar lugar a resultados discrepantes.

Obtener tiempos de divergencia entre especies de *Drosophila* es difícil debido a la carencia de registro fósil. Sin embargo, estas estimas se pueden aproximar valiéndose de consideraciones biogeográficas. De este modo, Throckmorton (1975) sugirió que los subgrupos *melanogaster* y *obscura* divergieron antes del Oligoceno Medio (hace 30-35 Ma). Beverley y Wilson (1984) utilizando distancias inmunológicas, calibradas mediante el escaso registro fósil díptero y datos de distribución biogeográfica, determinaron que el suceso de divergencia entre ambos grupos de *Drosophila* pudo tener lugar

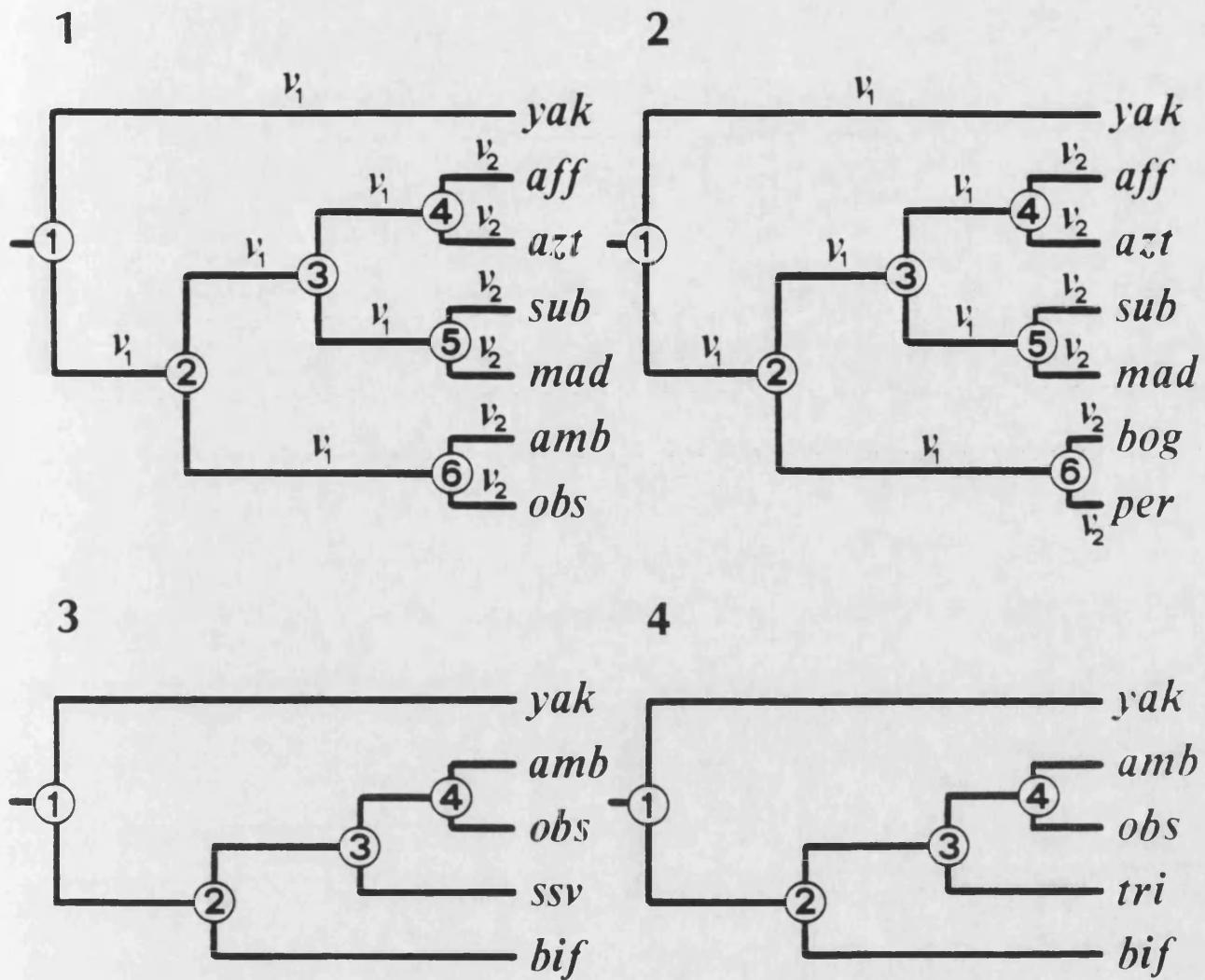


Figura 33. Topologías analizadas mediante el método máximo-verosímil de Hasegawa et al. (1985) para determinar los tiempos de divergencia de los nodos y las tasas de sustitución nucleotídica de las ramas (ver texto), cuyos resultados se muestran en la Tabla 21. En aquellas topologías, que se analizaron bajo un modelo de dos tasas de sustitución, se señala la tasa aplicada a cada una de las ramas ( $\nu_1$  y  $\nu_2$ ).

hace 46 Ma. Sharp y Li (1989) para la determinación de las tasa evolutivas del genoma de *Drosophila*, utilizan como tiempo de divergencia para el mismo suceso el valor de 40 Ma, aunque concluyen que puede ser una sobreestima en función de los tiempos de divergencia entre especies del subgrupo *melanogaster*. En otros trabajos similares, Moriyama (1987) y Moriyama y Gojobori (1992) utilizan para el mismo evento un valor de 30 Ma. Sin embargo, hay que considerar que Eastel y Oakeshott (1985) basándose en las estimas de tasas de sustitución de intrones y de posiciones silenciosas de genes codificantes de la fracción del genoma de *Drosophila* de evolución rápida, determinan que el origen del subgrupo *melanogaster* (posterior a la divergencia de los dos grupos) debió ocurrir hace unos 30 Ma.

Por tanto, la divergencia entre los grupos *melanogaster* y *obscura* debió acontecer entre 30 y 45 Ma atrás. Nosotros hemos utilizado el valor de 35 Ma (dentro del rango propuesto por Throckmorton), ya que 40 Ma es considerado por Sharp y Li (1989) como una sobreestima, y 30 Ma coincide con la aparición del subgrupo *melanogaster* según Eastel y Oakeshott (1985).

Recordemos que en nuestro caso estábamos interesados en contrastar las dos hipótesis que pueden explicar la dificultad en resolver las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura*: a) radiación en estrella de los linajes primigenios del grupo y b) saturación de la divergencia nucleotídica con el tiempo de divergencia. Por tanto cada una de las topologías fué analizada mediante el método de Hasegawa y colaboradores bajo dos posibles modelos de evolución.

El primer modelo asume tasas de sustitución (transición y transversión) constantes en todos los linajes, para determinar si los tiempos de divergencia entre los distintos linajes son similares y se trata de una radiación en estrella.

El segundo modelo asume dos tipos de tasas de sustitución en las distintas ramas del árbol según las observaciones de DeSalle et al. (1987). Para las ramas del árbol que conectan los pares de especies de cada linaje (divergencias menores del 3%) se asume una tasa aparente mayor que para las ramas que conectan especies de diferentes linajes (divergencias del 6 al 8%, próximas a la zona de saturación de la curva de divergencia nucleotídica frente tiempo de divergencia).

La Tabla 21 recoge los resultados obtenidos del análisis. Es interesante resaltar que, así como en los análisis que asumen tasa constante se consiguió convergencia en la estima iterativa de los parámetros, en ninguno de los análisis llevados a cabo según el modelo de dos tasas se alcanzó convergencia. Para la topología 1 se obtuvieron, con el modelo de 2 tasas, valores ilógicos de los parámetros (errores enormes). Para la topología 2, los valores de ambos tipos de tasas son semejantes, y a su vez son semejantes a los obtenidos para el modelo de 1 tasa.

Por otra parte, los valores de AIC son siempre mayores en el caso de dos tasas que en el de tasa constante, con lo que se rechaza el modelo de tasa aparentemente variable.

Cuando comparamos los valores de los parámetros obtenidos bajo el supuesto de tasa constante para las topologías 1 y 2 (Figura 33), que recordamos reflejan ambas los mismos sucesos, excepto la inclusión alternativamente del par *ambigua-obscura* o del par *ps. bogotana-persimilis*, observamos que son coincidentes (los rangos se solapan), tanto para las tasas de transición ( $9.54 \pm 2.26 \times 10^{-3}/\text{Ma}$  y  $11.32 \pm 2.83 \times 10^{-3} /\text{Ma}$ ), las de transversión ( $1.4 \pm 0.2 \times 10^{-3}/\text{Ma}$  y  $1.6 \pm 0.2 \times 10^{-3}/\text{Ma}$ ), como para los tiempos de divergencia de los eventos comunes (por ejemplo, entre *subobscura* y *madeirensis*,  $4.74 \pm 0.95 \text{ Ma}$  y  $4.32 \pm 0.87 \text{ Ma}$ ).

De los resultados del análisis se pueden destacar las siguientes hechos:

a) el tiempo de divergencia determinado por el método de Hasegawa y colaboradores para el par *D. ps. bogotana* y *D. persimilis* se situa en  $2.54 \pm 0.62 \text{ Ma}$ , lo que está, más o menos, en concordancia con la posible correlación entre las glaciaciones del Pleistoceno, ocurridas entre 20 mil y 2 millones de años, y la evolución de especies en poblaciones temporalmente aisladas propuesto por Dobzhansky y Powell (1975).

b) se confirma la naturaleza polifilética del subgrupo *obscura*. Según este método, el trío *subobscura-madeirensis-guanche* está más próximo a las especies del subgrupo *affinis* (tiempo de divergencia de  $13.78 \pm 2.58 \text{ Ma}$  a  $14.61 \pm 2.66 \text{ Ma}$ ), que a las otras especies del subgrupo *obscura*.

**Tabla 21.** Tiempos de divergencia y tasas evolutivas estimadas de los datos de secuencias del mtDNA de las especies del grupo *obscura* mediante el método del Hasegawa et al. (1985).

	Modelo (ver Figura 33)					
	Arbol 1		Arbol 2		Arbol 3	Arbol 4
	Tasa constante	Tasa variable	Tasa constante	Tasa variable	Tasa constante	Tasa constante
<b>Tiempos divergencia (Ma) para el nodo</b>						
1	35.00 ± 0.00	35.00 ± 0.00	35.00 ± 0.00	35.00 ± 0.00	35.00 ± 0.00	35.00 ± 0.00
2	24.63 ± 3.69	35.03 ± 12.29	25.26 ± 3.98	24.41 ± 3.96	22.94 ± 3.49	21.52 ± 3.27
3	14.61 ± 2.66	27.25 ± 16.33	13.78 ± 2.58	12.85 ± 3.02	12.04 ± 2.35	12.38 ± 2.32
4	5.89 ± 1.24	21.44 ± 20.02	5.26 ± 0.62	4.89 ± 1.99	3.90 ± 0.96	3.74 ± 0.93
5	4.74 ± 0.95	17.04 ± 18.22	4.32 ± 1.13	4.00 ± 1.49	---	---
6	4.98 ± 1.08	18.21 ± 16.44	2.54 ± 0.87	2.31 ± 0.96	---	---
<b>Tasa transición (10<sup>-3</sup>/Ma)</b>						
α <sub>1</sub>	9.54 ± 2.26	6.52 ± 2.85	11.32 ± 2.83	14.72 ± 8.10	11.78 ± 2.89	12.48 ± 3.20
α <sub>2</sub>	---	2.67 ± 2.56	---	12.69 ± 5.57	---	---
<b>Tasa transversión (x10<sup>-3</sup>/Ma)</b>						
β <sub>1</sub>	1.41 ± 0.21	1.77 ± 0.69	1.59 ± 0.23	1.63 ± 0.24	1.29 ± 0.18	1.42 ± 0.19
β <sub>2</sub>	---	0.30 ± 0.30	---	1.75 ± 0.61	---	---
<b>Tasa sustitución (x10<sup>-3</sup>/Ma)</b>						
*ν <sub>1</sub>	2.46	---	2.85	---	2.87	3.06
ν <sub>2</sub>	---	---	---	---	---	---
Convergencia	SI	NO	SI	NO	SI	SI
AIC	213.44	217.53	193.75	199.85	100.23	100.81

$$* \nu = 2(\Pi_T \Pi_C + \Pi_A \Pi_G) \alpha + \Pi_R \Pi_Y \beta$$

Πi: Frecuencias nucleotídicas R = Purinas Y = Pirimidinas.

AIC: Criterio de información de Akaike.



c) se confirma la radiación en estrella del grupo *obscura*. Así, según este método, la separación del linaje *obscura* del que conduce al subgrupo *affinis* y el trío *subobscura*-*madeirensis*-*guanche* aconteció hace  $24.36 \pm 3.69$  Ma (topología 1) y la separación del linaje que lleva al subgrupo *pseudoobscura* del que conduce al subgrupo *affinis* y el trío *subobscura*,  $25.16 \pm 3.98$  Ma (topología 2), ésto es, prácticamente de forma simultánea.

Otro de los apartados dudosos de la filogenia del grupo *obscura*, era la relación entre las especies del subgrupo *obscura*. Para resolverlo, se repitió el mismo proceso de análisis utilizando, únicamente, las especies del subgrupo *obscura* (*D. ambigua*, *D. bifasciata*, *D. obscura*, *D. subsilvestris* y *D. tristis*). El trío *D. subobscura*, *D. madeirensis*, y *D. guanche*, no fué incluido en el análisis, ya que su pertenencia al subgrupo era puesta en duda en todos los análisis filogenéticos llevados a cabo (incluidos los descritos en los párrafos anteriores).

En éste ocasión, las dos topologías alternativas obtenidas con los programas DNAML y DNAMLK diferían en la posición de *D. subsilvestris* y de *D. tristis*. De nuevo, se analizaron dos topologías alternativas (3 y 4 de la Figura 33), que diferían en la inclusión alternativa de las especies problemáticas. Para ambas topologías, únicamente se ensayó el modelo de tasa constante, cuyos resultados se muestran en la Tabla 21. De nuevo, las tasas estimadas de transición ( $11.78 \pm 2.89 \times 10^{-3}/\text{Ma}$  y  $12.48 \pm 2.32 \times 10^{-3}/\text{Ma}$ ) y transversión ( $1.29 \pm 0.18 \times 10^{-3}/\text{Ma}$  y  $1.42 \pm 0.19 \times 10^{-3}/\text{Ma}$ ) son semejantes entre sí y respecto a los valores obtenidos en el análisis de las relaciones entre linajes. Otro tanto ocurre con los tiempos de divergencia para los eventos evolutivos comunes en ambas topologías (por ejemplo, entre *D. bifasciata* y el resto de especies del subgrupo,  $22.94 \pm 3.49$  y  $21.52 \pm 3.27$ ). Pero, también para el tiempo de divergencia entre *D. ambigua* y *D. obscura*, suceso común para tres de las topologías estudiadas ( $4.98 \pm 1.08$  para la topología 1,  $3.90 \pm 0.96$  para la 3, y  $3.74 \pm 0.93$  para la 4)

El resultado más interesante, no obstante, surge de la comparación de los tiempos de divergencia obtenidos en ambas topologías alternativas (3 y 4). Así, *D. tristis* divergió del par *D. ambigua*-*D. obscura* hace  $12.38 \pm 2.32$  Ma, prácticamente a la vez que *D. subsilvestris* ( $12.04 \pm 2.35$  Ma). De nuevo nos encontramos ante una radiación en estrella.

Sin embargo, aún más interesante es el hecho de que el tiempo de divergencia de *D. bifasciata* respecto al resto de especies del subgrupo ( $22.94 \pm 3.49$  para la topología 3 y  $21.52 \pm 3.27$  para la 4) es coincidente con los tiempos de divergencia del par *ambigua-obscura* respecto al resto de especies en la topología 1 ( $24.63 \pm 3.69$  Ma) y el par *ps. bogotana-persimilis* respecto al resto de especies en la topología 2 ( $25.16 \pm 3.98$  Ma).

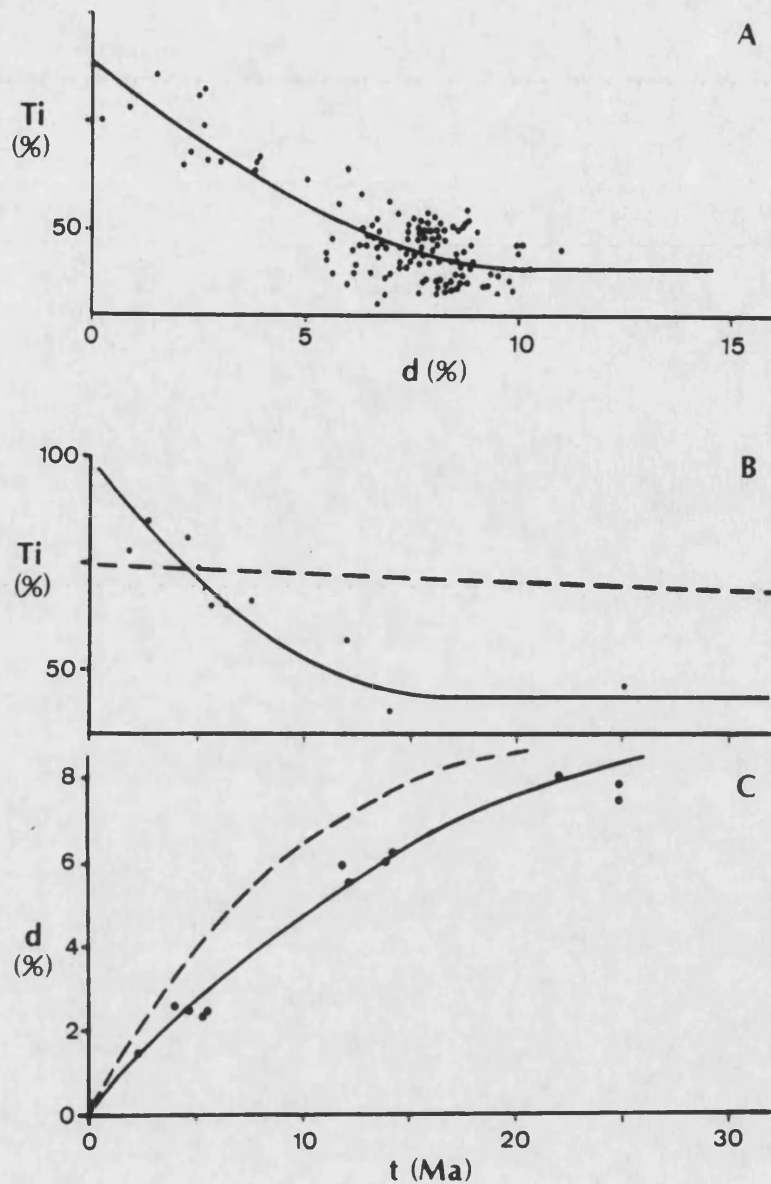
De este modo, la imagen que surge de la aplicación del método de Hasegawa y colaboradores a la resolución de las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura* (Figura 34) es que la aparición de los linajes del grupo tuvo lugar como consecuencia de una radiación en estrella hace unos 24 Ma. De esta radiación surgieron cuatro linajes conducentes a: a) el subgrupo *pseudoobscura*, b) el cuarteto *ambigua-obscura-tristis-subsilvestris*, c) *D. bifasciata* y d) los linajes del subgrupo *affinis* y del trío *subobscura-madeirensis-guanche*. Según el análisis, 10 Ma después, se escindió el cuarto linaje en el subgrupo *affinis* y el trío *subobscura-madeirensis-guanche*. Por último, la radiación *D. ambigua-D. obscura*, *D. subsilvestris* y *D. tristis* también aconteció en estrella, hace unos 12 Ma.

