



Universitat de les Illes Balears
Departament de Biologia
Laboratori de Genètica

Dinàmica temporal i eficàcia biològica dels haplotips del DNA mitocondrial en *Drosophila subobscura*

TESI DOCTORAL presentada pel **Sr. John Simon Christie de Oleza** per optar al grau de Doctor en Biologia.

Realitzada sota la direcció del **Dr. José Aurelio Castro Ocón** i de la **Dra. Misericòrdia Ramon Juanpere**, del Departament de Biologia de la Universitat de les Illes Balears.

Dr. José A. Castro Ocón

Dra. Misericòrdia Ramon Juanpere

Sr. John S. Christie de Oleza

Palma de Mallorca, 2011

Agraïments

Vull donar les gràcies a totes aquelles persones que m'han ensenyat, animat i ajudat a fer possible aquest estudi:

- Al Dr. José A. Castro i a la Dra. Misericòrdia Ramon, directors d'aquest treball, per la seva amistat, confiança i dedicació. Especialment vull recordar les llargues converses amb el Dr. Castro sobre diversos aspectes de la investigació en *Drosophila*. El suport rebut pel Dr. Castro ha estat imprescindible per a poder dur a bon terme aquest doctorat i les paraules són insuficients, per limitades, per a poder expressar l'agraïment que es mereix.

- A la Dra. Antònia Picornell, per la seva inestimable ajuda, paciència i disponibilitat al llarg d'aquests anys.

- Al grup del Dr. Andrés Moya, de l'Institut "Cavanilles" de Biodiversitat i Biologia Evolutiva de València, pels seus suggeriments i el seu assessorament.

- Al Dr. Eduard Petitpierre, al Dr. Carles Juan i a tots els companys de laboratori que són i han estat molts durant aquests anys, els quals sempre m'han ajudat i ensenyat i amb els quals he compartit moltes hores de feina, bones estones i experiències, sobre tot a Pedro Oliver, Virginia Rodríguez i Carme Tomàs.

- Finalment, vull agrair especialment a la meua família i amics, que sempre han estat quan els he necessitat, pel seu suport, la seva ajuda i els ànims que m'han donat.

INDEX

1. INTRODUCCIÓ	7
1.1. <i>Drosophila subobscura</i>	10
1.1.1. Sistemàtica i classificació	10
1.1.2. Distribució geogràfica	14
1.1.3. Ecologia	15
1.1.4. Etapes del desenvolupament	17
1.2. El DNA mitocondrial	19
1.2.1. Regió control	21
1.2.2. Regió codificadora	21
1.2.3. L'herència mitocondrial	22
1.3. Estudis de variabilitat a <i>Drosophila subobscura</i>	23
1.3.1. Al·loenzims	23
1.3.2. Inversions cromosòmiques	24
1.3.3. RFLPs del mtDNA	25
1.4. Relació nucli-citoplasma	28
1.4.1. Interacció nucli-mitocondri	28
1.4.2. Incompatibilitat citoplasmàtica	29
1.5. Selecció: components d'eficàcia biològica i característiques de la història de la vida	31
1.5.1. Components de l'eficàcia biològica	32
1.5.2. Característiques de la història de la vida	35
1.5.3. Determinació de la selecció	38
1.5.4. Mutacions i canvis en l'eficàcia biològica	39
2. OBJECTIUS	41
3. PUBLICACIONS	45
Títol: Fitness and life-history traits of the two major mitochondrial DNA haplotypes of <i>Drosophila subobscura</i> .	
Autors: Christie, J. S.; Castro, J. A.; Oliver, P.; Picornell, A.; Ramon, M. M.; Moya, A.	
Revista: <i>Heredity</i> 93 : 371-378 (2004).	47
Títol: Dynamics of the mtDNA haplotype variability in a <i>Drosophila subobscura</i> population over a two-year period.	
Autors: Christie, J.S.; Picornell, A.; Moya, A.; Ramon, M. M.; Castro, J. A.	
Revista: <i>The Open Evolution Journal</i> 4 : 23-30 (2010).	67

Títol: Mitochondrial DNA effects on fitness in <i>Drosophila subobscura</i> .	
Autors: Christie, J. S.; Picornell, A.; Moya, A.; Ramon, M. M.; Castro, J. A.	
Revista: <i>Heredity, on line</i> (2011)	85
4. DISCUSSIÓ	103
4.1. Característiques de l'haplotip I versus haplotip II	105
4.1.1. Deriva genètica	105
4.1.2. Selecció directa al mtDNA	107
4.1.3. Selecció epistàtica citonuclear	108
4.2. Dinàmica de l'haplotip VIII	112
4.3. El manteniment dels haplotips rars	114
4.4. Altres forces evolutives	119
5. CONCLUSIONS	123
6. BIBLIOGRAFIA	127
7. ANNEX	143
7.1. Bibliografia personal relacionada amb el tema	145
7.1.1. Resum de les Comunicacions a Congressos	145
7.1.2. Publicacions en revistes	151