Otros métodos de estimas de tiempos de divergencia más clásicos consisten en considerar una tasa de sustitución constante, promedio para todas las regiones del genoma mitocondrial, y a partir de las divergencias nucleotídicas observadas entre las especies estimar los tiempos de divergencia:

$$t = d/2k$$

Siendo *t* el tiempo en Ma, *d* la divergencia nucleotídica en % y *k* la tasa de sustitución en % de divergencia por Ma.

Podemos aplicar distintas tasas, desde la estimada por Caccone et al.(1988) en 1.7% de divergencia por millón de año para las especies de *Drosophila* del subgrupo *melanogaster*, a la de 0.5% por Ma. empleada en diversos estudios (por ejemplo Latorre et al., 1986 y 1988), o bien estimar nuestras propias tasas a partir de tiempos de divergencia estimados para algún par de especies, como, en nuestro caso, entre las especies del grupo *melanogaster* y del grupo *obscura* (35 Ma), o entre *D. pseudoobscura* y *D. persimilis* (unos 2 Ma). De este modo podemos estimar los tiempos de divergencia para los sucesos evolutivos señalados en la Figura 34, y



**Figura 34.** A) Fenómeno de saturación transicional observado en el genoma mitocondrial de las especies del grupo *obscura* cuando se representa la proporción de transiciones ( $\% Ti$ ) frente a la divergencia nucleotídica para cada par de especies (corregida por el método de Kimura de dos parámetros).

B) Comparación de los patrones de sustitución nucleotídica observados en el genoma mitocondrial de las especies del grupo *obscura* (trazo continuo), y los patrones estimados a partir del modelo máximo-verosímil de tasas constantes (trazo discontinuo), cuyos parámetros (tasas de transición y transversión) fueron determinados mediante el método de Hasegawa et al. (1985). Los tiempos de divergencia corresponden a los obtenidos mediante el mismo método, a partir del tiempo prefijado de divergencia entre los grupos *obscura* y *melanogaster*.

C) Disminución del efecto de saturación de la divergencia nucleotídica frente al tiempo en el grupo *obscura* de *Drosophila* al corregir las divergencias mediante el método de Kimura de 2 parámetros (1980) y utilizar para las estimas de tiempos de divergencia el modelo máximo-verosímil determinado mediante el método de Hasegawa et al. (1985), frente al observado por DeSalle et al. (1987) en distintas especies de *Drosophila*.

compararlos con los determinados mediante el método de Hasegawa et al. (1985), tal como se muestra en la Tabla 22. Tal como se puede observar en dicha Tabla, únicamente las estimas máximo-verosímiles concuerdan con los dos tiempos de divergencia predeterminados.

De todo lo anteriormente expuesto, parece deducirse que el método de Hasegawa y colaboradores permite corregir los efectos de la saturación transicional al considerar independientemente en las estimas las transiciones y las transversiones con dinámicas distintas.

Sin embargo, cuando representamos el tiempo de divergencia estimado por máxima verosimilitud frente a la divergencia nucleotídica y frente al porcentaje de transiciones respecto al total de sustituciones (Figura 35), y comparamos ambas curvas con las observadas por DeSalle et al. (1987) para especies de *Drosophila*, cuyos tiempos de divergencia habían sido determinados mediante registro fósil, distribución biogeográfica, etc., observamos que, aunque el método corrige en parte el efecto de saturación, no permite explicar totalmente la dinámica evolutiva del genoma mitocondrial.

Tampoco podemos descartar que las estimas queden desvirtuadas por tasas variables en los distintos linajes, ya que no se ha ensayado dicha posibilidad mediante el método de Hasegawa et al., en parte por el largo tiempo de computación requerido para ensayar distintas posibilidades de tasas variables en los distintos linajes, aunque no se descarta su futura realización. Una prueba a favor, y por tanto una hipótesis a probar por el método de Hasegawa, sería el resultado del análisis de estacionaridad de las secuencias del DNA mitocondrial de las especies del grupo *obscura*, mediante el método de Lanave et al. (1984, ver también Saccone et al., 1990).

Estos autores desarrollaron un modelo estocástico de evolución molecular, modelo estacionario de Markov, según el cuál, en una secuencia y en un momento de tiempo determinado, la sustitución de un nucleótido es producto de un proceso estocástico cuyas propiedades dependen de la posición particular que el nucleótido ocupa en la secuencia. Es decir, la probabilidad de una mutación y su subsecuente fijación de ese nucleótido únicamente depende de las condiciones ambientales y de las restricciones

**Tabla 22.** Comparación de los tiempos de divergencia, estimados a partir de las divergencias nucleotídicas (Tabla 18) mediante la asunción de distintas tasas constantes, con las estimas máximo-verosímilis obtenidas por el método Hasegawa et al. (1985), ver Tabla 21, para los sucesos acontecidos a lo largo de la historia evolutiva del grupo oscura, señalados en la Figura 34.

Suceso evolutivo	Tiempos de divergencia (Millones de años, Ma)				
	Método de Hasegawa (1985)	Tasa <sup>1</sup> 1.7% divergencia nucleotídica/Ma	Tasa <sup>2</sup> 0.5% divergencia/Ma	Tasa constante determinada a partir del suceso A	Tasa constante determinada a partir del suceso M
A	35.0 <sup>3</sup>	2.7	9.3	35.0 <sup>3</sup>	12.8
B	25-30 <sup>4</sup>	2.1	3.7	27.4	10.0
C	21.5-25.2	2.3	7.8	27.6-31.4	10.0-11.5
D	13.8-14.6	1.7	5.9	22.4	8.2
E	5.3-5.9	0.7	2.2	8.3	3.0
F	(1.8)*	0.3	0.9	3.5	1.3
G	(6.4)	1.0	3.3	12.3	4.5
H	4.3-3.7	0.7	2.5	9.4	3.4
I	(0.3)	0.06	0.2	0.8	0.3
J	12.0-12.4	1.7-1.8	5.6-6.4	21.0-24.1	7.7-8.8
K	3.7-5.0	0.8	2.6	10.0	3.6
L	(7.5)	1.1	3.8	14.5	5.3
M	2.5	0.4	1.5	5.5	2.0 <sup>5</sup>

\* Entre paréntesis se señalan las estimas obtenidas interpolando a partir de la relación entre tiempos y las divergencias nucleotídicas (Tabla 18).

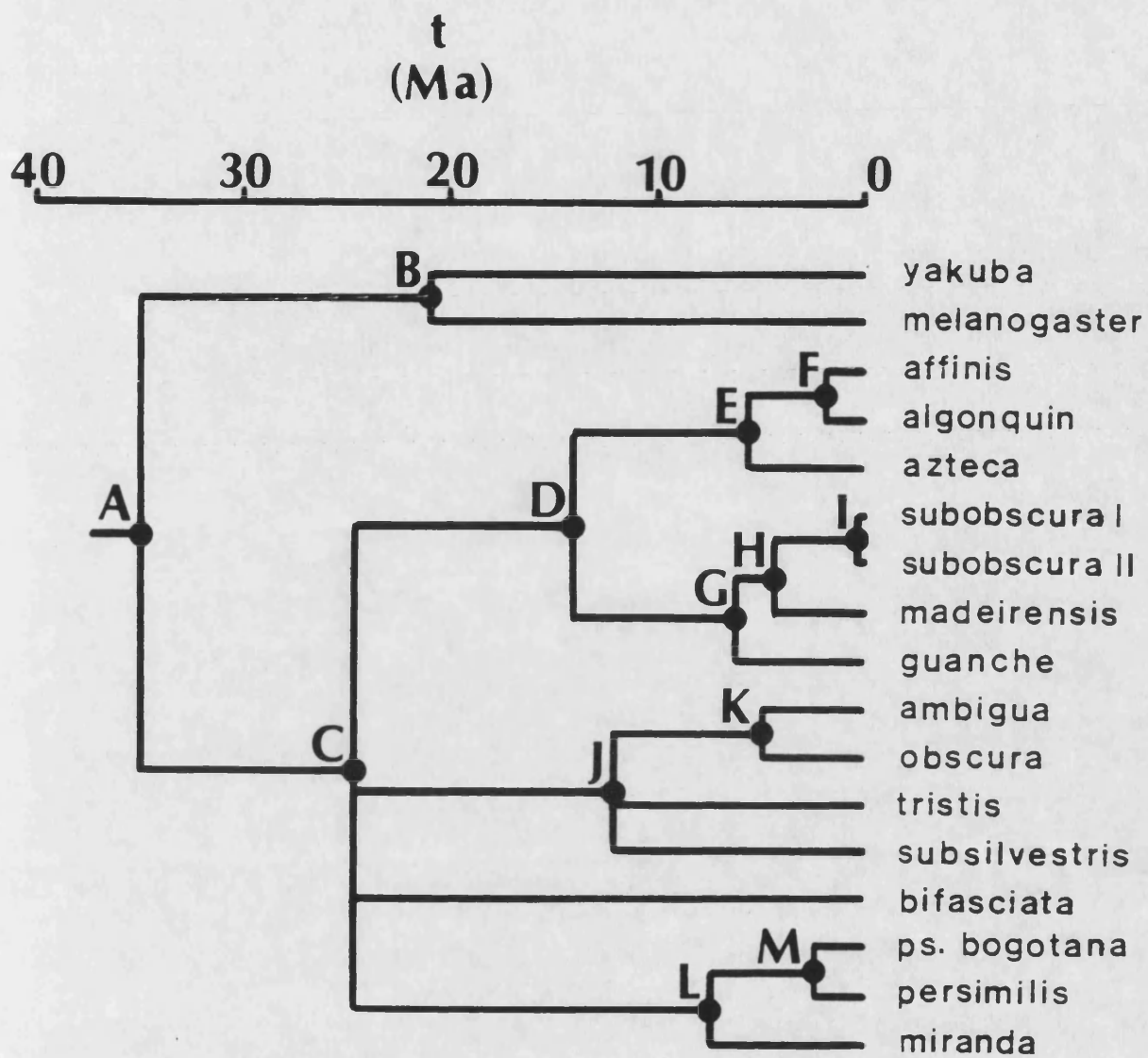
<sup>1</sup> Tomado de Caccone et al. (1988).

<sup>2</sup> Tomado de Latorre et al. (1988).

<sup>3</sup> Según un consenso entre las estimas de Throckmorton (1975), Beverley y Wilson (1984), Sharp y Li (1989) y Moriyama y Gojobori (1992).

<sup>4</sup> Según Easteal y Oakshott (1985).

<sup>5</sup> Según Dobzhansky y Powell (1975).



**Figura 35.** Arbol filogenético construido a partir de los tiempos de divergencia obtenidos mediante el método de Hasegawa et al. (1985) bajo el modelo máximo-verosímil de tasa constante. Los distintos sucesos evolutivos de divergencia de linajes (nodos del árbol) se señalan con una letra y se corresponden a los tiempos de divergencia de la Tabla 22, donde se comparan las estimas obtenidas por este método con las que se obtienen a partir de las divergencias nucleotídicas asumiendo distintas tasas de divergencia constantes o deducidas a partir de tiempos de divergencia prefijados.

funcionales y estructurales que prevalecen en un determinado instante de tiempo. Según esto, un proceso evolutivo sigue una tasa constante (reloj molecular) cuando la matriz de tasas, que describe la probabilidad de que un nucleótido  $j$  sea sustituido por un nucleótido  $i$  ( $i, j = A, G, T, C$ ), dependa sólo del sitio y no del linaje filogenético o del tiempo, y las frecuencias nucleotídicas en posiciones equivalentes (por ejemplo, las posiciones del codón) son aproximadamente constantes en las especies analizadas y en sus ancestros (estado de estacionaridad). La pérdida de la constancia de las tasas puede deberse a una pérdida de la estacionaridad por modificación de la composición nucleotídica ("base drift", ver Preparata y Saccone, 1987).

Con el fin de determinar la condición de estacionaridad entre dos secuencias, cuya pérdida implica la variación en la tasa de divergencia, Saccone et al. (1990) proponen un método de computación, que asumiendo una distribución multinomial, permite obtener una distribución de Ji cuadrado con un grado de libertad:

$$J_i^2(S1, S2) = 1/3 \sum \{ [q_i(S1) - q_i]^2 / [\alpha q_i(S1)]^2 + [q_i(S2) - q_i]^2 / [\Delta q_i(S2)]^2 \}$$

$$i = A, T, G, C$$

donde, S1 y S2 son las secuencias analizadas,  $q_i$  es la frecuencia del nucleótido  $i$ ,  $q_i = [q_i(S1) - q_i(S2)]/2$ ,  $\Delta q_i = [q_i(1 - q_i)/L]^{1/2}$ , y L es la longitud de la secuencia.

Se satisface la condición de estacionaridad entre las secuencias S1 y S2 si la  $J_i^2 \leq 1.5$

Los resultados del análisis de estacionaridad para las secuencias del DNA mitocondrial de las especies del grupo *obscura*, se muestra en la Tabla 23. En ella se puede observar que si bien para las primera y segunda posiciones del codón y las regiones codificantes para RNAs se cumple la estacionaridad para todos los pares de secuencias analizados, en el caso de la tercera posición del codón, que registra, prácticamente, toda la variabilidad, se observan cuatro grupos de especies:

a) el formado por las especies del subgrupo *affinis*, del linaje *subobscura-madeirensis-guanche* y *D. miranda*, que están en estacionaridad entre sí.

**Tabla 23.** Análisis de estacionaridad de las secuencias nucleotídicas del DNA mitocondrial de las especies del grupo *obscura*. Sobre la diagonal, valores de la Ji cuadrado para determinar la estacionaridad (ver texto) para las 3ª bases de los codones secuenciados. Bajo la diagonal, el mismo test para las 1ª y 2ª bases de los codones secuenciados y las secuencias de los genes 16S rRNA, Leu-tRNA y Ser-tRNA. Se cumple la estacionaridad para valores iguales o menores a 1.5. En negrilla se señalan los valores superiores a 1.5, especies que no se encuentran en estacionaridad.

	AFF	ALG	AZT	SU1	SU2	MAD	GUA	AMB	OBS	TRI	SSV	BIF	MIR	BOG	PER
<i>affinis</i>	--	0.179	0.459	0.274	0.592	0.522	0.592	3.483	6.257	3.815	1.099	3.581	0.129	2.233	0.911
<i>algonquin</i>	0.014	--	0.233	0.234	0.278	0.893	1.100	4.922	8.301	5.213	2.037	3.971	0.490	3.555	1.803
<i>azteca</i>	0.005	0.031	--	0.393	0.371	1.183	1.000	6.545	11.009	7.430	3.047	5.858	0.841	4.960	2.676
<i>subobscura 1</i>	0.049	0.037	0.050	--	0.093	0.298	0.537	3.763	7.015	4.429	1.596	2.733	0.269	2.879	1.376
<i>subobscura 2</i>	0.049	0.037	0.050	0.000	--	0.686	1.022	5.208	9.173	5.957	2.611	3.146	0.708	4.281	2.335
<i>madeirensis</i>	0.046	0.030	0.049	0.002	0.002	--	0.224	1.950	4.405	2.738	0.712	1.816	0.163	1.450	0.568
<i>guanche</i>	0.099	0.066	0.106	0.011	0.011	0.013	--	2.754	5.694	3.906	1.120	3.458	0.305	2.011	0.889
<i>ambigua</i>	0.038	0.035	0.046	0.088	0.088	0.067	0.134	--	0.473	0.351	0.684	1.236	2.318	0.227	0.825
<i>obscura</i>	0.137	0.216	0.112	0.286	0.286	0.271	0.403	0.125	--	0.334	1.878	2.311	4.724	0.894	2.193
<i>tristis</i>	0.046	0.109	0.024	0.129	0.129	0.133	0.215	0.103	0.059	--	0.834	1.412	2.794	0.328	1.066
<i>subsilvestris</i>	0.038	0.024	0.054	0.082	0.082	0.062	0.121	0.004	0.166	0.128	--	1.619	0.593	0.181	0.014
<i>bifasciata</i>	0.021	0.014	0.029	0.044	0.044	0.030	0.079	0.008	0.159	0.095	0.008	--	2.514	1.575	1.764
<i>miranda</i>	0.119	0.122	0.099	0.036	0.036	0.037	0.049	0.130	0.289	0.159	0.143	0.090	--	1.438	0.448
<i>ps. bogotana</i>	0.065	0.065	0.055	0.010	0.010	0.011	0.028	0.086	0.249	0.118	0.093	0.049	0.009	--	0.275
<i>persimilis</i>	0.043	0.064	0.027	0.028	0.028	0.027	0.066	0.068	0.161	0.061	0.082	0.041	0.024	0.011	--



b) el formado por el trío *ambigua-obscura-tristis*, y *D. ps. bogotana* que también está en estacionaridad entre sí, aunque la última también con *D. persimilis*, y con *D. madeirensis* y *D. miranda* en el límite.

c) el de *D. bifasciata*, que prácticamente no está en estacionaridad con ninguna especie, y por último.

d) el heterogéneo grupo de especies que presentan patrones de estacionaridad erráticos. *D. persimilis* está en estacionaridad con todas las especies de su subgrupo y con casi todas las especies de los restantes subgrupos. Algo semejante ocurre con *D. subsilvestris*.

Ello indica que los distintos linajes pueden presentar dinámicas de evolución distintas y variación de las tasas de sustitución por variación de los patrones de composición nucleotídica ("base drift").

## **Discusión**

La primera aproximación planteada para la resolución de las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura* fue el análisis filogenético basado en los mapas de restricción del mtDNA de las especies del grupo (Barrio et al., 1992a). Las incertidumbres que surgieron en los análisis filogenéticos a partir de datos de restricción los tratamos de resolver mediante la secuenciación de algunos fragmentos del mtDNA. Este paso se hizo no sólo por el recurso a una técnica más fina, sino también por el aumento cuantitativamente importante de la cantidad de genoma muestreado. La información obtenida no solamente se ha usado para la resolución de los problemas filogenéticos relacionados con el grupo *obscura*, aunque es el objetivo principal del trabajo, sino también para profundizar en la dinámica evolutiva del genoma mitocondrial.