1. INTRODUCCIÓ

És una observació constant al Vell Món que l'espècie *Drosophila subobscura* presenta una distribució geogràfica homogènia, respecte als seus haplotips de DNA mitocondrial. Hi ha una prevalença de dos haplotips majoritaris coexistents (anomenats **I** i **II**), així com una sèrie d'haplotips menys freqüents que deriven dels haplotips principals, que en conjunt no superen el 5%, i que només apareixen d'una forma local (Latorre i col., 1992; González i col., 1994; García-Martínez i col., 1998; Castro i col., 1999; Oliver i col., 2002). Estudis fets a poblacions que han colonitzat el Nou Món els darrers 30 anys, han demostrat el mateix model de distribució (Latorre i col., 1986; Rozas i col., 1990). Fins ara, l'única excepció a aquest patró d'haplotips de DNA mitocondrial a *Drosophila subobscura* s'ha detectat a les Illes Canàries, on un haplotip endèmic (anomenat **VIII**) és el predominant a les illes de La Gomera, Gran Canària i Tenerife (geològicament les més antigues), mentre que l'haplotip **II** és el més freqüent a les illes d' El Hierro i La Palma (Pinto i col., 1997). Formalment, aquest patró d'haplotips de DNA mitocondrial es pot classificar com un polimorfisme clàssic, amb l'existència addicional d'un nombre variable d'al·lells rars dins de cada població (Lewontin, 1985).

Diversos estudis realitzats els darrers anys han analitzat les dinàmiques d'aquests haplotips mitocondrials, en un intent de poder explicar aquesta equidistribució dels dos haplotips majoritaris a la natura i de poder conèixer les forces evolutives involucrades en el seu manteniment. En aquest sentit, els resultats fins ara han indicat que el patró d'haplotips observat es podria explicar, al menys en part, per deriva genètica, per selecció directa sobre el DNA mitocondrial i per selecció epistàtica que afectaria a les coadaptacions citonuclears (Fos i col., 1990; García-Martínez i col., 1998; Oliver i col., 2005; Castro i col., 2010).

Seguint aquesta línia d'investigació, l'objectiu principal d'aquest treball ha estat el de contribuir al coneixement de les forces evolutives implicades en el manteniment espacial i temporal del patró d'haplotips mitocondrials de *Drosophila subobscura* observat a la natura. Per aconseguir-ho, s'han estudiat les eficàcies biològiques i els components d'història de la vida (cicle biològic o vital) dels haplotips (**I**, **II** i rars) i s'ha fet un seguiment de dos anys de la dinàmica de la variabilitat mitocondrial d'aquesta espècie a una població natural localitzada a Calvià (Mallorca, Illes Balears).

1.1. *Drosophila subobscura*

Drosophila subobscura (Figura 1) és un dípter freqüent als boscos de les nostres illes i als de la resta d'Europa, però totalment desconegut en comparació amb el seu parent, *Drosophila melanogaster*. Vulgarment, les *Drosophila* són conegudes com les mosques del vinagre. La paraula *Drosophila* ve del grec *drosos*, que significa rosada, i *philos*, que significa "amant de"; llavors *Drosophila* significa "amant de la rosada".

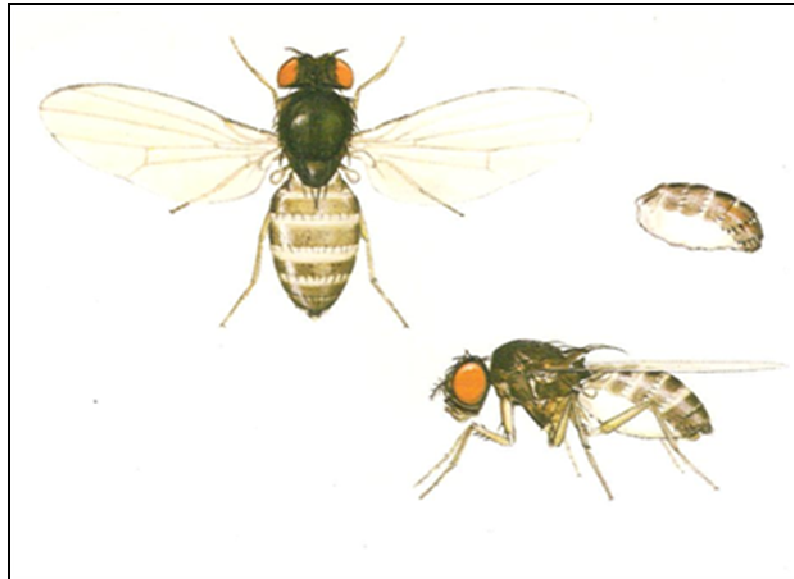


Figura 1. *Drosophila subobscura* (femella i abdomen de mascle; segons Shorrock, 1972).

Les *Drosophila* són un excel·lent material de laboratori i, per això, han jugat un paper molt important en el desenvolupament de la Genètica. Entre els múltiples avantatges que ofereixen, en destaquen el seu manteniment senzill i econòmic, la seva capacitat de produir un nombre de descendents molt elevat en una sola generació, i la gran varietat de mutants fenotípics que se'n coneixen. A més a més, les larves de *Drosophila*, com les d'altres dípters, tenen a les seves glàndules salivals cromosomes politènics. Aquests són cromosomes molt grans que permeten realitzar estudis citogenètics molt precisos.

1.1.1. Sistemàtica i classificació

L'espècie *Drosophila subobscura* va ser descrita per primera vegada per J. E. Collin l'any 1936, a Anglaterra, i la va incloure entre els drosòfílids del grup *Obscura* del subgènere *Sophophora* del gènere *Drosophila* (Figura 2). El subgènere *Sophophora* es divideix en set grups d'espècies: *melanogaster*, *obscura*, *saltans*, *willistoni*, *dentissima*,

fima i *dispar*. L'espècie que dóna nom al grup, *Drosophila obscura*, va ser descrita per Fallen, per primera vegada a 1823, al sud de Suècia.

Regne	Animal
Filum	Artròpodes
Classe	Insectes
Ordre	Dípters
Família	Drosofilids
Gènere	Drosophila
Subgènere	Sophophora
Grup	Obscura
Espècie	<i>Drosophila subobscura</i>

Figura 2. Sistemàtica de *Drosophila subobscura*.

El grup *Obscura*

El grup *Obscura* està format per més de 35 espècies i s'han produït moltes modificacions en quant a la seva classificació en subgrups. A partir d'estudis d'al·loenzims, citogenètics, de RFLPs i de seqüenciació del mtDNA, aquest grup es divideix en cinc subgrups (Barrio i Ayala, 1997; O'Grady i Kidwell, 2002; Moreteau i col., 2003; veure Figura 3): *affinis* i *pseudoobscura*, amb espècies típiques de Nord Amèrica (Neàrtiques); *obscura* i *subobscura*, amb espècies típiques d'Europa (Paleàrtiques); i *microlabis*, amb espècies d'Àfrica. Encara així, la discussió respecte al nombre de subgrups i la classificació de les diferents espècies roman oberta, per exemple, amb la incorporació d'un nou subgrup, *sinobscura* (*D. tsukubaensis*, *D. sinobscura*, *D. luguensis*), trobades al Japó i la Xina (Gao i col., 2007).

Les espècies del grup *obscura* tenen les següents característiques morfològiques:

- Individus de color negre.
- Presència de dues pintes sexuals als tars de cada pota anterior del mascle.
- Tèrgits normalment negres.
- Adults relativament grans (longitud del cos de 2 a 4 mm).
- Cara ventral de l'abdomen blanca a les femelles i vermelloso als mascles, degut als testicles vermells.

Aquestes característiques morfològiques són un criteri vàlid per a distingir les espècies que pertanyen a aquest grup (*Obscura*), però hi ha considerables dificultats per a distingir-les dintre del grup (Ashburner i col., 1982).