Además, las secuencias obtenidas nos han permitido realizar estudios de estructura y/o función de distintos genes del genoma mitocondrial, lo que nos ha llevado a confirmar propuestas realizadas, proponer nuevas e incluso rebatir algunas. Todo ello queda recogido en el apartado 3 de Resultados y no hemos considerado necesario una mayor discusión de los mismos.

## **1. PATRONES Y PROCESOS EN LA EVOLUCION DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE *Drosophila*.**

Veamos, en primer lugar, como puede afectar el alto contenido en Adenina y Timina del genoma mitocondrial de insectos al patrón de sustitución nucleotídica.

Brown et al. (1982) observaron, al comparar las secuencias de una región del mtDNA de distintos primates, entre ellos el hombre, que las transiciones eran más frecuentes que las transversiones (9:1), pero cuando comparaba con secuencias de otros mamíferos, la relación pasaba a ser 1:1. Este mismo fenómeno fue observado, por primera vez, en *Drosophila* por Satta et al. (1987) al analizar las secuencias de una pequeña región del genoma mitocondrial de especies del subgrupo *melanogaster*. Sin embargo, fueron DeSalle et al. (1987) quienes, al disponer de secuencias de especies de *Drosophila* cuyos tiempos de divergencia aproximados eran conocidos, determinaron el patrón de sustitución del genoma mitocondrial de

*Drosophila*. Así, determinaron que la relación entre transiciones y transversiones en especies próximas era de 16:1 (94% del total de sustituciones eran transiciones) y pasaba a aproximadamente a 1:1 (45%) cuando el tiempo de divergencia aumentaba (más de 50 Ma, que equivalen, en su estudio, a un 10% de divergencia nucleotídica). Esto implica que la saturación transicional se alcanzaba mucho más rápidamente que en mamíferos.

En las especies del grupo *obscura* se observa un patrón de sustituciones semejante (Tablas 16 y 18, Figura 35). Así, entre especies próximas, como el par *D. ps. bogotana* y *D. persimilis*, cuya divergencia nucleotídica es de un 1.45%, que hemos estimado corresponde a unos 2.5 Ma de tiempo de divergencia según el método de Hasegawa et al. (1985) o el par *D. affinis* y *D. algonquin* (0.93% y unos 2 Ma) o *D. madeirensis* y *D. subobscura* (2.5% y 4.5 Ma), las transiciones suponen del 78 al 85%, y van disminuyendo entre especies cada vez más alejadas hasta alcanzar el 40-45% a partir del 5.5 o 6% de divergencia nucleotídica.

Tanto Holmquist (1983) como Aquadro et al. (1984), simularon la dinámica del proceso de sustitución y demostraron que la disminución de la proporción de transiciones observada a medida que la divergencia se incrementa es consecuencia del enmascaramiento de las transiciones por transiciones y transversiones superpuestas. Aquadro et al. (1984) señalan que el efecto es mayor debido a que no todo el genoma mitocondrial debe evolucionar con una tasa de sustitución tan rápida, sino que una gran parte debe estar bajo fuertes restricciones selectivas (funcionales o estructurales).

DeSalle et al. (1987) señalan que, en el caso del genoma mitocondrial de *Drosophila*, el hecho de que la saturación transicional sea más rápida (tal como ocurre también con la divergencia nucleotídica respecto al tiempo), indica algún tipo de restricción selectiva mayor que en mamíferos. Dada la particular composición del genoma mitocondrial, elevadamente rico en A+T (77-80%), especialmente en las posiciones silenciosas del genoma (94%), proponen que deba existir algún tipo de restricción funcional, tendente a mantener un estado composicional de elevado contenido en A+T (como ya propusieron Wolstenholme y Clary, 1985), que impide que el mtDNA de dos especies, aunque evolucione tan rápido como en mamíferos, llegue a ser muy diferente al cabo del tiempo.

Recientemente, Liu y Beckenbach (1992) han analizado secuencias parciales del gen COII mitocondrial en especies de insectos representantes de 10 órdenes distintos, que divergieron hace 350 a 280 Ma. Las divergencias nucleotídicas entre las secuencias (que también son extremadamente ricas en A+T, 72.3% de promedio, 86.4% en terceras bases) de estas especies van desde el 25 al 55%, con lo que es de suponer que la saturación transicional ha debido alcanzar su máximo (mínima proporción de transiciones). La proporción de transiciones se satura en un 36% para todo el rango de divergencias existente entre estos insectos. Sin embargo, la proporción de transiciones mínima observada es mayor que la que cabría esperar (28.6%) en función de la composición del genoma por simple acumulación al azar de sustituciones superpuestas que enmascaren las transiciones más frecuentes, según Holmquist (1983). Liu y Beckenbach sugieren que en esos niveles de divergencia también las transversiones han alcanzado la saturación, y que, aunque en posiciones silenciosas se acumulan las transversiones, mayoritariamente A-T y T-A que mantienen el alto contenido en A+T, en posiciones no silenciosas (primera y segunda bases) debe haber una restricción funcional que impide que se acumulen más transversiones que transiciones, debido a que los reemplazamientos de aminoácidos generados por transición son menos drásticos que los generados por transversión, lo que hace que la saturación transicional se alcance antes.

Todos los resultados indican que en el mtDNA de insectos hay algún tipo de restricción funcional que mantiene un alto contenido en A+T. Sin embargo, Nigro et al. (1991), a partir del análisis de secuencias de una región del genoma mitocondrial de especies de *Drosophila* de los subgrupos oriental y *melanogaster*, observan una disminución del contenido en A+T (del 2%) en el genoma mitocondrial de estas especies, según el análisis de las sustituciones acontecidas según la inferencia filogenética que obtienen basada en parsimonia. En nuestro caso no estamos de acuerdo con las interpretaciones de estos autores, ya que una variación del 2% en un contenido del 77-80% de A+T puede no ser significativa teniendo en cuenta que las detectan en las ramas conducentes a las especies analizadas, o que relacionan especies próximas.

Si consideramos que a tiempos de divergencia recientes las transiciones son mucho más frecuentes que las transversiones, al comparar

las secuencias entre especies próximas se observarán gran número de transiciones que, en genomas tan ricos en A+T, serán mayoritariamente T a C y A a G, que se contabilizan en las ramas distales que conducen a las especies o en las ramas internodales que relacionan especies próximas en el árbol obtenido por parsimonia. Y cuando comparamos especies más alejadas, las restricciones a un mantenimiento del alto contenido en A+T y el enmascaramiento de las transiciones por transversiones y transiciones superpuestas llevan a que se observe un mayor número de transversiones A-T y T-A, que se contabilizan en las ramas internodales del árbol parsimónico. Por tanto, el efecto aparente es una disminución del contenido en A+T, cuando en realidad ese 2% (o más) de variación del contenido en A+T puede ser el tolerado por el estado composicional óptimo del genoma mitocondrial de *Drosophila* durante el proceso de mutación y fijación de mutaciones.

Otra de las controversias surgidas del análisis de la evolución del genoma mitocondrial de *Drosophila* hace referencia a la relación entre la tasa de evolución del genoma mitocondrial y la del genoma nuclear.

Brown et al. (1982) señalaron que, en mamíferos, la tasa de sustitución mitocondrial era cinco veces mayor que la nuclear. Sin embargo, diversos autores (Powell et al., 1986; Solignac et al., 1986a; Caccone et al., 1988) señalaron que en insectos ambas tasas eran del mismo orden. Estas conclusiones eran puestas en duda por DeSalle et al. (1987), quienes sugirieron que, debido a la rápida saturación por superposición de sustituciones, a causa de las restricciones tendentes a un mantenimiento del alto contenido en A+T del genoma mitocondrial de *Drosophila*, las estimas de las tasas basadas en la comparación de secuencias del mtDNA de *D. yakuba* y *D. melanogaster* podían ser erróneas al ser especies demasiado divergentes.

Sin embargo, Sharp y Li (1989) al relacionar las divergencias nucleotídicas nucleares y mitocondriales obtenidas a partir de datos de hibridación DNA-DNA de Caccone et al. (1988) para especies del subgrupo *melanogaster*, observan una relación lineal con una pendiente de aproximadamente 1, sin que se observe saturación alguna del genoma mitocondrial a medida que aumenta la divergencia, incluso para especies externas al subgrupo *melanogaster*. Estos resultados parecían respaldar la

hipótesis de idéntica tasa en ambos sistemas genéticos propuesta por Powell et al. (1986) y Solignac et al. (1986a).

En nuestro caso, al no disponer de estimas precisas de tiempos de divergencia entre las especies del grupo *obscura*, se debe recurrir a aproximaciones para determinar las tasas de evolución. Estas se han estimado a partir de las divergencias nucleotídicas sinónimas (Tablas 11, 13 y 15) por considerar que en estas posiciones son menores las restricciones funcionales y, por tanto, cualquier mutación tiene gran posibilidad de fijarse. Los puntos obtenidos a partir de las estimas máximo verosímiles por el método de Hasegawa (Tabla 21), fueron ajustados a una recta por regresión lineal con la finalidad de obtener la tasa de mutación a partir de las pendiente.

Los valores obtenidos fueron  $7.6 \times 10^{-9}$  divergencia nucleotídica sinónima por sitio y por año para la región del gen citocromo b,  $7.4 \times 10^{-9}$  para la región del gen ND1 y  $10.1 \times 10^{-9}$  para la región del gen ND5. Un análisis de la covarianza nos permitió determinar que las tasas obtenidas para cada región no son significativamente diferentes. Según estas estimas la tasa del mitocondrial sería igual o la mitad que las estimadas por Sharp y Li (1987) para genes nucleares de *Drosophila* de evolución lenta y rápida respectivamente. Por tanto no coincide con la relación obtenida por estos autores que estimaron la tasa del mitocondrial como el doble o igual que la de los genes nucleares de evolución lenta y rápida respectivamente.

## 2. FILOGENIA MITOCONDRIAL DEL GRUPO *obscura* DE *Drosophila*.

Como ya se ha indicado el presente trabajo se planteó con la finalidad de resolver las esquivas relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura*, que, como hemos visto en la Introducción, tras distintas aproximaciones basadas en el polimorfismo enzimático (Lakovaara et al., 1972, 1976; Marinkovic et al., 1977; Lakovaara y Keränen, 1980; Pinsker y Buruga, 1982; Cabrera et al., 1983; Loukas et al., 1984; Cariou et al, 1988), en el polimorfismo cromosómico (Krimbas y Loukas, 1984), en la hibridación DNA-DNA (Goddard et al., 1990), y en el análisis de restricción del mtDNA (Hale y Beckenbach, 1985; Latorre et al., 1988; González et al., 1990) seguía presentando lagunas respecto a la posición de algunas especies, la relación

entre subgrupos, y sobre el carácter polifilético o monofilético del subgrupo *obscura*.

En el intento de reconstrucción de la filogenia del grupo *obscura* basado en el análisis de los mapas de restricción del mtDNA, nos encontramos con las dificultades en la resolución de los nodos más divergentes que relacionan los diferentes linajes, e incluso, especies claramente relacionadas. En el análisis, se confirma el carácter monofilético de los subgrupo *pseudoobscura* y *affinis*, formado por especies menos numerosas y divergentes que en el caso del subgrupo *obscura*, el cuál se muestra como un subgrupo muy heterogéneo, formado por, al menos, tres linajes (*bifasciata*, *subobscura-guanche* y *obscura-ambigua*). Finalmente, la divergencia entre los linajes del subgrupo *obscura* es tan grande como la existente entre ellos y los subgrupos *pseudoobscura* y *affinis*, o entre éstos dos subgrupos, lo que indica el carácter polifilético del subgrupo *obscura*.

La heterogeneidad y el carácter polifilético del subgrupo *obscura* ya fue destacado en trabajos previos (Marinkovic et al, 1978; Cabrera et al., 1983; Latorre et al., 1988; Cariou et al., 1988; González et al., 1990; Goddard et al., 1990). Sin embargo, los errores asociados a las estimas de distancias genéticas basadas en el análisis del polimorfismo enzimático (Cabrera et al., 1983; Cariou et al., 1988) o del polimorfismo de restricción del mtDNA (González et al., 1990), o el reducido número de especies de algunos de los distintos linajes del subgrupo *obscura* analizado (Marinkovic et al., 1978; Cabrera et al., 1983; Goddard et al., 1990; Latorre et al., 1988), o la ausencia de representantes de alguno de los subgrupos principales (Marinkovic et al., 1978; Cabrera et al., 1983; Cariou et al., 1988; González et al., 1990) dificultan, también, la interpretación de las relaciones entre los distintos linajes y subgrupos.

En cambio, otros trabajos exhaustivos, en los que se analizan especies del grupo *obscura* mediante polimorfismo enzimático, como el de Lakovaara et al. (1976) en el que se analizan hasta 22 taxones, o los de Pinsker y Buruga (1982) y Loukas et al. (1984), parecen señalar el carácter monofilético del subgrupo *obscura*. No obstante, creemos que las distancias genéticas y los errores asociados a sus estimas permiten soluciones alternativas, concordantes con la hipótesis de la polifilia del subgrupo *obscura*.



De todas las aproximaciones a la resolución de las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura*, únicamente cuatro se basan en el polimorfismo de restricción del genoma mitocondrial. En el primero de ellos, de Hale y Beckenbach (1985), únicamente se analizaban las relaciones entre las tres especies más importantes del subgrupo *pseudoobscura* (*D. pseudoobscura*, *D. persimilis* y *D. miranda*), tanto a nivel intra- como interespecífico. Los resultados son concordantes con los del presente estudio, se muestra la mayor relación existente entre *D. pseudoobscura* y *D. persimilis*, que con *D. miranda*.

El primer estudio filogenético del grupo *obscura*, basado en la variabilidad del genoma mitocondrial, donde se analizaron representantes de todos los subgrupos fue el de Latorre et al. (1988). Aunque las conclusiones generales son las mismas que en el presente trabajo (la gran heterogeneidad del subgrupo *obscura*, tan divergente como divergentes son los representantes de los tres subgrupos), la relación obtenida entre las tres especies representantes del subgrupo *obscura* es discrepante con la de los otros estudios, incluido el presente.

Los dos trabajos filogenéticos basados en el polimorfismo de restricción del mtDNA más completos son el de González et al. (1990) y el presente (recogido en Barrio et al., 1992a). El primero se centra, en mayor medida, en el análisis del subgrupo *obscura*, más ampliamente representado que en el segundo. Sin embargo, el segundo es más completo en el análisis de los subgrupos *affinis* y *pseudoobscura*. Podemos considerar los dos trabajos como complementarios.

Ambos trabajos señalan el carácter polifilético del subgrupo *obscura*, formado por distintos linajes. La heterogeneidad de este subgrupo es más destacable cuando se compara con los resultados de los otros dos subgrupos, monofiléticos y formados por especies menos divergentes. No obstante, tanto nuestro análisis, como el llevado a cabo por González et al. (1990), adolecen del problema de la falta de resolución de las relaciones entre especies divergentes. En su caso, para determinar las relaciones entre los linajes del subgrupo *obscura*, y en el nuestro, además, para determinar las relaciones entre subgrupos. La diferencia más importante entre los dos trabajos estriba en la interpretación dada para explicar este hecho.

González et al. (1990) proponen una explicación metodológica basada en el tipo de enzimas de restricción utilizado. Así, señalan que, aunque en el genoma mitocondrial de animales superiores se observa un efecto de saturación sustitucional a partir de un 15% de divergencia nucleotídica por su elevada tasa de sustitución nucleotídica (Avice, 1986; Moritz et al., 1987), en el grupo *obscura*, según sus resultados, la saturación sustitucional se debe alcanzar a partir del 10-14 %. La diferencia entre el 10-14% observado en el grupo *obscura*, y el 15% estimado en otros genomas mitocondriales de animales superiores, la explican por el tipo de restrictasas utilizadas (principalmente enzimas que reconocen secuencias de 6-pb). Según estos investigadores, en la fase inicial de divergencia rápida, cada pérdida o ganancia de un sitio de restricción es debida a una única sustitución nucleotídica, pero, a medida que aumenta el tiempo de divergencia, se pueden acumular más de una sustitución en la secuencia del sitio de restricción que no quedan reflejadas en el análisis. Puesto que en los sitios de restricción de 6 pb se pueden acumular más sustituciones que en los de 4 pb, el número real de sustituciones que no se detecta es mayor en los sitios de 6 pb que en los de 4 pb. Si en los análisis de restricción se utilizan principalmente enzimas de 6 pb, se obtendrán infraestimaciones de las divergencias nucleotídicas. Ante ello, proponen la secuenciación como única solución para determinar la divergencia nucleotídica real.

En cambio, nosotros interpretamos que la saturación sustitucional más rápida es específica del genoma mitocondrial de *Drosophila* y no de la metodología empleada, aunque, como veremos, pueda tener mayor influencia sobre el poder discriminatorio del análisis de restricción para la resolución de filogenias. Nosotros, proponemos que la causa de la saturación puede ser la tendencia al mantenimiento del alto contenido en Adenina (A) y Timina (T) observado en el genoma mitocondrial de *Drosophila* (Wolstenholme y Clary, 1985) que puede imponer algún tipo de restricción en el tipo de sustituciones, tal y como propusieron DeSalle et al. (1987). Como ya hemos visto en apartados anteriores, estos investigadores observaron, al representar la divergencia nucleotídica entre secuencias de pequeñas regiones del mtDNA de distintas especies de *Drosophila* frente a sus tiempos de divergencia, un claro efecto de saturación a partir de valores de un 8% de divergencia nucleotídica, mucho antes que la observada para otros genomas mitocondriales. Estos autores señalaron que debía existir

algún tipo de restricción sobre las posibles sustituciones nucleotídicas debido al mantenimiento del alto contenido en A y T. En nuestro caso, proponemos que el efecto de saturación debido al mantenimiento de un alto contenido en Adenina y Timina, puede tener una gran incidencia sobre las reconstrucciones filogenéticas basadas en el análisis de restricción.

En el análisis de restricción se utilizan enzimas que reconocen dianas con, al menos, una C y una G para no obtener un excesivo número de sitios de restricción en un genoma tan rico en A+T (77-80%, ver De Bruijn, 1983; Clary y Wolstenholme, 1985a; Garesse, 1988) que imposibilitara el análisis ulterior. Estas enzimas reconocen sitios de restricción en el genoma mitocondrial de *Drosophila*, que corresponden a pequeñas zonas de 4 a 6 pb, que pueden estar localizadas en secuencias no codificantes, secuencias que codifican rRNAs o tRNAs, o secuencias que codifican proteínas.