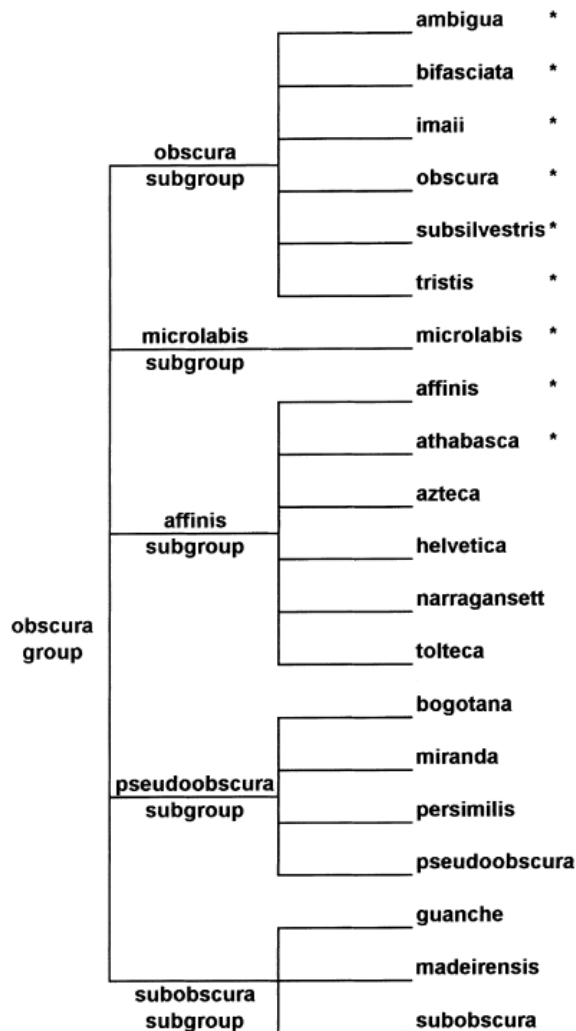


Figura 3. Dendrograma filogenètic-taxonòmic del grup *obscura* (segons Moreteau i col., 2003).

Drosophila subobscura

S'indiquen, a continuació, algunes característiques morfològiques que permeten distingir a *Drosophila subobscura* d'altres espècies del grup *obscura*. Entre parèntesis, també s'indiquen les característiques morfològiques de *Drosophila ambigua*, atès que aquesta espècie es troba a la mateixa àrea on es capturaren les mosques per a aquests experiments i que és molt fàcil de confondre amb *Drosophila subobscura*, malgrat es visualitzin els espècimens amb una lupa. Algunes d'aquestes característiques es poden apreciar a la Figura 4a i 4b.

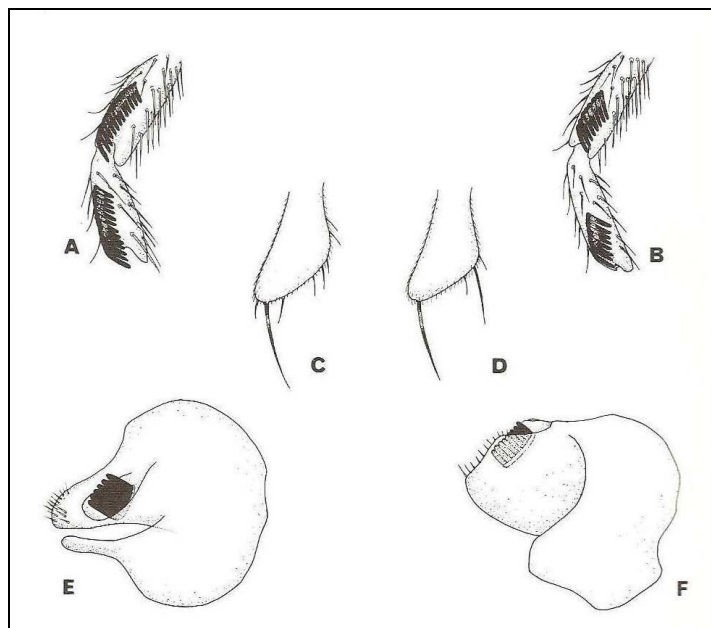


Figura 4a. *Drosophila subobscura* (esquerra) i *Drosophila ambigua* (dreta): A i B, pintes sexuals als mascles. C i D, palp maxil·lar amb només una queta grossa o amb dues quetes grosses. E i F pinta genital quadrada o rectangular (segons Shorrocks, 1972).

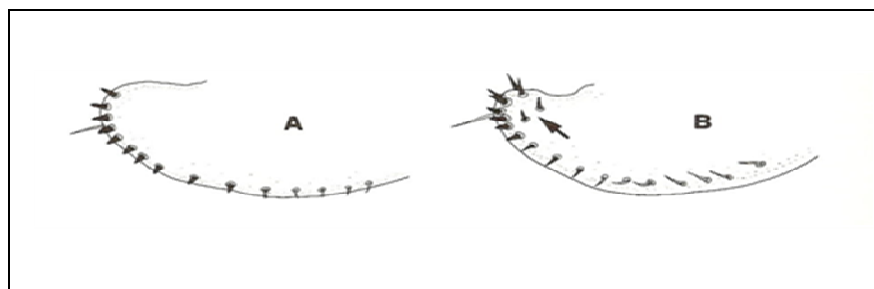


Figura 4b. Aparell ovipositor a *Drosophila subobscura* (A) i a *Drosophila ambigua* (B) (segons Shorrocks, 1972).

Característiques particulars de les espècies *Drosophila subobscura* i *Drosophila ambigua* (entre parentesi):

- Primera pinta sexual dels mascles amb entre 10 i 15 dents (entre 7 i 10).
- Segona pinta sexual dels mascles amb entre 9 i 13 dents (entre 8 i 10).
- Palps maxil·lars amb només una queta (2).
- Pinta genital dels mascles quadrada i amb entre 6 i 8 dents (clarament rectangular; entre 7 i 10).
- Dents de l'aparell ovipositor de les femelles curtes i fortes, i totes de la mateixa mida (les 4 ó 5 dents més terminals són més llargues i fortes que la resta).

- La queta ovipositora a les femelles és el doble de llarga que les dents de l'aparell ovipositor (la queta ovipositora és tres vegades més llarga).
- *Drosophila ambigua* presenta les pupes més clares, els mascles adults amb testicles més marcats i les femelles adultes amb l'abdomen més avespat.

1.1.2. Distribució geogràfica

Drosophila subobscura presenta una àmplia distribució a la regió paleàrtica (Vell Món) (Figura 5). Està present a l'Europa continental i les seves illes, excepte a Islàndia i a la part central i septentrional d'Escandinàvia. Es troba en el Nord d'Àfrica fins el Sàhara i a les Illes Canàries, les Azores i Madeira (Krimbas, 1993). També es troba a l'Orient Mitjà fins l'Irà (Pipkin, 1952) i en algunes de les repúbliques de l'extingida Unió Soviètica (Sokolov i Dubinin, 1941).

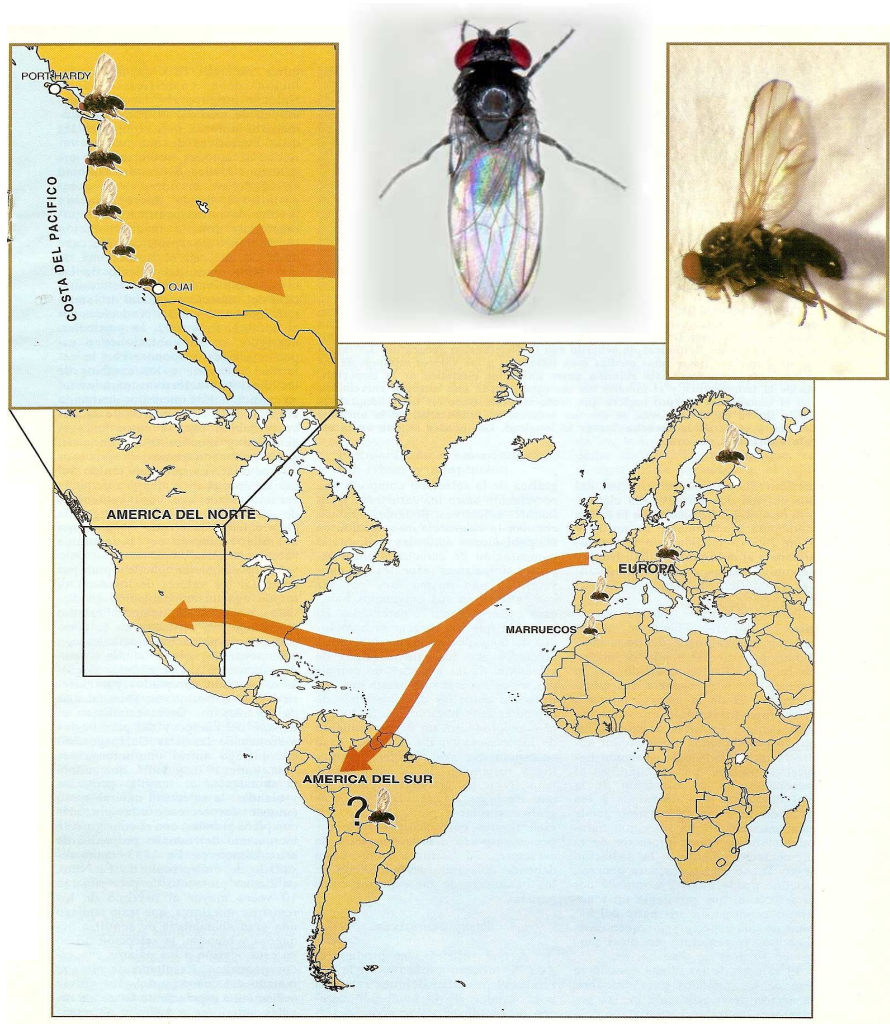


Figura 5. Distribució geogràfica de *Drosophila subobscura*. Originàriament només era una espècie paleàrtica. Fa més de trenta anys es va detectar a Amèrica del Nord i Sud (segons Prevosti i Serra, 2000).