Las regiones no codificantes presentan un altísimo contenido en A+T al no existir ningún tipo de restricción funcional, como por ejemplo la región control o A+T, donde se inicia la replicación y la transcripción del mtDNA, que alcanza el 92.8% de A y T. En estas regiones son muy pocas o ninguna las dianas localizadas para gran número de restrictasas (Monforte et al. 1992). A su vez, los genes que codifican RNAs mitocondriales son extremadamente conservados. Así, en los análisis de restricción del mtDNA de un gran número de especies de *Drosophila*, se observa que la mayoría de los sitios localizados en los genes ribosómicos son universales (Solignac et al., 1986a; DeSalle y Giddings, 1986; González et al., 1990; Barrio et al., 1992b; y el presente trabajo recogido en Barrio et al., 1992a).

Por tanto, la mayor parte de los sitios de restricción polimórficos se localizan en las regiones codificantes de proteínas. De este modo, una diana de restricción de 4 pb ó 6 pb, en esa región, contendrá al menos una o dos terceras posiciones de codón. El 70-86% de las sustituciones nucleotídicas son sinónimas en *Drosophila*, es decir no implican reemplazamiento de aminoácido (el 86% al comparar *D. yakuba* y *D. melanogaster* según Wolstenholme y Clary, 1985; o entre el 70 y el 85% en el presente trabajo). Estas sustituciones silenciosas se dan en la tercera base degenerada de los codones codificantes del genoma mitocondrial o en la primera base de los codones CTA, CTG, TTA y TTG que codifican para la Leucina.

Una sustitución nucleotídica en esas terceras posiciones variables, aún siendo silenciosa, implicará la pérdida del sitio de restricción si se encuentran en la diana reconocida por la restrictasa. Mayoritariamente dichas terceras posiciones del codón son ocupadas por A o T (93-95%), como consecuencia del alto contenido en A+T del genoma mitocondrial de *Drosophila*. Por tanto, con el tiempo, la posibilidad de reversión de un sitio de restricción perdido será muy alta, lo que puede dar lugar a un alto grado de homoplasia en los patrones de restricción compartidos entre especies filogenéticamente distantes.

Una posible prueba de ello es la pérdida o ganancia de un mismo sitios de restricción en especies pertenecientes a subgrupos o linajes distantes. Por ejemplo, el tercer sitio *EcoRI* (ver Figuras 4 y 10) no está presente ni en *D. azteca* (subgrupo *affinis*), ni en *D. miranda* (subgrupo *pseudoobscura*), ni en *D. obscura*, *D. ambigua* y *D. subsilvestris* (subgrupo *obscura*), ni tampoco en *D. yakuba* o *D. melanogaster* (entre otras del grupo *melanogaster*), pero sí lo está en otras especies de cada uno de los subgrupos. Algo similar ocurre con especies del subgrupo *mulleri* del grupo *repleta* (Barrio et al., 1992b) o con especies hawaianas (DeSalle y Giddings, 1986).

Al comparar las secuencias de la región donde se encuentra la diana *EcoRI* (GAATTC), se observa que las sustituciones nucleotídicas han tenido lugar en las terceras posiciones de los codones incluidos en el sitio de restricción perdido, siendo idénticas en *D. miranda* y *D. yakuba* (GAATCC), en *D. ambigua* y *D. melanogaster* (GGATTC), y en *D. azteca*, *D. obscura* y *D. subsilvestris* (GTATTC). Como se puede observar, entre especies filogenéticamente distantes coincide la secuencia.

La incapacidad para determinar con fiabilidad estadística las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura* mediante el análisis de restricción del genoma mitocondrial, bien por las limitaciones del método, bien por la saturación sustitucional del genoma mitocondrial, conducían al intento de resolución, o al menos de determinación de las posibles causas, mediante el análisis de secuencias de distintas zonas del genoma mitocondrial de las especies del grupo.

Todos los métodos filogenéticos utilizados en la resolución de la filogenia basada en secuencias del mtDNA proporcionaron la misma interpretación de las relaciones entre subgrupos y linajes del grupo *obscura*. Los subgrupos *affinis* y *pseudoobscura* son significativamente monofiléticos, y el *obscura* claramente polifilético, formado por los linajes significativamente monofiléticos: *ambigua-obscura-tristis* y *subobscura-madeirensis-guanche*, y dos especies, *D. bifasciata* y *D. subsilvestris*, de posición incierta. La primera de ellas aparece en todos los análisis como un linaje independiente, y la segunda, en algunos de los análisis aplicados, puede formar un linaje independiente o, en la mayoría de ellos, formar parte del *ambigua-obscura-tristis*.

Sin embargo, reiteradamente, ninguno de los métodos de reconstrucción filogenética, contrastados por los distintos métodos de determinación de la fiabilidad de los árboles, permite resolver la ramificación entre los linajes del grupo.

Se puede argüir que la incapacidad para resolver las relaciones entre especies de los distintos subgrupos y linajes es debido a la disponibilidad de un número insuficiente de sitios informativos a causa del efecto de saturación (DeSalle et al., 1987). Sin embargo, parece más probable que la imposibilidad de resolución sea debida a una rápida radiación filética del grupo *obscura*, tal como sugiere las estimas máximo-verosímiles de los tiempos de divergencia obtenidas por el método de Hasegawa et al. (1985), aunque no se pueda descartar la existencia de un efecto de saturación sobreañadido. Por otra parte, Kraus y Miyamoto (1991) y Sudman y Hafner (1992) sugieren que ramas internodales cortas y valores de divergencia aproximadamente idénticos entre las especies consideradas en un análisis filogenético, respaldan la hipótesis de una rápida aparición y radiación de los linajes (radiación en estrella), tal como ocurre en nuestro análisis.

Una reconstrucción filogenética, además de ser validada por distintos métodos estadísticos para determinar su fiabilidad, debe ser congruente con reconstrucciones filogenéticas obtenidas mediante otras aproximaciones, en este caso, diferentes de la basada en el genoma mitocondrial. Si las filogenias basadas en otras aproximaciones resultan ser incongruentes con las obtenidas en base al polimorfismo mitocondrial,



significaría que la filogenia mitocondrial no estaría reflejando los procesos de especiación acontecidos a lo largo de la historia evolutiva del grupo *obscura*, quizá debido a la peculiar dinámica evolutiva del genoma mitocondrial de *Drosophila* (efecto de saturación), o que refleje la filogenia específica del genoma mitocondrial por su particular modo de herencia.

Uno de los motivos aducidos para explicar la falta de congruencia entre reconstrucciones filogenéticas moleculares y cualquier otro tipo de reconstrucción, es el hecho de que los árboles obtenidos a partir de secuencias pueden reflejar la filogenia del gen (en nuestro caso del mtDNA), y no la de las especies ("gene trees vs. species trees", ver Pamilo y Nei, 1988). Para que un árbol génico realmente refleje el proceso de especiación, los linajes portadores de distintas variantes del gen en la especie ancestral (polimorfismo ancestral) deben extinguirse entre cada dos sucesos consecutivos de especiación. Este suceso depende del tiempo transcurrido entre sucesos de especiación (tasa de especiación) y del tamaño poblacional (Tateno et al., 1982). No obstante, una forma más sencilla de determinar si el árbol génico refleja el proceso de especiación consiste en comparar las variabilidades intra- e interespecíficas. Si la variabilidad intraespecífica del gen es bastante menor que la interespecífica, la filogenia molecular se puede corresponder con el proceso de especiación (Ruttkay et al., 1992).

Aunque en el análisis filogenético basado en secuencias del mtDNA no se llevó a cabo un muestreo de la variabilidad intraespecífica, en el análisis de restricción sí que se realizó. Tanto en nuestro estudio (Barrio et al., 1992a), como en el de González et al. (1990), se analizó la variabilidad mitocondrial intraespecífica de 13 de las 17 especies estudiadas, resultando polimórficas únicamente 6. Excepto las dos isolíneas de *D. bifasciata* de orígenes geográficos muy distantes (Europa y Japón), que muestran una divergencia intraespecífica del mismo orden que la interespecífica, y las divergencias interespecíficas entre *D. persimilis* y *D. pseudoobscura*, y entre *D. affinis* y *D. algonquin*, que son del mismo orden que las intraespecíficas (ver Tabla 4 y Figura 9), el resto de especies presenta una variabilidad intraespecífica mucho menor que la interespecífica, incluso en el caso de *D. subobscura*, cuya variabilidad intraespecífica ha sido exhaustivamente estudiada (Latorre et al., 1986 y 1992; Afonso et al., 1990; Rozas et al., 1990).

Por tanto, podemos considerar que la filogenia mitocondrial del grupo *obscura* refleja perfectamente los sucesos de especiación acontecidos en la historia evolutiva del grupo, excepto, quizás, en el caso de los pares *pseudoobscura-persimilis* y *affinis-algonquin*, especialmente el primero.

Aunque las diferentes aproximaciones (polimorfismo enzimático, cromosómico, etc.) a la filogenia del grupo *obscura* parecen ser incongruentes entre sí, cuando se reanalizan con atención para contrastarlas con la obtenida en el presente estudio, se observa que la mayor parte de ellas apoya, o puede apoyar, la hipótesis de la radiación en estrella de múltiples linajes.

Respecto a los análisis filogenéticos basados en el polimorfismo enzimático (Lakovaara et al., 1972 y 1976; Marinkovic et al., 1978; Lakovaara y Keränen, 1980; Cabrera et al., 1983; Loukas et al., 1984; Cariou et al., 1988), los errores asociados a las estimas de divergencia, la diferencia de sistemas enzimáticos analizados y las discrepancias en las movilidades electroforéticas de los alelos presentes en las diferentes especies para los loci analizados (ver Loukas et al., 1984), dificultan la interpretación de los resultados. No obstante, las filogenias resultantes pueden agruparse en dos tipos, las que respaldan la condición monofilética del subgrupo *obscura* (Lakovaara et al., 1972 y 1976; Lakovaara y Keränen, 1980; Loukas et al., 1984) y las que señalan o respaldan el carácter polifilético del subgrupo (Marinkovic et al., 1978; Cabrera et al., 1983; Cariou et al., 1988), aunque sus resultados puedan ser discrepantes entre sí.

El análisis de las especies de los subgrupos *pseudoobscura* y *obscura* (antiguo subgrupo *obscura*) de Lakovaara et al. (1972), en el que aparecían los dos subgrupos claramente monofiléticos, fue reconsiderado por Farris (1974) quien, utilizando la matriz de distancias del trabajo previo, reconstruyó la filogenia sin asumir tasas evolutivas constantes, apareciendo *D. bifasciata* más próxima al subgrupo *pseudoobscura*. En el trabajo posterior de Lakovaara et al. (1976, recogido también en Lakovaara y Keränen, 1980), donde se utilizaron 22 taxones del grupo *obscura*, la filogenia obtenida muestra la existencia de tres subgrupos monofiléticos: *affinis*, *obscura* y *pseudoobscura*, y dos especies de posición dudosa: *D. helvetica* y *D. alpina*. Sin embargo, las estimas de divergencia entre las especies del subgrupo *obscura* (entre  $0.48 \pm 0.17$  y  $1.44 \pm 0.39$ ) no son mucho menores que las existentes

entre estas especies y las de los otros subgrupos ( $0.85 \pm 0.25$  a  $1.25 \pm 0.35$  en el caso excepcional señalado por los autores entre *D. athabasca* y el trío *bifasciata-imaii-eskoi*, y  $1.25 \pm 0.35$  a  $1.95 \pm 0.53$  entre todas las posibles comparaciones) y los errores asociados a las estimas son lo suficientemente grandes como para permitir otras posibles interpretaciones.

El último estudio que respalda el carácter monofilético del subgrupo *obscura* (Loukas et al., 1984), presenta dos linajes principales, uno conducente a *D. pseudoobscura* y *D. helvetica*, y el otro a las especies del subgrupo *obscura*, que se agrupan en tres linajes: *obscura-tristis-ambigua*, *subobscura-madeirensis-guanche* y *bifasciata-subsilvestris*. Sin embargo, cuando comparamos, de nuevo, las estimas de distancias, observamos que las divergencias entre especies de los distintos linajes del subgrupo *obscura* son tan grandes como las que hay entre éstas y *D. pseudoobscura* o *D. helvetica*, representantes de otros subgrupos. Así, la distancia entre linajes del subgrupo *obscura* se sitúa en el rango de  $1.23 \pm 0.32$  a  $2.08 \pm 0.54$  (media 1.58). De  $1.57 \pm 0.40$  a  $2.49 \pm 0.68$  (media 1.90), entre *D. pseudoobscura* y las especies del grupo *obscuray* de  $1.23 \pm 0.32$  a  $3.17 \pm 0.98$  (media 1.85) entre *D. helvetica* y las especies del subgrupo *obscura*. De nuevo, otras posibles soluciones a la filogenia son factibles, pero ninguna de ellas fiable, dados los grandes errores estándar asociados a las estimas de distancias.

En cuanto a los estudios que respaldan el carácter polifilético del grupo (Marinkovic et al., 1978; Cabrera et al., 1983; Cariou et al., 1988), todos muestran que las distancias entre especies del subgrupo *obscura* son del mismo orden que las que hay entre éstas y los representantes de los otros subgrupos. De todos ellos, el trabajo más completo es el de Cariou et al. (1988), en el que se analizan representantes de tres subgrupos, incluido el *microlabis*. Aplicando distintos métodos de reconstrucción filogenética obtienen distintas topologías para las relaciones entre linajes del grupo, soluciones que pasan siempre por considerar el subgrupo *obscura* como polifilético. En las diferentes relaciones obtenidas, siempre destacan las grandes distancias existentes entre los distintos linajes, frente al pequeño tamaño de las ramas internodales que los relacionan. Al comparar los valores de las distancias entre especies, de nuevo observamos que las distancias entre linajes del subgrupo *obscura* (entre *subobscura-madeirensis-guanche* y *obscura-ambigua-tristis* es de  $1.02 \pm 0.23$ ; entre *bifasciata* y *subobscura-madeirensis-guanche*, de  $1.43 \pm 0.10$ ; y entre *bifasciata* y *obscura-ambigua-*



*tristis*, de  $1.10 \pm 0.18$ ) son del mismo orden que las existentes entre subgrupos (entre los subgrupos *microlabis* y *pseudoobscura* es de  $1.17 \pm 0.06$ ; entre los subgrupos *microlabis* y *obscura*, de  $1.25 \pm 0.32$ ; y entre los subgrupos *pseudoobscura* y *obscura*, de  $1.14 \pm 0.31$ ).

También el análisis filogenético basado en divergencias del DNA de copia única, obtenidas por hibridación DNA-DNA (Goddard et al., 1990), respalda el origen polifilético del subgrupo *obscura* (al menos de las dos representantes utilizadas *D. ambigua* y *D. subobscura*). Sin embargo, también se señala la mayor proximidad filogenética entre los subgrupos *affinis* y *pseudoobscura*, en contraposición con la hipótesis de una radiación filética rápida de los subgrupos y linajes del grupo *obscura*.

Un posible respaldo a la hipótesis de radiación filética rápida del grupo *obscura* proviene del análisis filogenético basado en las secuencias de la región del gen de la Alcohol Deshidrogenasa (que contiene los genes *Adh* y *Adh-dup*) de tres especies del grupo *obscura* (Marfany y González-Duarte, 1992). El análisis de las secuencias muestra que las divergencias entre *D. pseudoobscura*, *D. ambigua* y *D. subobscura*, o bien son similares en las tres especies, o bien es algo menor entre *D. pseudoobscura* y *D. subobscura*, dependiendo de la zona considerada en el análisis.

Ya hemos visto que las reconstrucciones filogenéticas del grupo *obscura* basadas en el polimorfismo de restricción mitocondrial (Latorre et al., 1988; González et al., 1990; Barrio et al., 1992a) también son congruentes con la obtenida a partir del análisis de las secuencias de distintas regiones del mtDNA del presente estudio, aunque a diferencia de los estudios basados en otros sistemas genéticos, en este caso podemos explicar las similares divergencias entre linajes que impiden determinar las relaciones filogenéticas del grupo *obscura* como resultado del efecto de saturación debido al alto contenido en A+T del mtDNA de *Drosophila* (en general, de insectos), y/o a la rápida radiación filética del grupo. Sin embargo, un nuevo respaldo a la hipótesis de la radiación en estrella provendría del análisis de la variabilidad del RNA ribosómico mitocondrial de especies del grupo *obscura* llevado a cabo por Ruttkay et al. (1992). En este estudio se analizan las secuencias de una pequeña región de 309 pb del gen 12S rRNA mitocondrial de especies representativas de los subgrupos *pseudoobscura*, *obscura* y *microlabis*. La filogenia resultante presenta cuatro linajes: el subgrupo *pseudoobscura* (*D. ps.*

*bogotana* y *D. persimilis*), el *microlabis* (*D. microlabis* y *D. kitumensis*), el linaje *subobscura-guanche* y el *obscura-tristis*. A pesar de que el linaje *obscura-tristis* se une al subgrupo *pseudoobscura* (hecho que extraña a los autores del trabajo), las divergencias nucleotídicas entre las especies de los cuatro linajes son del mismo orden. Además, ninguno de los nodos que relacionan los cuatro linajes alcanza significación en un análisis de fiabilidad de la filogenia por el método de remuestreo "bootstrap" (entre el 45 y el 52%, cuando debería ser superior al 95% para ser considerados monofiléticos).

Como se trata de un análisis filogenético basado en secuencias del genoma mitocondrial, de nuevo se puede aducir, como alternativa a la radiación en estrella, que la falta de resolución de la filogenia se deba al efecto de saturación del mtDNA. En un reciente trabajo, DeSalle (1992) señala que el efecto de saturación no se observa en los genes ribosómicos mitocondriales, dada la perfecta linealidad resultante al representar el tiempo de divergencia frente a la divergencia nucleotídica de los genes ribosómicos. Por otra parte, según señala el mismo DeSalle (1992), cuando se eliminan las transiciones (en las que se produce un mayor efecto de saturación) del análisis filogenético entre secuencias ribosómicas mitocondriales, se obtiene la misma reconstrucción filogenética que utilizando toda la información disponible.

Hasta ahora hemos visto distintas aproximaciones filogenéticas más o menos congruentes con la hipótesis de la rápida radiación filética del grupo *obscura*. Sin embargo, la radiación rápida no es incompatible con el efecto de saturación observado en el genoma mitocondrial de *Drosophila* (DeSalle et al., 1987). Así, en un periodo de tiempo relativamente corto de aparición de los linajes (considerando la escala de tiempo geológico), con las tasas de sustitución determinadas para el genoma mitocondrial, el número de sustituciones nucleotídicas acontecido sería relativamente bajo. El largo periodo transcurrido desde la aparición del linaje hasta la actualidad, bajo la restricción hacia un mantenimiento del alto contenido en A+T, permitiría que las sustituciones ocurridas desde la separación de los linajes desdibujaran aquellas acontecidas en el antepasado común antes de la separación (caracteres plesiomórficos), lo que conllevaría la dificultad en reconocer en la actualidad los patrones de divergencia entre especies de linajes distantes, y por tanto, en resolver sus relaciones filogenéticas.

Bajo el prisma de la hipótesis de radiación filética rápida en el grupo *obscura*, se podrían explicar, también, las reconstrucciones filogenéticas discrepantes en cuanto a las relaciones entre los distintos linajes. Si el tiempo transcurrido entre procesos de especiación, que dieron lugar a los distintos linajes del grupo, fue relativamente corto, el polimorfismo ancestral pudo perdurar a través de los distintos linajes, extinguiéndose de forma desigual en cada linaje, con lo que las reconstrucciones filogenéticas basadas en distintos genes, genomas o regiones del genoma podrían reflejar diferentes relaciones entre los linajes, correspondiendo cada una de las reconstrucciones, en realidad, a la filogenia del gen o genes concretos, y no al proceso de especiación. No obstante, hay que ser cautos, puesto que este hecho no sólo depende del tiempo transcurrido entre sucesos de especiación (tasa de especiación), sino también del tamaño poblacional de las especies ancestrales (Tateno et al., 1982).

La utilización de las reordenaciones cromosómicas y la transposición de genes en el genoma de *Drosophila*, sucesos mutacionales mucho menos probables que la sustitución nucleotídica, podría permitir reconocer en la actualidad los patrones de divergencia entre las especies del grupo *obscura*, y por tanto, proporcionar información adicional sobre la filogenia del mismo. De este modo, Felger y Pinsker (1987) analizaron la historia filogenética de la transposición de los complejos de genes de las histonas, las características de los cromosomas metafásicos y, en algunas especies más relacionadas, los patrones de bandeo cromosómico de representantes de varios subgrupos y linajes del grupo *obscura*. La interpretación de sus resultados la realizan en función de las filogenias obtenidas por otros autores mediante el análisis del polimorfismo enzimático (Lakovaara et al., 1976 y Cabrera et al., 1983), que como hemos señalado respaldaban el origen monofilético del grupo *obscura*. Sin embargo, la ausencia de sucesos de reordenación cromosómica o transposición de complejos de histonas en las ramas internodales que unen los linajes del subgrupo *pseudoobscura*, del trío *subobscura-madeirensis-guanche*, y el que conduce al resto de especies del subgrupo *obscura* (*D. obscura*, *D. ambigua*, *D. tristis*, *D. bifasciata* y *D. subsilvestris*) permite que otras interpretaciones sean válidas, entre ellas, el origen polifilético del subgrupo *obscura*.

Las reordenaciones cromosómicas no son un criterio válido para establecer las relaciones evolutivas en las especies del grupo *obscura*. En

primer lugar, porque la hipótesis de partida de que el complemento haploide, de cinco cromosomas acrocéntricos y uno puntiforme, de *D. subobscura* pueda ser el linaje ancestral del grupo, en base a la homología del cromosoma acrocéntrico X entre esta especie y *D. melanogaster* (Patterson y Stone, 1952; Lakovaara y Saura, 1982), ha sido cuestionado por Cariou et al. (1988) en función de la similitud de los cariotipos de las especies africanas del subgrupo *microlabis* y los de *D. ambigua*, *D. tristis* y *D. bifasciata*. Y en segundo lugar, porque para explicar algunas de las reordenaciones en distintas especies se debe recurrir a convergencia, lo que permite interpretaciones diferentes de las relaciones de las especies.

No obstante, la localización de los complejos de genes de histonas en el cariotipo de las distintas especies del grupo permiten apuntar dos posibles claves para la solución de algunas de las relaciones entre especies del grupo. La presencia de complejos de genes de histonas en el cromosoma A (además de en el B) de las especies *D. obscura*, *D. ambigua*, *D. tristis*, *D. bifasciata* y *D. subsilvestris*, parece relacionarlas, y la presencia de un complejo de histonas en el cromosoma E de *D. pseudoobscura* y de *D. affinis*, permite relacionar ambos subgrupos neárticos, ya que la transposición de los complejos son sucesos muy poco probables (requieren un mínimo de tres mecanismos implicados) como para que se den convergencias. No obstante, ambos autores señalan que caben otras interpretaciones de los resultados (por ejemplo, presencia de los complejos de histonas en los cromosomas E y B en el antepasado), que permitirían otras soluciones para la filogenia del grupo, más aún teniendo en cuenta la falta de información de otras especies del grupo.

### 3. RECONSIDERACION DE LA TAXONOMIA DEL GRUPO *obscura*.

Como hemos visto, en la actualidad el grupo *obscura* se divide en cuatro subgrupos, de los cuales uno de ellos no es natural, ya que está formado por distintos linajes. En Sistemática, una de las ramas más conservadoras de la Biología, era habitual que al definir un taxón se le asignaran una serie de caracteres diagnósticos que lo determinaban. Aquellos subtaxones que mantenían esos caracteres diagnósticos, aunque pudiesen presentar otros caracteres distintivos, eran incluidos en el taxón nominal, y aquellos que, por divergencia, no presentaban alguno de esos caracteres

diagnósticos o presentaban algún carácter derivado, eran incluidos en nuevos taxones (como ejemplo, para el caso del género *Drosophila*, ver Throckmorton, 1965). El resultado era la existencia de taxones polifiléticos o parafiléticos (grupo polifilético relacionado con grupos monofiléticos), como puede ser el caso del género *Drosophila*, que ha sido objeto de una extensa revisión (Grimaldi, 1990; DeSalle y Grimaldi, 1991; DeSalle, 1992), o el del subgrupo polifilético *obscura*, parafilético en relación a los subgrupos monofiléticos *pseudoobscura*, *microlabis* y *affinis*.

Una clasificación cladística puede ser excesivamente complicada por el gran número de taxones jerárquicos que se pueden proponer (Boudreaux, 1979). Pero, tal como señala Grimaldi (1990), la conveniencia no puede sustituir la exactitud, y para que la nomenclatura zoológica permita predecir e inferir con fiabilidad las relaciones entre taxones, debe reflejar las relaciones filogenéticas.

Por tanto, para que la clasificación del grupo *obscura* refleje las relaciones filogenéticas, el grupo debería ser dividido en, al menos, cinco subgrupos (*affinis*, *microlabis*, *obscura*, *pseudoobscura* y *subobscura*) o seis, si se considera el subgrupo *bifasciata*, e incluso ocho, si se reconsideran las especies *D. helvetica* y *D. alpina* (no analizadas en el presente trabajo) como únicos representantes de linajes ancestrales independientes. En principio, y a falta de estudios más completos sobre las relaciones filogenéticas entre *D. helvetica* y *D. alpina* y el resto de especies del grupo *obscura*, proponemos reestructurar la subdivisión del grupo *obscura* de la siguiente forma:

#### **Subgrupo *affinis*. Sturtevant, 1942.**

Subgrupo claramente monofilético formado por 9 especies neárticas: *D. affinis*, *D. algonquin*, *D. athabasca*, *D. narragansett*, *D. azteca*, *D. tolteca*, *D. dobzhanskii*, *D. novitskii* y *D. seminole*. La posesión de cromosomas metafásicos similares en todas las especies, así como la posibilidad de descendencia híbrida entre las especies del subgrupo también respalda la gran relación existente entre estas especies. *D. affinis*, *D. algonquin* y *D. athabasca* son las especies más próximas, que según Lakovaara y Saura (1982) pueden formar un complejo. La existencia de otro complejo formado por *D. narragansett*, *D. azteca* y *D. tolteca*, no ha sido confirmado por el

análisis de restricción del mtDNA. No obstante, datos morfológicos y cromosómicos señalan la estrecha relación entre *D. azteca* y *D. tolteca*. *D. narragansett* parece presentar una posición intermedia entre ambos complejos. Sería interesante, por último, determinar la relación de las especies raras, *D. dobzhanskii* y *D. novitskii*, con el resto de especies del subgrupo. Dada las dificultades de captura y mantenimiento, un análisis morfológico exhaustivo a partir de especímenes de colección, como recientemente se ha realizado con otras especies de *Drosophila* (Grimaldi, 1990), quizás podría determinar su posición en el subgrupo.

#### Subgrupo *pseudoobscura*, Lakovaara et al., 1976.

Formado por las especies neárticas *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. miranda*, *D. lowei*, *D. cuauhtemoci* y *D. frolovae*. Las tres primeras especies han sido ampliamente estudiadas a todos los niveles. Así, ha quedado perfectamente determinado que *D. pseudoobscura* y *D. persimilis* son las especies más próximas, ya que todos los datos indican que la segunda se puede haber originado de la primera recientemente (hace menos de 2 Ma), de ahí que se mantenga el polimorfismo ancestral. Ello explicaría que ambas especies presenten el mismo patrón de restricción mitocondrial, y que *D. persimilis* se una dentro del "cluster" formado por diferentes poblaciones de *D. pseudoobscura* (para el polimorfismo cromosómico, Dobzhansky y Powell, 1975; para el polimorfismo de restricción de la región del gen de la Adh, Schaeffer et al., 1987; para el del mtDNA, Latorre et al., 1988 y el presente estudio).

*D. miranda* sería la siguiente especie en unirse al par *pseudoobscura-persimilis*, como corroboran todos los análisis filogenéticos realizados (Dobzhansky y Powell, 1975; Lakovaara et al., 1976; Latorre et al., 1988; Goddard et al., 1990; Barrio et al., 1992a; el presente estudio). Esta especie ha sido menos estudiada, y a partir de los datos de preferencia de apareamiento (Dobzhansky y Koller, 1938) y la gran divergencia entre poblaciones determinada por hibridación DNA-DNA (Goddard et al., 1990), ha llevado a estos últimos autores a indicar la posibilidad de que se trate de un complejo de especies crípticas o semiespecies.

Los pocos estudios sobre las relaciones filogenéticas entre *D. lowei* y el resto de especies del subgrupo (a nivel cromosómico, Heed et al., 1969; y alozímico, Lakovaara et al., 1976) señalan que *D. lowei* sería la primera especie en divergir de las cuatro estudiadas, ya que nada se sabe de las otras especies raras (*D. cuauhtemoci* y *D. frolovae*). Sus descripciones morfológicas parecen indicar cierta relación con las especies del subgrupo *affinis* (Lakovaara y Saura, 1982). Su análisis más detallado podría resolver la posible relación entre los dos subgrupos propuesta por Lakovaara et al. (1976), Felger y Pinsker (1987), Latorre et al. (1988) y Goddard et al. (1992).

#### **Subgrupo *microlabis*, Cariou et al., 1988.**

Formado por las especies africanas del grupo *D. microlabis*, *D. kitumensis*, *D. cariouae*, *D. kimbasi* y algunas más descritas recientemente o aún por describir. Dadas las dificultades en cultivar estas especies, sólo se han analizado las dos primeras. Los estudios filogenéticos basados en el polimorfismo enzimático (Cariou et al., 1988) y en el análisis de las secuencias del rRNA mitocondrial (Ruttkey et al., 1992) señalan la relación de proximidad entre estas dos especies. No tan claras son las relaciones entre las otras dos especies, que a nivel morfológico parecen estar tan distantes entre sí, como ésta respecto a *D. microlabis* y *D. kitumensis*.

Para clarificar las relaciones entre las especies del subgrupo, y entre este subgrupo y los restantes del grupo *obscura*, se requerirían ulteriores estudios.

#### **Subgrupo *subobscura*. Nuevo subgrupo.**

Estaría formado por las especies *D. subobscura*, *D. madeirensis* y *D. guanche*, ampliamente estudiadas a todos los niveles. Ya hemos señalado muchas de las razones para escindir este nuevo subgrupo del grupo *obscura*. También las características morfológicas y la configuración de los cromosomas metafásicos respaldan la diferenciación del subgrupo *subobscura*. Así, Buzzati-Traverso y Scossiroli (1955), utilizando las similitudes morfológicas, determinan que *D. subobscura* (las otras dos especies eran desconocidas) difiere de las otras especies europeas del

subgrupo *obscura* bastante más de lo que estas difieren entre sí. Lakovaara y Keränen (1980), utilizando los datos de los autores anteriores, reconstruyen la filogenia del antiguo subgrupo *obscura* en base a sus características morfológicas. Cuando la reconstrucción la realizan mediante el método UPGMA, *D. subobscura* se incluye entre las especies paleárticas del subgrupo en un linaje propio, pero cuando la reconstrucción se realizaba mediante el método de Wagner, *D. subobscura* se situaba próxima a las especies neárticas (actual subgrupo *pseudoobscura*). Por último, en su revisión del grupo *obscura*, Lakovaara y Saura (1982) señalan las dificultades para relacionar, en base a sus características morfológicas, a *D. subobscura* y *D. guanche* con el resto de especies del subgrupo *obscura*.

Las tres especies del nuevo subgrupo poseen el mismo conjunto haploide de cromosomas metafásicos muy diferente del de otras especies del grupo. Las especies del subgrupo *subobscura* está formado por 5 cromosomas acrocéntricos en forma de varilla, entre ellos el sexual, y un cromosoma puntiforme, que en *ganche* y *madeirensis* es extremadamente pequeño o no existe (Krimbas y Loukas, 1984). En cambio el resto de especies del grupo *obscura* se caracteriza por poseer al menos un cromosoma metacéntrico (al menos el X), incluso las especies del subgrupo *microlabis*. La presencia de un cromosoma X acrocéntrico en varilla en estas especies, al igual que en *D. melanogaster*, llevó a postular que *D. subobscura* podía ser el representante del linaje ancestral (Patterson y Stone, 1952)

Las relaciones entre las tres especies del subgrupo han sido controvertidas. La posibilidad de obtener híbridos estériles en los cruces entre hembras de *D. madeirensis* y machos de las otras dos especies, parece situar a *madeirensis* en una posición intermedia. Por otra parte, el hecho de que *madeirensis* y *ganche* sean especies endémicas de los bosques de laurisilva de Madeira y Tenerife, donde *subobscura* también está presente, indica que ambas especies se debieron originar a partir de formas ancestrales de *subobscura*. Cabe, pues, preguntarse cuál de las dos especies endémicas se escindió antes del linaje *subobscura*.

Aunque algunos resultados del análisis del polimorfismo enzimático de estas especies (Cabrera et al., 1983; Cariou et al., 1988) indicaban mayor proximidad entre *madeirensis* y *ganche*, el estudio de Loukas et al. (1984) señala una mayor relación entre *madeirensis* y



*subobscura*. La proximidad entre *madeirensis* y *subobscura* también ha sido respaldada por el análisis del polimorfismo cromosómico (Krimbas y Loukas, 1984; Larruga y Pinsker, 1984), el análisis de restricción del genoma mitocondrial (González et al., 1990), y el análisis del DNA nuclear altamente repetitivo (Bachmann et al., 1989), lo que sugiere que la primera especie en divergir fue *D. guanche* y, posteriormente, *D. madeirensis* y *D. subobscura*.

El análisis de las secuencias del mtDNA también muestra siempre una mayor relación entre *madeirensis* y *subobscura*, aunque en varios métodos, dicha relación no sea significativa ("bootstrap", invariantes de Lake, etc.). Este hecho podría indicar que el proceso de especiación de *D. guanche* y *D. madeirensis* a partir de *D. subobscura* pudo acontecer en un periodo de tiempo relativamente corto en ambas islas de la Macaronesia.

No obstante, el hecho de que *D. madeirensis* y *D. subobscura* compartan la delección de una adenina, presente en *D. guanche*, en la región intergénica localizada entre los genes *lrRNA* y *Leu-tRNA* (ver Figura 17), parece indicar que la aparición de *D. madeirensis* fue posterior, tal como respaldan las otras aproximaciones filogenéticas.

Finalmente, un punto controvertido en las relaciones del subgrupo *subobscura* con los otros subgrupos del grupo *obscura* obtenido en las reconstrucciones filogenéticas basadas en las secuencias del mtDNA es el hecho de que cuando se aplican métodos que asumen tasas constantes (UPGMA o el método máximo-verosímil de Hasegawa et al., 1985) los subgrupos *affinis* y *subobscura* aparecen significativamente relacionados. Sin embargo, cuando los métodos aplicados no asumen tasas constantes (método de Fitch y Margoliash, del vecino más próximo, máxima parsimonia, parsimonia de transversión, parsimonia evolutiva, o métodos de máxima verosimilitud), se respalda la radiación filética rápida de todos los subgrupos, incluidos el *affinis* y el *subobscura*.

Por otra parte, ya hemos visto que ninguna de las otras aproximaciones filogenéticas, ni ninguna de las características morfológicas o cromosómicas, respaldan la relación entre ambos subgrupos.

Una posible explicación sería el hecho de que las tasas de sustitución fuesen desiguales en los distintos linajes, y ello desvirtuase los

resultados obtenidos al asumir tasa constante. Recordemos que al aplicar el método de Hasegawa et al. (1985), únicamente se probaron dos hipótesis, tasa constante y tasa variable en función del tiempo de divergencia de las especies, pero no la posibilidad de tasa variables entre linajes.

#### Subgrupo *obscura* ("sensu lato"), Sturtevant, 1942.

Este subgrupo estaría formado por las restantes especies paleárticas. En él se pueden distinguir dos complejos, el formado por el trío de especies *D. obscura*, *D. ambigua* y *D. tristis*, al que también se podría unir *D. subsilvestris*, especie de posición incierta, que llamaremos complejo *obscura* o subgrupo *obscura* "sensu stricto", y el formado por *D. bifasciata* y sus especies afines (*D. imaii* y *D. eskoi*) que podemos denominar complejo *bifasciata*, y que podría, incluso, considerarse como nuevo subgrupo.

Por último, una serie de especies del antiguo subgrupo *obscura* son de difícil asignación a cada uno de los nuevos subgrupos o complejos, por ser endémicas y no haberse estudiado con detalle (*D. epiobscura*, *D. eniuae*, *D. tsukubaensis*). *D. epiobscura* fue capturada en el estado de Cachemira (India), y por sus peculiares características morfológicas (únicas conocidas) no se puede relacionar con ninguno de los complejos o subgrupos señalados. *D. eniuae* y *D. tsukubaensis*, endémicas del Japón, podrían estar relacionadas con el subgrupo o complejo *bifasciata*, presente en su área de distribución.

Las relaciones entre las tres especies del complejo o subgrupo *obscura* "sensu stricto" han sido determinadas mediante el análisis del polimorfismo enzimático (Lakovaara et al., 1972 y 1976; Pinsker y Buruga, 1982; Loukas et al., 1984; Cariou et al., 1988), polimorfismo cromosómico y transposición del complejo de genes de las histonas (Felger y Pinsker, 1987); polimorfismo de restricción del mtDNA (González et al., 1990) y el presente trabajo. Producto de toda esta amplia revisión de las tres especies es la controversia existente respecto a sus relaciones filogenéticas. Así, las relaciones basadas en el polimorfismo enzimático señalan la mayor relación entre *D. obscura* y *D. tristis* (aunque las distancias entre las tres son del mismo orden), excepto en el estudio de Cariou et al. (1988) que sitúan más próximas a *D. ambigua* y *D. tristis*.