Al Nou Món, aquesta espècie fou detectada per primera vegada a Sud-Amèrica al 1978 a Puerto Montt, Xile (Brncic i col., 1981), i a Nord-Amèrica al 1982 a Port Townsend, EEUU (Beckenback i Prevosti, 1986). Des de llavors, s'ha estès ràpidament. La seva distribució a l'Amèrica del Sud va des del paral·lel 29º fins al paral·lel 53º sud, i des del Pacífic fins l'Atlàntic (Mestres i col., 1993). A l'Amèrica del Nord, es troba des de Port Hardy (Columbia Britànica) fins a Ojai (100 km al nord-est de Los Angeles) (Huey i col., 2000). Les àrees colonitzades tenen una situació geogràfica equivalent a ambdós hemisferis i les condicions climàtiques són paral·leles (Prevosti i col., 1988). Fins ara, les dades d'estudis genètics suggereixen que la població colonitzadora fou originària de la Península Ibèrica i que els dos processos de colonització estan relacionats (Prevosti i col., 1988; Fernández Iriarte i col., 2009).

1.1.3. Ecologia

Les poblacions naturals de *Drosophila subobscura* foren molt estudiades durant la segona meitat del segle XX, produint un coneixement considerable pel que fa a l'ecologia, biogeografia, citogenètica, genètica de poblacions i biologia evolutiva. L'ecologia és, potser, el punt menys estudiat de l'espècie. Els adults es poden trobar quasi be a qualsevol tipus d'habitat: boscs, camps de conreu, jardins, horts, zones costaneres, aiguamolls i, inclús, a l'interior d'edificis. Encara així, la seva presència és major en zones arborades (Shorrocks, 1972).

Se sap que és una espècie molt generalista, que és polífaga i que posa els ous tant als fongs, com a plantes en descomposició i a exsudats vegetals (Begon i Shorrocks, 1978; Shorrocks, 1982). S'han trobat larves a agalles de roure (Shorrocks, 1972) i adults alimentant-se d'exsudats de resina d'oms, sicòmors i salzes (Gordon, 1942; Basden, 1954a). A la natura, les *Drosophila* no s'alimenten pròpiament d'aquests aliments, sinó dels microorganismes, especialment dels llevats, que creixen sobre aquests substrats de carbohidrats. Al respecte, Dobzhansky i col (1956) trobaren que cada espècie de *Drosophila* té preferència per a determinades espècies de llevats, la qual cosa reduiria la competència pel menjar entre espècies, permetent la cohabitació de diferents espècies a un mateix hàbitat, mitjançant l'explotació de diferents recursos alimentaris.

Però, queda com un interrogant, com sobreviuen els individus de *Drosophila subobscura* quan les condicions climàtiques són adverses, encara que això sigui un tema de gran importància per a la supervivència de les mosques. A altres espècies de

Drosophila, distints estudis de camp indiquen que els individus entren en un estat de diapausa a distintes etapes del cicle biològic i a diferents llocs del seu habitat. A *D. reflexa* s'ha observat que els individus permaneixen en estadi larvari entre la tardor i la primavera següent (Basden, 1954b). A *D. persimilis* la diapausa succeeix en l'estadi pupal (Shorrocks, 1972) i, a *D. robusta*, en l'estadi d'adult (Carson i Stalker, 1948). Fins i tot, s'ha observat a *D. melanogaster* una parada del desenvolupament larvari en condicions d'alta competència (Ménsua i Moya, 1983). En general, s'ha observat que es refugien dins de troncs en descomposició, davall la fullaraca i inclús sota terra quan neva.

Segons l'experiència obtinguda en els estudis realitzats en el present treball, aquesta espècie és molt abundant a la primavera i ho és menys a la tardor, mentre que a l'hivern es troben pocs individus degut a les baixes temperatures, i a l'estiu és habitual no trobar-ne cap. Hem observat que als estius es produeixen colls d'ampolla poblacionals importants per a aquesta espècie, degut al temps sec i calorós típic de l'estiu a la Mediterrània. Però hem observat que, quan la població de *Drosophila subobscura* declina a finals de primavera, és substituïda temporalment a l'estiu per una altre espècie, *Drosophila simulans*, la qual redueix la seva freqüència en arribar la tardor. Si ens demanéssim com sobreviu *Drosophila subobscura* a l'estiu, a la població que hem estudiat en aquest treball, la resposta més plausible seria que els adults sobreviurien refugiant-se en els punts més ombrívols i frescs del seu hàbitat, en el fons de comes mirant cap a Tramuntana, possiblement amagant-se sota l'escorça dels arbres o la fullaraca durant el dia per sortir durant l'alba per a aprofitar la rosada.

La informació respecte a quins són, o poden esser, els depredadors naturals de *Drosophila* és molt escassa, encara que és segur que tota una sèrie d'animals inclouen *Drosophila* a la seva dieta. Segons Shorrocks (1972), les *Drosophila* són depredades per espècies com la mosca del fem (*Scatophaga stercorarium*) i els cinípid o vespes de les agalles (*Pseudeucoila bochei* i *Phaenocarpa tabida*). *Scatophaga stercorarium* és un dípter que sol trobar-se a prop d'aliments en fermentació, esperant depredar altres mosques. En canvi, *Pseudeucoila bochei* i *Phaenocarpa tabida* són dues espècies de vespes paràsites, les femelles de les quals posen els seus ous a les larves de *Drosophila* en una relació d'una a una. Les larves de les vespes es desenvolupen dins de les larves de *Drosophila*, permetent-les pupar, per sortir com adults de vespa poc després.

1.1.4. Etapes del desenvolupament

Drosophila subobscura pertany als anomenats insectes holometàbols, es a dir, que posseeixen metamorfosi completa (Figura 6).

Després de l'aparellament, la fecundació dels ous té lloc dins de l'úter. A continuació es produeix l'oviposició. Les femelles posen els ous inserits dins del medi de cultiu, però amb els apèndixs coriònics exposats. A 19°C, l'ou eclosiona després d'unes 40 hores, en les quals ha tingut lloc una gran proliferació i reorganització cel·lular. Surt una larva petita i blanca, molt activa i voraç (estadi larval L1). La larva passa per tres estadis diferenciats (L1, L2, L3), entre els quals succeeix una muda, la qual li permet continuar creixent. Els estadis larvals duren uns 10-12 dies.

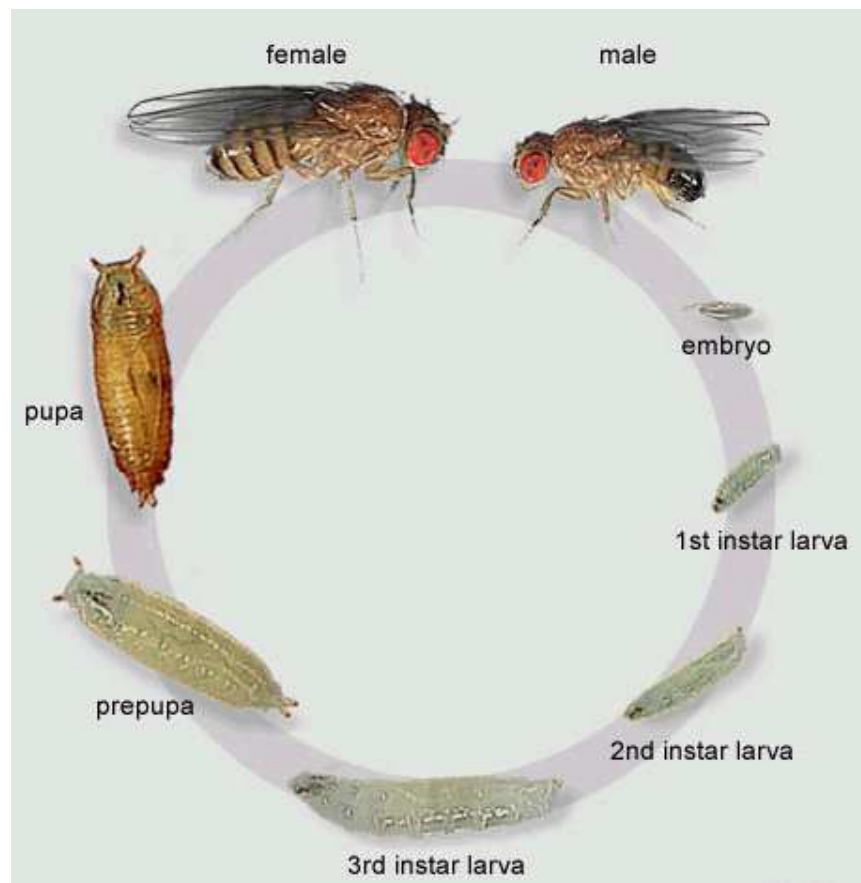


Figura 6. Cicle biològic de *Drosophila*.