Tanto el patrón de bandas de los cromosomas politénicos y las inversiones requeridas para relacionarlos, así como la configuración de los cromosomas en metafase, señalan una mayor proximidad entre *D. ambigua* y *D. tristis*. Sin embargo, la disposición de dos complejos de histonas en el cromosoma A en *D. obscura* y *D. ambigua*, lleva a Felger y Pinsker (1987) a proponer una mayor relación de estas dos especies. Esta proximidad filogenética entre *D. ambigua* y *D. obscura*, es confirmada también mediante el análisis de restricción del mtDNA (González et al., 1990) y mediante el análisis de secuencias del genoma mitocondrial (presente estudio).

Curiosamente, en el análisis de restricción, *D. tristis* parece formar parte de un linaje independiente. Sin embargo, este resultado no es confirmado mediante el análisis de secuencias, donde el par *obscura-ambigua* se une a *D. tristis* formando un grupo significativamente monofilético en todas las reconstrucciones filogenéticas, excepto en las que asumen tasa constante, en las cuales *D. subsilvestris* y *D. tristis* se unen simultáneamente al par *obscura-ambigua*.

La posición de *D. subsilvestris*, en el subgrupo *obscura* "sensu lato", también es incierta. A partir del polimorfismo enzimático, las distancias estimadas entre *D. subsilvestris* y los representantes de los linajes *obscura*, *bifasciata* y del subgrupo *subobscura* son similares (Lakovaara et al., 1972 y 1976; Loukas et al., 1984). En cambio, en el análisis de restricción se agrupa con el par *ambigua-obscura* (González et al., 1990) y en el análisis de las secuencias del mtDNA ocupa posiciones variables según el método de análisis filogenético empleado. De este modo, unas veces se agrupa con el trío *obscura-ambigua-tristis*, pudiendo ser la relación significativa (máxima verosimilitud y UPGMA) o no significativa (mediante el método de remuestreo, "bootstrap", utilizando máxima parsimonia, sólo se une en un 65% de las réplicas), y otras veces se agrupa con otros linajes (parsimonia de transversión).

El complejo *bifasciata* (*D. bifasciata*, *D. imaii* y *D. eskoi*) aparece como tal en los análisis basados en el polimorfismo enzimático de Lakovaara et al. (1972 y 1976) y Lakovaara y Keränen (1980). Aunque, estos mismos autores destacan la posible relación entre estas especies y las del subgrupo *affinis* (Lakovaara y Saura, 1982).

En los restantes estudios del polimorfismo enzimático en los que se ha analizado *D. bifasciata*, ésta aparece como un linaje, tan divergente de las otras especies del subgrupo *obscura*, como de las especies de los otros subgrupos (Loukas et al., 1984; Cariou et al., 1988). Este hecho se confirma en los análisis del polimorfismo de restricción del mtDNA (González et al., 1990; Barrio et al., 1992) y en el de las secuencias del genoma mitocondrial. Por tanto, el complejo *bifasciata* podría considerarse un nuevo subgrupo del grupo *obscura*.

En contra de la existencia del nuevo subgrupo *bifasciata* se encontrarían los resultados del trabajo de Felger y Pinsker (1987), quienes señalaron que tanto la similitud de la configuración de los cromosomas metafásicos, así como la presencia de complejos de genes de histonas en el cromosoma A de todas las especies del subgrupo *obscura* "sensu lato", reafirman la relación existente entre ellas. Sin embargo, aunque la configuración de los cromosomas metafásicos de *D. bifasciata* es idéntica a la de *D. tristis* y *D. ambigua*, también lo es respecto a la de las especies del subgrupo *microlabis*, lo que lleva a Cariou et al. (1988), a proponer que podría ser la configuración del linaje ancestral de las especies del grupo *obscura*. Por tanto, se trataría de un carácter plesiomórfico (ancestral) que no tendría validez para determinar las relaciones de los subgrupos o linajes. Se requerirán, por tanto, ulteriores estudios de las relaciones entre las especies del linaje *bifasciata* y las especies de los restantes subgrupos, para determinar si se trata de un nuevo subgrupo o no.

Finalmente, sería de gran interés determinar las relaciones entre poblaciones de *D. bifasciata* de su amplísima área de distribución (desde Europa al extremo Oriente) y las especies endémicas de Japón (*D. imaii*, y las menos estudiadas *D. tsukubaensis* y *D. eniwae*) y de Escandinavia (*D. eskoi*).

#### **Incertae sedis.**

*D. alpina* y *D. helvetica*, especies paleárticas de amplia distribución (desde Europa hasta Japón), fueron clásicamente asignadas a los subgrupos *obscura* y *affinis*, respectivamente (Buzzati-Traverso y Scossioli, 1955). Sin embargo, los análisis del polimorfismo enzimático de ambas

especies (Lakovaara et al., 1976) y de *D. helvetica* (Loukas et al., 1984 y Cariou et al., 1988), las sitúan en linajes propios, tan distantes de sus subgrupos, como de los representantes de los otros subgrupos (incluso del *microlabis*). Tampoco la configuración de los cromosomas en metafase, ni ningún otro tipo de características permite agruparlas en alguno de los subgrupos.

Por tanto, deberían analizarse con más profundidad las relaciones entre estas especies y las restantes del grupo *obscura*, para confirmar si son representantes de linajes propios o no y, en su caso, asignarlas a nuevos subgrupos, el *helvetica* y el *alpina*.

Por todo lo expuesto en este apartado, proponemos una nueva clasificación del grupo *obscura* (Tabla 24) diferente de la propuesta hasta la actualidad (Tabla 1 página 12).

#### **4. RECONSTRUCCION HISTORICA DE LA EVOLUCION DEL GRUPO *obscura*.**

La reconstrucción de la historia evolutiva de un grupo de organismos debería estar basada en un completo conocimiento del proceso evolutivo, tanto de los mecanismos evolutivos implicados en la transmisión genética, como del proceso histórico de la descendencia (contexto espacial y temporal). Dada la complejidad de los mecanismos implicados y el desconocimiento de muchos de sus aspectos, no queda otro remedio que recurrir a modelos evolutivos hipotéticos para inferir las relaciones filogenéticas entre organismos.

Una cuestión diferente es introducir el proceso evolutivo en el marco espacio-temporal en el que aconteció, ya que para ello se dispone del registro fósil. Sin embargo, la mayoría de las veces el registro fósil es incompleto, o se carece de él. En estos casos se debe recurrir a otro tipo de aproximaciones para determinar los tiempos de divergencia, como por ejemplo, biogeográficas, paleoclimáticas, geológicas, etc.

Desafortunadamente, muy pocos son los especímenes fósiles de drosófilidos conocidos. Los primeros fueron descubiertos en ámbar del

**Tabla 24.** Nueva proupuesta en la relación de especies del grupo *obscura*.

**Género:** *Drosophila* **Subgénero:** *Sophophora* **Grupo:** *obscura*.

**Subgrupo *affinis*:**

Especies neárticas:

- D. affinis* Sturtevant, 1916.
- D. algonquin* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.
- D. athabasca* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.
- D. azteca* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.
- D. dobzhanskii* Patterson, 1943.
- D. narragansett* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.
- D. novitskii* Sulerud et Miller, 1966.
- D. seminole* Sturtevant et Dobzhansky, 1936.
- D. tolteca* Patterson et Mainland, 1944.

**Subgrupo *microlabis*:**

Especies etiópicas:

- D. cariouae* Tsacas et al., 1985.
- D. kitumensis* Tsacas et al., 1985.
- D. kimbasi* Tsacas et al., 1985.
- D. microlabis* (Séguy), 1938.

**Subgrupo *obscura*:**

Especies paleárticas:

Complejo *obscura*:

- D. ambigua* Pomini, 1940.
- D. obscura* Fallèn, 1823.
- D. subsilvestris* (Basden), 1954.
- D. tristis* (Fallèn), 1823.

Complejo (posible subgrupo) *bifasciata*:

- D. bifasciata* Pomini, 1940.
- D. eskoi* Lakovaara et Lankinen, 1974.
- D. imaii* Moriwaki et al., 1967.

Posición incierta en el subgrupo:

- D. eniuae* Takada et al., 1979.
- D. epiobscura* Parshad et Duggal, 1966.
- D. tsukubaensis* Takamori et Okada, 1983.

**Subgrupo *pseudoobscura*:**

Especies neárticas:

- D. cuauhtemoci* Felix et al., 1976.
- D. frolovae* Wheeler, 1949.
- D. lowei* Heed et al., 1969.
- D. miranda* Dobzhansky, 1935.
- D. persimilis* Dobzhansky et Epling, 1944.
- D. pseudoobscura* Frolova et Astaurov, 1929.

**Subgrupo *subobscura*:**

Especies paleárticas:

- D. guanche* Monclús, 1976.
- D. madeirensis* Monclús, 1984.
- D. subobscura* Collin, 1936.

***Incertae sedis*:**

Posible subgrupo *helvetica*:

- D. helvetica* Burla, 1948.

Posible subgrupo *alpina*:

- D. alpina* Burla, 1948.

Eoceno y del Oligoceno, pero corresponden a géneros extintos. Recientemente, se han descubierto nuevos fósiles en el ámbar del Mioceno (hace unos 25 Ma) de la República Dominicana (Grimaldi, 1987), que incluyen especies pertenecientes a géneros actuales (*Chymomyza*, *Drosophila*, *Hirtodrosophila* y *Scaptomyza*) y extintos (*Miomya* y *Protochymomyza*).

Por tanto, debemos recurrir a los otros tipos de aproximaciones para estimar los tiempos de divergencia. En nuestro caso, como ya vimos en el apartado de Resultados, recurrimos a la conversión de las divergencias nucleotídicas en tiempo mediante el método de Hasegawa et al. (1985), a partir de las estimas de los tiempos de divergencia entre alguno de los pares de especies analizados. En concreto, utilizamos el tiempo de divergencia de los subgrupos *melanogaster* y *obscura*, cifrado en unos 35 Ma, según las estimas de Throckmorton (1975), basadas en el registro fósil y en consideraciones biogeográficas, y las de Beverley y Wilson (1984), basadas en distancias inmunológicas. Veamos si las estimas obtenidas de tiempo se corresponden con los eventos que pudieron acontecer a lo largo de la historia evolutiva del grupo según la información disponible a partir de los datos biogeográficos, paleoclimáticos, geológicos, etc. y con las reconstrucciones postuladas por otros autores.

El grupo *obscura* pertenece, junto con otros seis grupos, al subgénero *Sophophora*, que, según Throckmorton, protagonizó una de las sucesivas radiaciones evolutivas que generaron la multitud de especies de *Drosophila*. No obstante, hay que señalar que las propuestas de Throckmorton sobre la generación de las especies de *Drosophila* en radiaciones y el carácter polifilético del género *Drosophila* han sido ampliamente rebatidas (Grimaldi, 1990; DeSalle y Grimaldi, 1991; DeSalle, 1992; Pélandakis et al., 1991). Pero aunque la relación del subgénero *Sophophora* con otros subgéneros y géneros ha sido reconsiderada, éste se mantiene como subgénero del género *Drosophila*.

De los tres linajes principales del subgénero *Sophophora*: *saltans-willistoni*, *melanogaster* y *obscura*, los dos últimos parecen ser los más relacionados. Y aunque se ha propuesto que los tres linajes puedan formar una tricotomía (DeSalle, 1992), también se ha propuesto que el linaje *saltans-willistoni* no forme parte del subgénero *Sophophora* (Pélandakis et al., 1991).

Throckmorton (1975) propuso que los grupos *melanogaster* y *obscura* se originaron a partir de un linaje "protomelanogaster" que habitaba los trópicos del Viejo Mundo durante el Oligoceno medio (30 a 34 millones de años). Pero, curiosamente, la reconstrucción filogenética obtenida por Pélendakis et al. (1991) a partir de secuencias del lrRNA nuclear, sitúa al subgrupo *obscura* entre los subgrupos del grupo *melanogaster*, en concreto junto al subgrupo *ananassae*.

Lakovaara y Saura (1982) proponen que el origen del grupo *obscura* pudo ser africano, en función de la similitud entre los largos peines sexuales de varias especies del grupo *melanogaster* y los que posee *D. alpina*, especie cuya posición en sus reconstrucción filogenética (Lakovaara et al. 1976) sugiere pueda tratarse del nexo entre los dos grupos. Otra prueba adicional del origen africano, según ellos, es la presencia de especies del grupo en Africa (subgrupo *microlabis*), que podrían ser reliquias de ese pasado africano del grupo, aunque no se pueda descartar una posible colonización posterior en un periodo climático favorable (Lakovaara y Saura, 1982).

Por último, Lakovaara y Saura (1982) también señalan que el hecho de que *D. subobscura* y *D. melanogaster* (especie cosmopolita oriunda de Africa) posean un cromosoma X acrocéntrico, considerado ancestral por Patterson y Stone (1952), también podría indicar el origen africano del grupo. Añaden, además, que si se confirmara que *D. microlabis* posee el mismo tipo de cromosoma, se reforzaría la hipótesis. Hay que considerar que en 1982, sólo se conocía *D. microlabis* a través del espécimen del Museo de Historia Natural de Paris capturado por Séguy en 1938.

Desafortunadamente, las especies africanas del subgrupo *microlabis* poseen un cromosoma X metacéntrico, lo que llevó a Cariou et al. (1988) a considerar como origen del grupo *obscura* la región Oriental (Sur y Sudeste de Asia), en función del origen propuesto para el grupo *obscura*, y respaldándose en la similitud de cariotipos y la proximidad filogenética entre las especies del subgrupo *microlabis* y los complejos *obscura* y *bifasciata* del subgrupo *obscura*. Según estos autores, a partir de la región Oriental los antepasados del grupo *obscura* pudieron haber colonizado el este de Africa y la región Paleártica (Europa y Asia), y a partir de ahí la región Neártica.



Según nuestras estimas de tiempos, los distintos linajes del grupo *obscura* se originaron hace 22 a 25 Ma, lo que concuerda con las sugerencias de Throckmorton (1975) de que la diversificación del grupo tuvo lugar durante el Mioceno (hace 20 a 25 Ma) en la subregión Paleártica. Los análisis del polen (Barnosky, 1987) demuestran que a partir de esa época, en la subregión Paleártica hubo una sustitución del bosque subtropical por el bosque mesófilo caducifolio, que se expandió por toda la región Holártica. Esta situación pudo favorecer la expansión de los ancestros orientales del grupo *obscura* hacia la subregión Paleártica y hacia el Africa Oriental, apareciendo en un corto periodo de tiempo los diferentes linajes del grupo (hipótesis de la radiación filética rápida). En Africa oriental surgirían las especies del subgrupo *microlabis*, que posteriormente con la regresión del bosque caducifolio, quedarían confinadas en los bosques de *Podocarpus* de las zonas de altitud superior a 2000 metros de la región del "Rift Valley". En la región Paleártica, surgirían los restantes linajes: el del subgrupo *subobscura*, el o los del subgrupo *obscura* (*bifasciata* y *obscura*), y los de los subgrupos *affinis* y *pseudoobscura*. Los mismos estudios del polen demuestran que, durante el Mioceno tardío (hace unos 12-8 Ma), la flora dominante ya era el bosque mesófilo mixto de coníferas y especies caducifolias, y el clima era semejante al actual, lo que puede explicar el éxito evolutivo de las especies del grupo *obscura* adaptadas a este ambiente.

Lakovaara y Saura (1982) proponen que durante la aparición del grupo *obscura*, y como consecuencia de su adaptación a la zona templada Paleártica, surgieron tres linajes, el *subobscura* que conserva el, según ellos, "primitivo" cromosoma X acrocéntrico (hoy rebatido), y dos linajes con cromosoma X metacéntrico, el linaje *D. alpina* que retiene caracteres arcaicos y el linaje que estos autores llaman "protobifasciata" (debido a que consideran que la *D. bifasciata* europea mantiene características ancestrales). De este último linaje surgirían el resto de especies paleárticas del subgrupo.

Cariou et al. (1988), por su parte, sugieren que sea el linaje *obscura-ambigua-tristis* el ancestral, por su relación, según su análisis filogenético, con las especies del subgrupo *pseudoobscura* y con las del subgrupo *microlabis*. Aunque tampoco descartan a *D. bifasciata* y *D. helvetica* por su amplia distribución, y por haber sido consideradas especies próximas

al posible antepasado del linaje del subgrupo *affinis* (Lakovaara y Saura, 1982).

Otro de los puntos controvertidos de la historia evolutiva del grupo, es el posible origen de las especies de los subgrupos *pseudoobscura* y *affinis* a partir de un mismo linaje o a partir de linajes distintos. Throckmorton no se pronuncia, tal como señala en su revisión de 1975, en la pág. 438: "bien antes de la llegada al Nuevo Mundo, o bien poco después, existían dos tipos principales". También Lakovaara y Saura (1982) son ambiguos, primero respaldan el origen común (pág. 7): "Las formas americanas menos estudiadas *D. lowei*, *D. cuauhtemoci* y *D. frolovae*, constituyen un complejo de especies -del subgrupo *pseudoobscura*- que, según sus descripciones originales, muestran similitudes con las especies del subgrupo *affinis*". Poco después sugieren el origen a partir de distintos linajes (pág. 48): "El subgrupo *affinis* puede haberse originado en el Viejo Mundo..." y "Estas especies montanas y del sur -refiriéndose a *D. lowei*, *D. frolovae* y *D. cuauhtemoci*, especies del subgrupo *pseudoobscura*- pueden ser reliquias de una temprana invasión del Nuevo Mundo desde Asia...". Por su parte, Goddard et al. (1990) sí que sostienen la mayor relación entre las especies de ambos subgrupos, proponiendo su origen a partir de un mismo linaje.

Contrariamente, nuestras reconstrucciones filogenéticas no respaldan, en absoluto, el origen común de los dos subgrupos a partir de un único antepasado colonizador de la región Neártica. Tanto si consideramos la sugerencia de Throckmorton de que las especies del grupo *obscura* colonizaron el Nuevo Mundo a través de la Beringia durante la expansión del bosque templado caducifolio en el Mioceno tardío (hace 15-8 Ma), época de progresivo enfriamiento en la que el bosque subtropical dio paso al bosque templado caducifolio, comprobado también con estudios del polen en la región de las Montañas Rocosas (Barnosky, 1987), como si consideramos que la invasión tuvo lugar durante el Pleistoceno (hace 3 Ma), cuando la ruta del estrecho de Bering y las islas Aleutianas estaba abierta por efecto de las glaciaciones, tal como sugieren Goddard et al. (1990) a partir de Gressitt (1963), los linajes de los subgrupos *affinis* y *pseudoobscura* ya se habían formado según nuestras estimas de tiempos de divergencia (hace 22-25 Ma).

Según Lakovaara y Saura (1982), *D. helvética* puede provenir directamente del antepasado "protoaffinis" que habitó el Paleártico antes de

la colonización del Nuevo Mundo, de ahí su amplia distribución en la subregión paleártica, aunque tampoco descartan a las especies asiáticas del complejo *bifasciata* como próximas al antepasado "protoaffinis".

Throckmorton (1975) sugiere, a partir de los datos de distribución geográfica, que los dos subgrupos colonizadores del Nuevo Mundo ocuparon, en principio, la zona oeste del subcontinente, aislada orográfica y climatológicamente de la zona este. Probablemente, y según los datos del polimorfismo cromosómico, el antepasado "protoaffinis" sería una especie próxima a la raza oriental A de *D. athabasca* y al par *D. azteca-D. tolteca*, que en la zona oeste daría a estas dos últimas especies (en el caso de *D. azteca* hace unos 5 ó 6 Ma según nuestras estimas) y en la colonización de la zona este daría lugar a *D. athabasca* oriental A. Durante los periodos glaciales sufridos en el Pleistoceno (últimos 2 millones de años), posiblemente quedaron aisladas las dos ramas del subgrupo, en la rama oeste aparecería, a partir de *D. athabasca* oriental A, la raza noroccidental, y en la rama este las especies *D. algonquin* y *D. affinis* (hace unos 800 mil años) y la raza oriental B. Tras la retirada del glaciar central norteamericano, *D. athabasca* sería la única especie que colonizó las grandes praderas que se desarrollaron en el periodo posterior a las glaciaciones, entrando en contacto de nuevo las tres razas (Throckmorton, 1975; Lakovaara y Saura, 1982).

Por su parte, el subgrupo *pseudoobscura* quedó restringido en la zona oeste. Ciertas especies del subgrupo (*D. lowei*, *D. frolovae*, *D. cuauhtemoci*), actualmente aisladas en pequeñas áreas, podrían ser reliquias de las especies ancestrales del subgrupo (Lakovaara y Saura, 1982).

El origen de las especies *D. pseudoobscura*, *D. persimilis* y *D. miranda* es relativamente reciente. Así, según nuestros datos la divergencia entre *D. miranda* y el par *D. pseudoobscura-D. persimilis* ocurrió durante el inicio del Plioceno (hace unos 7.5 Ma según nuestras estimas), y *D. pseudoobscura bogotana* y *D. persimilis* divergieron en el Pleistoceno (los últimos 2-2.5 millones de años según nuestras estimas), época de los grandes cambios climáticos. Estos datos son congruentes con la correlación entre las glaciaciones del Pleistoceno (hace entre 20 mil años y 2 Ma) y los procesos de especiación acontecidos en regiones temporalmente aisladas postulados por Dobzhansky y Powell (1975).

## **Conclusiones**

1. El análisis de restricción del genoma mitocondrial no es un buen método para la resolución de las relaciones filogenéticas entre especies de *Drosophila* divergentes debido a la dinámica evolutiva propia del genoma mitocondrial. Cuando la divergencia entre las especies analizadas es grande, las restricciones funcionales (mayor frecuencia de sustituciones silenciosas que reemplazantes), la mayor tasa de transiciones que transversiones y el mantenimiento del alto contenido en A+T, favorecen la reversión de las pérdidas o ganancias de sitios de restricción por sustitución nucleotídica, dando lugar a un gran número de homoplasias que dificultan la resolución de las relaciones filogenéticas.
2. En el análisis filogenético basado en secuencias del genoma mitocondrial, los efectos de la dinámica evolutiva pueden ser, en parte, corregidos al utilizar métodos filogenéticos que permiten eliminar algunas de las causas de homoplasias, como por ejemplo la utilización de parsimonia de transversión.
3. En el análisis de las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *obscura*, nos encontramos en la zona de divergencia donde el efecto de saturación de sustituciones, debido al mantenimiento de la riqueza en A+T, comienza a afectar a la reconstrucción filogenética, tal como se observa al aplicar el método de parsimonia evolutiva de Lake.
4. Las reconstrucciones filogenéticas basadas en distancias, determinadas a partir de diferentes regiones del genoma, pueden verse afectadas por la diferencia de tasas de divergencia entre regiones. Sin embargo, en el caso del grupo *obscura*, los árboles obtenidos para cada región funcional son similares a los obtenidos utilizando la totalidad de secuencias, y las diferencias podrían deberse a los errores de las estimas de divergencias obtenidas a partir de cortas secuencias (menos de 300-350 pares de bases).
5. Todas las reconstrucciones filogenéticas basadas en distintos métodos, cuya fiabilidad fué contrastada, proponen semejantes relaciones evolutivas entre las especies del grupo *obscura*. Así, se muestra el carácter monofilético de los subgrupos *affinis* y *pseudoobscura*, formados por un único linaje, y el carácter polifilético del subgrupo

*obscura*, formado, por al menos, dos linajes. Sin embargo, las relaciones entre los linajes son inciertas.

6. Se podría pensar que la imposibilidad de resolución de las relaciones entre las especies representantes de los diferentes subgrupos y linajes del grupo *obscura* es debida a la disponibilidad de un número insuficiente de sitios informativos a causa del efecto de saturación. Sin embargo, la aplicación de métodos filogenéticos que nos permitieron corregir, en parte, la saturación, como la parsimonia de transversión, o el método máximo-verosímil de Hasegawa y colaboradores, la presencia en las reconstrucciones filogenéticas de ramas internodales cortas, y los valores de divergencia semejantes entre las especies de los distintos linajes, respaldan la hipótesis de una rápida aparición y radiación filética del grupo *obscura*.
7. La hipótesis de la rápida radiación filética del grupo *obscura* explica las incertidumbres y las discrepancias entre las reconstrucciones filogenéticas realizadas hasta el momento, en las que se utilizaron otros tipos de aproximaciones, como el análisis del polimorfismo enzimático, cromosómico, datos de hibridación DNA-DNA, etc.
8. La radiación de los distintos linajes del grupo *obscura* debió tener lugar hace unos 25 millones de años, según las estimas de tiempos de divergencia obtenidas mediante el método de Hasegawa y colaboradores.
9. La radiación filética rápida de los distintos linajes del grupo *obscura*, varios de ellos pertenecientes al heterogéneo subgrupo *obscura*, nos lleva a proponer la revisión de la clasificación del grupo. Se propone dividir el grupo *obscura* en, al menos, cinco subgrupos, al excindir en dos el antiguo subgrupo *obscura*. El nuevo subgrupo, *subobscura*, estaría formado por las especies *D. subobscura*, *D. madeirensis* y *D. guanche*. Tampoco se descarta la posibilidad de considerar a *D. bifasciata* y especies relacionadas como miembros de un sexto subgrupo, el *bifasciata*.

## **Bibliografía**

- AFONSO, J.M., J. PESTANO, and M. HERNANDEZ. 1988. Rapid isolation of mitochondrial DNA from *Drosophila* adults. *Biochem. Genet.* **26**:381-386.
- AFONSO, J.M., A. VOLZ, M. HERNANDEZ, H. RUTTKAY, A.M. GONZALEZ, J.M. LARRUGA, V.M. CABRERA, and D. SPERLICH. 1990. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in Old-World population of *Drosophila subobscura*. *Mol. Biol. Evol.* **7**:123-142.
- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr.* **AC-19**:716-723.
- ANDERSON, S., A.T. BANKIER, G.T. BARRELL, M.H.L. deBRUIJN, A.R. COULSON, J. DROUIN, I.C. EPERON, D.P. NIERLICH, B.A. ROE, F. SANGER, P.H. SCHREIER, A.J.H. SMITH, R. STADEN, and I.G. YOUNG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**:457-465.
- ANDERSON, S., M.H.L. deBRUIJN, A.R. COULSON, I.C. EPERON, F. SANGER, and I.G. YOUNG. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* **156**:683-717.
- AQUADRO, C.F. and B.D. GREEMBERG. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* **103**:287-312.
- AQUADRO, C.F., N. KAPLAN, and K.J. RISKO. 1984. An analysis of the dynamics of mammalian mitochondrial DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **1**:423-434.
- ATTARDI, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. En "Genome evolution in procaryotes and eucaryotes", Ed. D.C. Reamey. *Int. Rev. Cytol.* **93**.
- AVISE, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **312**:325-342.
- AVISE, J.C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* **43**:1192-1208.
- AVISE, J.C. 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Genet.* **25**:45-69.
- AYALA, F.J. and T. DOBZHANSKY. 1974. A new subspecies of *D. pseudoobscura* (Diptera: Drosophilidae). *The Pan-Pacific Entomologist* **50**:211-219.



- AYALA, F.J. and J.R. POWELL. 1972. Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. Proc. Natl Acad. Sci. USA **69**:1094-1096.
- BACHMANN, L., M. RAAB, and D. SPERLICH. 1989. Satellite DNA and speciation: a species specific satellite DNA of *Drosophila guanche*. Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch **27**:84-93.
- BAKER, C.S., S.R. PALUMBI, R.H. LAMBERTSEN, M.T. WEINRICH, J. CALAMBOKIDIS, and S.J. O'BRIEN. 1990. Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. Nature **344**:238-240.
- BARNES, W.M. 1987. Sequencing DNA with dideoxyribonucleotides as chain terminators: hints and strategies for big projects. En "Guide to molecular cloning techniques. Methods in Enzymology vol. 152" pag. 538-556. Editado por S.L. Berger y A. R. Kimmel. Academic Press, San Diego.
- BARNOSKY, C.W. 1987. Response of vegetation to climatic changes of different duration in the later Neogene. Trends Ecol. Evol. **2**:247-250.
- BARRIO, E., C. BUADES Y A. MOYA. 1992c. Geometría estadística en los espacios de distancia y secuencia: dos aplicaciones. Qüestió **16**:1-10.
- BARRIO, E., A. LATORRE, A. MOYA, and F.J. AYALA. 1992a. Phylogenetic reconstruction of the *Drosophila obscura* group based on mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. **9**:
- BARRIO, E., A. LATORRE, A. MOYA, and A. FONTDEVILA. 1992b. Mitochondrial DNA evolution of the *Drosophila mulleri* subgroup (*repleta* group) of species. Manuscrito en preparación.
- BARRIO, E., A. MOYA, M. PEREZ-ALONSO, and A. LATORRE. 1988. Functional role of the G-C sequences in the *Drosophila* mitochondrial DNA. Genet.(Life Sci. Adv.) **7**:149-153.
- BECKENBACH, A.T. and A. PREVOSTI. 1986. Colonization of North America by the European species, *Drosophila subobscura* and *D. ambigua*. Am. Midl. Natur. **115**:10-18.
- BEVERLEY, S.M., and A.C. WILSON. 1984. Molecular evolution in *Drosophila* and the higher Diptera: II. A time scale for fly evolution. J. Mol. Evol. **21**:1-13.
- BIBB, M.J., R.A. VAN ETTEN, C.T. WRIGHT, M.W. WALBERG, and D.A. CLAYTON. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. Cell **26**:167-180.

- BIRLEY, A.J. and J.H. CROFT. 1986. Mitochondrial DNAs and phylogenetic relationships. En "DNA Systematics" Pag. 107-137 editado por S.K. Dutta. CRC, Boca Ratón.
- BOUDREAUX, H.D. 1979. Arthropod phylogeny, with special reference to insects. Wiley, New York.
- BROWN, W.M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3605-3609.
- BROWN, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. En "Molecular Evolutionary Genetics" Pag. 95-139. Editado por R.J. McINTYRE. Plenum Press, London.
- BROWN, W.M., E.M. PRAGER, A. WANG, and A.C. WILSON. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. J. Mol. Evol. 18:225-239.
- BRNCIC, D., A. PREVOSTI, M. BUDNIK, M. MONCLUS, and J. OCAÑA. 1981. Colonization of *Drosophila subobscura* in Chile. I. First population and cytogenetic studies. Genetica 56:3-9.
- BURLA, H. 1951. Systematik, Verbreitung und Oekologie der *Drosophila* Arten der Schweiz. Rev. Suisse Zool. 58:23-175.
- BUZZATI-TRAVERSO, A., and R.E. SCOSSIROLI. 1955. The *obscura* group of the genus *Drosophila*. Adv. Genet. 7:47-92.
- CABRERA, V.M., A.M. GONZALEZ, J.M. LARRUGA, and A. GULLON. 1983. Genetic distance and evolutionary relationships in the *Drosophila obscura* group. Evolution 37:675-689.
- CACCONI, A., G.D. AMATO, and J.R. POWELL. 1988. Rates and patterns of scnDNA and mtDNA divergence within the *Drosophila melanogaster* subgroup. Genetics 118:671-683.
- CAMIN, J.M., and R.R. SOKAL. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. Evolution 19:311-326.
- CANN, R.L., M. STONEKING, and A.C. WILSON. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature 325:31-36.
- CANTATORE, P., M. ROBERTI, G. RAINALDI, M.N. GADALETA, and C. SACCONI. 1989. The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus*. J. Biol. Chem. 264:10965-10975.
- CARIOU, M.L., D. LACHAISE, L. TSACAS, J. SOURDIS, C. KRIMBAS, and M. ASHBURNER. 1988. New African species in the *Drosophila*

- obscura* species group: genetic variation, differentiation and evolution. *Heredity* 61:73-84.
- CLARY, D.O., and D.R. WOLSTENHOLME. 1985a. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22:252-271.
- CLARY, D.O., and D.R. WOLSTENHOLME. 1985b. The ribosomal genes of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Nucl. Acids Res.* 13:4029-4045.
- CLARY, D.O., J.M. GODDARD, S.C. MARTIN, C.M.-R. FAURON, and D.R. WOLSTENHOLME. 1982. *Drosophila* mitochondrial DNA: a novel new order. *Nucl. Acids Res.* 10:6619-6637.
- CLARY, D.O., J.A. WAHLEITHNER, and D.R. WOLSTENHOLME. 1983. Transfer RNA genes in *Drosophila* mitochondrial DNA: related 5' flanking sequences and comparisons to mammalian mitochondrial tRNA genes. *Nucl. Acids Res.* 11:2411-2425.
- CLAYTON, D.A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28:693-705.
- CLAYTON, D.A. 1984. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Ann. Rev. Biochem.* 53:573-594.
- De BRUIJN, M.H.L. 1983. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA, a novel organization and genetic code. *Nature* 304:234-241.
- DeBRY, R.W. and N.A. SLADE. 1985. Cladistic analysis of restriction endonuclease cleavage maps within a maximum-likelihood framework. *Syst. Zool.* 34:21-34.
- DENSMORE, L.D., J.W. WRIGHT, and W.M. BROWN. 1985. Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (genus *Cnemidophorus*). *Genetics* 110:689-707.
- DeSALLE, R. 1992. The phylogenetic relationships of flies in the family *Drosophilidae* deduced from mtDNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 1:31-40.
- DeSALLE, R., T. FREEDMAN, E.M. PRAGER, and A.C. WILSON. 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 26:157-164.
- DeSALLE, R., and L.V. GIDDINGS. 1986. Discordance of nuclear and mitochondrial DNA phylogenies in Hawaiian *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6902-6906.

- DeSALLE, R., and D.A. GRIMALDI. 1991. Morphological and Molecular Systematics of the *Drosophilidae*. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **22**:447-475.
- DeSALLE, R., and A.R. TEMPLETON. 1988. Founder effects and the rate of mitochondrial DNA evolution in Hawaiian *Drosophila*. *Evolution* **42**:1076-1084.
- DESJARDINS, P. and R. MORAIS. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* **212**:599-634.
- DI RIENZO, A. and A.C. WILSON. 1991. Branching patterns in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:1597-1601.
- DOBZHANSKY, Th., and P. KOLLER. 1938. An experimental study of sexual isolation in *Drosophila*. *Biol. Zbl.* **58**:589-607.
- DOBZHANSKY, Th., and J.R. POWELL. 1975. *Drosophila pseudoobscura* and its American relatives, *Drosophila persimilis* and *Drosophila miranda*. En "Handbook of Genetics, Vol. 3: Invertebrates of genetic interest" Pag. 537-587. Editado por R.C. KING. Plenum Press, N.Y.
- EASTEAL, S. and J.G. OAKESHOTT. 1985. Estimating divergence times of *Drosophila* species from DNA sequence comparisons. *Mol. Biol. Evol.* **2**:87-91.
- EIGEN, M. and R. WINKLER-OSWATITSCH. 1990. Statistical geometry on sequence space. En "Molecular Evolution: Computer analysis of proteins and nucleic acid sequences. Methods in Enzymology vol. 183 pag. 505-530". Editado por R.F. Doolittle. Academic Press, San Diego.
- EISENBERG, D., E. SCHWARZ, M. ROMASOMY, and R. WALL. 1984. *J. Mol. Biol.* **179**: 125-142.
- ELENA, S.F., F. GONZALEZ-CANDELAS, and A. MOYA. 1992. Does the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus behave as a molecular clock?. *J. Mol. Evol.* **35**:in press.
- FALLÉN, C.F. 1823. *Diptera Sveciae* 2. *Geomyzides* 1-8. *Litteris Berlingianis*, Lund.
- FARRIS, J.S. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.* **19**:83-92.
- FARRIS, J.S. 1977. Phylogenetic analysis under Dollo's law. *Syst. Zool.* **26**:77-88.

- FELGER, I. and W. PINSKER. 1987. Histone gene transposition in the phylogeny of the *Drosophila obscura* group. *Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.* **25**:127-140.
- FELSENSTEIN, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368-376.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- FELSTENSTEIN, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Ann. Rev. Genet.* **22**:521-565.
- FELSTENSTEIN, J. 1990. PHYLIP Manual. Version 3.3. University Herbarium of the University of California, Berkeley.
- FERRIS, S.D., R.D. SAGE, C.-M. HUANG, J.T. NIELSEN, U. RITTE, and A.C. WILSON. 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:2290-2294.
- FITCH, W.M., and E. MARGOLIASH. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* **155**:279-284.
- GADALETA, G., G. PEPE, G. DeCANDIA, C. QUAGLIARIELLO, E. SBISA, and C. SACCONI. 1989. The complete nucleotide sequence of the *Rattus norvegicus* mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J. Mol. Evol.* **28**:497-516.
- GARESSE, R. 1988. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics* **118**:649-663.
- GODDARD, K., A. CACCONE, and J.R. POWELL. 1990. Evolutionary implications of DNA divergence in the *Drosophila obscura* group. *Evolution* **44**:1656-1670.
- GOJOBORI, T., K. ISHII, and M. NEI. 1982. Estimation of average number of nucleotide substitutions when the rate of substitution varies with nucleotide. *J. Mol. Evol.* **18**:414-423.
- GOJOBORI, T., E.N. MORIYAMA, and M. KIMURA. 1990. Statistical methods for estimating sequence divergence. En "Molecular Evolution: Computer analysis of proteins and nucleic acid sequences. *Methods in Enzymology* vol. 183 pag. 531-550". Editado por R.F. Doolittle. Academic Press, San Diego.
- GONZALEZ, A.M., M. HERNANDEZ, A. VOLZ, J. PESTANO, J.M. LARRUGA, D. SPERLICH, and V.M. CABRERA. 1990. Mitochondrial DNA evolution in the *obscura* species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* **31**:122-131.

- GRESSIT, J.L. 1963. Pacific basin biogeography, Tenth Pacific Science Congress, Honolulu, Hawaii. Bishop Museum Press.
- GRIMALDI, D.A. 1987. Amber fossil Drosophilidae (Diptera) with particular reference to the Hispaniolan taxa. *Am. Mus. Novitates* 2880:1-23.
- GRIMALDI, D.A. 1990. A phylogenetic, revised classification of the genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 197:1-139.
- HALE, L.R., A.T. BECKENBACH. 1985. Mitochondrial DNA variation in *Drosophila pseudoobscura* and related species in Pacific Northwest populations. *Can. J. Genet. Cytol.* 27:357-364.
- HARRISON, R.G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4:6-11.
- HASEGAWA, M., H. KISHINO and T. YANO. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22:160-174.
- HEDGES, S.B. 1992. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol. Biol. Evol.* 9:366-369.
- HEED, W.B., D.W. CRUMPACKER, and L. EHRMAN. 1969. *Drosophila lowei*, a new American member of the *obscura* species group. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 62:388-393.
- HENDY and PENNY. 1989. A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Syst. Zool.* 38:310-321.
- HIGGINS, D.G., and P.M. SHARP. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73:237-244.
- HIGGINS, D.G., and P.M. SHARP. 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* 5(2):151-153.
- HOLMQUIST, R. 1983. Transitions and transversions in evolutionary descent: an approach to understanding. *J. Mol. Evol.* 19:134-144.
- HOLMQUIST, R., M.M. MIYAMOTO and M. GOODMAN. 1988. Higher-primate phylogeny: why can't we decide? *Mol. Biol. Evol.* 5:201-216.
- HOWELL, N., K. GILBERT. 1988. Mutational analysis of the mouse mitochondrial cytochrome b gene. *J. Mol. Biol.* 203:607-618.
- HSUCHEN, C.C., R.M. KOTIN, and D.T. DUBIN. 1984. Sequences of the coding and flanking regions of the large ribosomal subunit RNA gene of mosquito mitochondria. *Nucl. Acids Res.* 12:7771-7785.

- HUBBY, J.L. and R.C. LEWONTIN. 1966. A molecular approach to the study of heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54:577-594.
- HUBBY, J.L. and L.H. THROCKMORTON. 1965. Protein differences in *Drosophila*. II. Comparative species genetics and evolutionary problems. *Genetics* 52:203-215.
- JACOBS, H.T., D.J. ELLIOT, V.B. MATH, A. FARQUHARSON. 1988. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 202:185-217.
- JAEGER, J.A., D.H. TURNER, and M. ZUKER. 1990. Predicting optimal and suboptimal secondary structure for RNA. En "Molecular Evolution: Computer analysis of proteins and nucleic acid sequences. Methods in Enzymology vol. 183 pag. 281-306". Editado por R.F. Doolittle. Academic Press, San Diego.
- JOHANSEN, S., P.H. GUDDAL, and T. JOHANSEN. 1990. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucl. Acids Res.* 18:411-419.
- JUKES, T.H., and C.R. CANTOR. 1969. Evolution on protein molecules. En "Mammalian protein metabolism" pag. 71-123. Editado por N.H. Munro. Academic Press, New York.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- KISHINO, H. and M. HASEGAWA. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order of the *Hominoidea*. *J. Mol. Evol.* 29:170-179.
- KISHINO, H. and M. HASEGAWA. 1990. Converting distances to time: an application to human evolution. En "Molecular Evolution: Computer analysis of proteins and nucleic acid sequences. Methods in Enzymology vol. 183 pag. 550-570". Editado por R.F. Doolittle. Academic Press, San Diego.
- KLEIN, P., M. KANEHISA, and C. DELISI. 1983. *Biochim. Biophys. Acta* 815:468-476.
- KLUGE, A.G., and J.S. FARRIS. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurants. *Syst. Zool.* 18:1-32.

- KOCHER, T.D., W.K. THOMAS, A. MEYER, S.V. EDWARDS, S. PÄÄBO, F.X. VILLABLANCA, and A.C. WILSON. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:6196-6200.
- KRAUS, F. and M.M. MIYAMOTO. 1991. Rapid cladogenesis among the Pecoran ruminants: evidence from mitochondrial DNA sequences. *Syst. Zool.* 40:117-130.
- KRIMBAS, C.B. and M. LOUKAS. 1980. The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Evol. Biol.* 12:163-234.
- KRIMBAS, C.B. and M. LOUKAS. 1984. Evolution of the *obscura* group *Drosophila* species. I. Salivary chromosomes and quantitative characters in *D. subobscura* and two closely related species. *Heredity* 53:469-482.
- KRUSE, B., N. NARASINHAM, and G. ATTARDI. 1989. Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell* 52:811-819.
- LAKE, J.A. 1987. A rate-independent technique for analysis of nucleic acid sequence: evolutionary parsimony. *Mol. Biol. Evol.* 4:167-191.
- LAKOVAARA, S., A. SAURA, and C.T. FALK. 1972. Genetic distance and evolutionary relationships in the *Drosophila obscura* group. *Evolution* 26:177-184.
- LAKOVAARA, S., A. SAURA, P. LANKINEN, L. POHJOLA, and J. LOKKI. 1976. The use of isoenzymes in tracing evolution and in classifying *Drosophilidae*. *Zool. Scripta* 5:173-179.
- LAKOVAARA, S., and L. KERÄNEN. 1980. Phylogeny of the *Drosophila obscura* group. *Genetika* 12:157-172.
- LAKOVAARA, S., and A. SAURA. 1982. Evolution and speciation in the *Drosophila obscura* group. En "The genetics and biology of *Drosophila*" Vol. 3b Pag. 1-59. Editado por M. ASHBURNER, H.L. CARSON and J.N. THOMPSON. Academic Press, New York.
- LANAVE, C., G. PREPARATA, C. SACCONI, and G. SERIO. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20:86-93.
- LATORRE, A., A. MOYA, and F.J. AYALA. 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8649-8653.



- LATORRE, A., E. BARRIO, A. MOYA, and F.J. AYALA. 1988. Mitochondrial DNA evolution in the *Drosophila obscura* group. *Mol. Biol. Evol.* 5:717-728.
- LATORRE, A., C. HERNANDEZ, D. MARTINEZ, J.A. CASTRO, M. RAMON, and A. MOYA. 1992. Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of *Drosophila subobscura*. *Heredity* 68:15-24.
- LI, W.-H. and M. GOUY. 1990. Statistical tests of molecular phylogenies. En "Molecular Evolution: Computer analysis of proteins and nucleic acid sequences. *Methods in Enzymology* vol. 183 pag. 645-659". Editado por R.F. Doolittle. Academic Press, San Diego.
- LIU, H. and A.T. BECKEMBACH. 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol. Phyl. Evol.* 1:41-52.
- LOPEZ-BUENO, A. and F. GONZALEZ-CANDELAS. 1992. DISTANCE: a program for computing genetic distances from DNA sequences. CABIOS. Enviado
- LOUKAS, M., C.B. KRIMBAS, and V. VERGINI. 1984. Evolution of the *obscura* group *Drosophila* species. II. Phylogeny of ten species based on electrophoretic data. *Heredity* 53:483-493.
- MARFANY, G. and R. GONZALEZ-DUARTE. 1992. The *Drosophila subobscura Adh* Genomic region contains valuable evolutionary markers. *Mol. Biol. Evol.* 9:261-277.
- MARINKOVIC, D., F.J. AYALA, and M. ANDJELKOVIC. 1978. Genetic polymorphism and phylogeny of *Drosophila subobscura*. *Evolution* 32:164-173.
- MARTIN, A.P., B.D. KESSING and S.R. PALUMBI. 1990. Accuracy of estimating genetic distance between species from short sequences of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 7:485-488.
- MAYNARD-SMITH, J. 1989. Trees, bundles or nets?. *Trends Ecol. Evol.* 4:302-304.
- MIERENDORF, R.C., and D. PFEFFER. 1987. Direct sequencing of denatured plasmid DNA. En "Guide to molecular cloning techniques. *Methods in Enzymology* vol. 152" pag. 556-562. Editado por S.L. Berger y A. R. Kimmel. Academic Press, San Diego.
- MONFORTE, A., E. BARRIO, and A. LATORRE. 1991. La región control del DNA mitocondrial de metazoos. *Rev. Cièn. (IEB)* 8:17-24.

- MONFORTE, A., E. BARRIO, and A. LATORRE. 1992. Characterization of the length polymorphism in the A+T rich region of the *Drosophila obscura* group species. *J. Mol. Evol.*, en prensa.
- MONNEROT, M., M. SOLIGNAC and D.R. WOLSTENHOLME. 1990. Discrepancy in divergence of the mitochondrial and nuclear genomes of *Drosophila teissieri* and *Drosophila yakuba*.
- MORITZ, C., T.E. DOWLING, and W.M. BROWN. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292.
- MORIYAMA, E.N. and T. GOJOBORI. 1992. Rates of synonymous substitution and base composition of nuclear genes in *Drosophila*. *Genetics* 130:855-864.
- MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN, and H. ERLICH. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 51:263-273.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Press, New York.
- NEI, M., J.C. STEPHENS, and N. SAITOU. 1985. Methods for computing the standard errors for branching points in an evolutionary tree and their application to molecular data from humans and apes. *Mol. Biol. Evol.* 2:66-85.
- NEI, M. and F. TAJIMA. 1987. Problems arising in phylogenetic inference from restriction-site data. *Mol. Biol. Evol.* 4:320-323.
- NIEGEL, J.E., R.M. BALL jr., and J.C. AVISE. 1991. Estimation of single generation migration distances from geographic variation in animal mitochondrial DNA. *Evolution* 45:423-432.
- NIGRO, L., M. SOLIGNAC and P.M. SHARP. 1991. Mitochondrial DNA sequence divergence in the *melanogaster* and Oriental species subgroups of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 33:156-162.
- NOLLER, H.F. 1984. Structure of ribosomal RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 53:119-162.
- OKIMOTO, R., J.L. MACFARLANE, and D.R. WOLSTENHOLME. 1990. Evidence for the frequent use of TTG as the translation initiation codon of mitochondrial protein genes in the nematodes, *Ascaris suum* and *Coenorhabditis elegans*. *Nucl. Acids Res.* 18:6113-6118.

- PAMILO, P. and M. NEI. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Mol. Biol. Evol.* **5**:568-583.
- PATTERSON, J.T. and W.S. STONE. 1952. Evolution in the genus *Drosophila*. McMillan, New York.
- PÉLENDAKIS, M., D.G. HIGGINS, and M. SOLIGNAC. 1991. Molecular phylogeny of the subgenus *Sophophora* of *Drosophila* derived from large subunit of ribosomal sequences. *Genetica* **84**:87-94.
- PENNY, D. 1982. Towards a basis for classification: the incompleteness of distance measures, incompatibility analysis and phenetic classification. *J. Theor. Biol.* **96**:129-142.
- PINSKER, W. and J. BURUGA. 1982. Comparative study of allozyme variation in six species of the *Drosophila obscura* group. *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* **20**:53-63.
- POWELL, J.R. 1983. Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow: evidence from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:492-495.
- POWELL, J.R., A. CACCONE, G.D. AMATO, and C. YOON. 1986. Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:9090-9093.
- PREPARATA, G., and C. SACCONI. 1987. A simple quantitative model of the molecular clock. *J. Mol. Evol.* **26**:7-15.
- PREVOSTI, A., L. SERRA, and M. MONCLUS. 1983. *Drosophila subobscura* has been found in Argentina. *Dros. Inf. Serv.* **59**:103.
- RAND, D., and R. HARRISON. 1989. Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. *Genetics* **121**:551-569.
- RAO, S.T., and P. ARGOS. 1986. *Biochim. Biophys. Acta* **869**:197-214.
- ROE, B.A., D.P. MA, R.K. WILSON, J.F.H. WONG. 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* **260**:9759-9774.
- ROZAS, J., M. HERNANDEZ, V.M. CABRERA, and A. PREVOSTI. 1990. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: effect of the founder event on the mitochondrial DNA polymorphism. *Mol. Biol. Evol.* **7**:103-109.
- RUTTKAY, H., M. SOLIGNAC and D. SPERLICH. 1992. Nuclear and mitochondrial ribosomal RNA variability in the *obscura* group of *Drosophila*. *Gene*. In press.

- SACCONE, C., C. LANAVE, G. PESOLE, and G. PREPARATA. 1990. Influence of base composition on quantitative estimates of gene evolution. En "Molecular Evolution: Computer analysis of proteins and nucleic acid sequences". Methods in Enzymology vol. 183 pag. 570-583. Editado por R.F. Doolittle. Academic Press, San Diego.
- SAITOU, N. 1990. Maximum likelihood methods. En "Molecular Evolution: Computer analysis of proteins and nucleic acid sequences." Methods in Enzymology vol. 183 pag. 584-598. Editado por R.F. Doolittle. Academic Press, San Diego.
- SAITOU, N., and M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, and T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SATTA, Y., H. ISHIWA and S.I. CHIGUSA. 1987. Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. Mol. Biol. Evol. 4:638-650.
- SCHAEFFER, S.W., C.F. AQUADRO, and W.W. ANDERSON. 1987. Restriction map variation in the Alcohol Dehydrogenase region of *Drosophila pseudoobscura*. Mol. Biol. Evol. 4:254-265.
- SÉGUY, E. 1938. Mission scientifique de l'Omo. Diptera. I. Nematocera et Brachycera. Mém. Mus. Hist. Nat. Paris, N.S. 8:319-380.
- SHARP, P.M., and W.-H. LI. 1989. On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. J. Mol. Evol. 28:398-402.
- SIMON, C. 1991. Molecular systematics at the species boundary: exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animals via direct sequencing from amplified DNA. En "Molecular Techniques in Taxonomy" pag. 33-71. Editado por G.M. Hewitt et al. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- SIMON, C., A. FRANKE, and A. MARTIN. 1991. The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. En "Molecular Techniques in Taxonomy". Editado por G.M. Hewitt et al. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- SMITH, M.J., D.K. BANFIELD, K. DOTEVAL, S. GORSKI, and D.J. KOWBEL. 1990. Nucleotide sequence of nine protein-coding genes and 22 tRNAs in the mitochondrial DNA of the Sea Star *Pisaster ochraceus*. J. Mol. Evol. 31:195-204.

- SNEATH, P.H.A. and R.R. SOKAL. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- SOKAL, R.R. and C.D. MICHENER. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Sci. Bull. 28:1409-1438.
- SOLIGNAC, M., M. MONNEROT, and J.C. MOUNOLOU. 1986a. Mitochondrial DNA evolution in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. J. Mol. Evol. 23:31-40.
- SOLIGNAC, M., M. MONNEROT, and J.C. MOUNOLOU. 1986b. Concerted evolution of sequence repeats in *Drosophila* mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. 23:53-60.
- SOURDIS, J., and M. NEI. 1988. Relative efficiency of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. Mol. Biol. Evol. 5:298-311.
- SPOLSKY, C., and T. UZZELL. 1986. Evolutionary history of the hybridogenetic frog *Rana esculenta* as deduced from mtDNA analyses. Mol. Biol. Evol. 3:44-56.
- STURTEVANT, A.H. 1916. Notes on the North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. Ann. Entomol. Soc. Amer. 9:323-343.
- STURTEVANT, A.H. 1942. The classification of the genus *Drosophila* with description of nine new species. Univ. Texas Publ. 4213:5-51.
- SUDMAN, P.D. and M.S. HAFNER. 1992. Phylogenetic relationships among Middle American pocket gophers (genus *Orthogeomys*) based on mitochondrial DNA sequences. Mol. Phyl. Evol. 1:17-25.
- SWOFFORD, D.L. 1985. Phylogenetic analysis using parsimony (PAUP), version 2.4. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
- SWOFFORD, D.L., and G.J. OLSEN. 1990. Phylogenetic reconstruction. En "Molecular Systematics" pag. 411-501. Editado por D.M. Hillis and C. Moritz. Sinauer, Sunderland, Mass.
- TATENO, Y., M. NEI, and F. TAJIMA. 1982. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. I. distantly related species. J. Mol. Evol. 18:387-404.
- THROCKMORTON, L.H. 1975. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. En "Handbook of genetics. Vol.3: Invertebrates of genetic interest" Pag. 421-469. Editado por R.C. KING. Plenum Press, New York.

- TSACAS, L. 1974. *Drosophila matilei*, nouvelle espèce de l'Ouest Cameroun, du group *melanogaster*, et redescription de *D. microlabis* Séguy. Bull. Soc. Entomol. Fr. 79:146-151.
- TSACAS, L., M.L. CARIOU, and D. LACHAISE. 1985. Le groupe *Drosophila obscura* en Afrique de l'Est. Description de trois nouvelles espèces (*Diptera, Drosophilidae*). Anns. Soc. Entomol. Fr. 21:413-424.
- VALVERDE, J.R. 1992. Caracterización del genoma mitocondrial de *Artemia franciscana*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- VAWTER, L., and W.M. BROWN. 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. Science 234:194-196.
- VIGILANT, L., R. PENNINGTON, H. HARPENDING, T.D. KOCHER, and A.C. WILSON. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a Southern African population. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:9350-9354.
- WILSON, A.C., R.L. CANN, S.M. CARR, M. GEORGE, U.B. GYLLENSTEN, K.M. HELM-BYCHOWSKI, R.G. HIGUCHI, S.R. PALUMBI, E.M. PRAGER, R.D. SAGE, and M. STONEKING. 1985. Mitochondrial and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc. 26:375-400.
- WINKLER-OSWATITSCH, R., A. DRESS, and M. EIGEN. 1986. Comparative sequence analysis. Exemplified with tRNA and 5S rRNA. Chemica Scripta 26B:59-66.
- WOLSTENHOLME, D.R., and D.O. CLARY. 1985. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. Genetics 109:725-744.
- WOLSTENHOLME, D.R., J.L. MACFARLANE, R. OKIMOTO, D.O. CLARY, and J.A. WAHLEITHNER. 1987. Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1324-1328.
- YOUNG, I.G. and S. ANDERSON. 1980. The genetic code in bovine mitochondria: sequence of genes for the cytochrome oxidase subunit II and two tRNAs. Gene 12:257-265.



Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de  
D. ECADIU BARRIO ESPARDUCER  
la calificación de "APTO CUM LAUDE"

Valencia, a 21 de Septiembre de 1992

El Secretario,

El Presidente