Al final de l'estadi L3 es produeix la pupariació (formació del pupàrium): les larves perden mobilitat, es fixen al substrat, s'escurcen, apareixen els espiracles anteriors i la seva pell s'endureix formant el pupàrium. El pupàrium produït en aquest procés, és la pell larval endurida, que inclou la prepupa, un individu immòbil, tècnicament encara una larva en estadi L3. Hores després es dona la pupació (formació de la pupa): es produeix l'apòlisi larva/pupa, amb la retracció de l'epidermis

de la cutícula de la larva L3, per formar la cutícula de la pupa. A partir d'aquest moment, l'individu ja és una pupa (Ashburner, 1989).

És freqüent que el terme pupa s'empri per descriure l'animal fins que succeeixi l'eclosió o ècdisi de l'adult, però, tècnicament, la pupa només ho és fins l'apòlisi pupa/adult. L'animal dins del pupàrium és, després de l'apòlisi pupa/adult, un adult *pharate*. Tot aquest procés es distingeix perquè la coberta externa de la pupa es va endurent i enfosquint progressivament, fins a adquirir una tonalitat groguenca o taronjada. A la darrera part del procés, podem veure l'adult ja format a l'interior (Ashburner, 1989).

Un cop ha acabat la metamorfosi, que requereix la degradació i la reabsorció dels teixits de la larva i la producció de nous òrgans, a partir d'unes agrupacions cel·lulars larvàries anomenades *discs imaginals*, l'insecte adult trenca la cutícula pupal, per la pressió hidrostàtica de l'aire empassat o engolit i n'emergeix: és l'ècdisi pupa/adult. Immediatament després, els insectes adults es reconeixen fàcilment perquè no estan completament pigmentats (són de color blanc, amb els ulls vermells i les quetes negres), i les seves ales encara no s'han desplegat.

Els mascles arriben a la maduresa sexual poc després de sortir de la pupa, mentre que les femelles són sexualment madures després de 6 a 12 hores. La vida mitjana dels adults a 19°C és d'uns 80 dies. D'una parella, al cap d'uns dies es pot obtenir una progènie d'uns centenars d'individus; per tant, amb poques *Drosophila* és possible obtenir una nombrosa progènie, la qual cosa és molt adient per a realitzar experiments que precisen d'una anàlisi estadística. A més, un adult mesura entre 2 i 4 mm i pesa aproximadament 1 mg, dimensions ideals per mantenir poblacions de centenars d'individus en relativament poques ampolles de cultiu.

El temps de desenvolupament és funció de la temperatura i de la disponibilitat i qualitat del menjar. El temps acumulatiu de les diferents etapes del cicle vital, a la temperatura òptima de creixement de 19°C i a un 70% d'humitat és: Desenvolupament embrionari (40 hores); fins a pupa (13 dies) i fins a adult, 20 dies.

Dinou graus centígrads és la temperatura adequada per mantenir-les al laboratori. A temperatures inferiors el temps de desenvolupament s'allarga, el que redueix la freqüència de transferència d'individus a nous medis de cultiu. Si la temperatura és superior, el temps de desenvolupament s'escurça (a 25°C és de 15 dies). A temperatures al voltant dels 30°C les femelles esdevenen estèrils.

La fertilització de les femelles es produeix després d'un festeig i aparellament amb un mascle. L'aparellament a *Drosophila subobscura* es distingeix de les demás espècies del gènere, en què el mascle no produeix cap "cançó de festeig". Pareix ser que en aquesta espècie, els estímuls importants són les visuals i no els auditius, per la qual cosa no s'aparella a les fosques. Quan un mascle veu una femella, s'acosta i fa una sèrie ràpida de batecs amb les seves ales. Després de tocar la femella amb el seu primer parell de potes, la rodeja i es col·loca davant seu per a posicionar-se cap front a cap, i estén la seva probòscide cap a ella. Arribat aquest punt, els dos individus fan un "ball lateral" a on la femella gira a esquerra i dreta, i el mascle li segueix el ritme intentant sempre romandre just davant d'ella. A la vegada, el mascle estén i aixeca les seves ales però sense batre-les. Si la femella accepta al mascle, es queda quieta i el mascle procedeix a la còpula.

1.2. El DNA mitocondrial

El DNA mitocondrial és molt emprat en estudis evolutius de diferents grups d'animals, per algunes de les seves propietats: és una molècula petita; bàsicament de transmissió materna; relativament fàcil d'aïllar; està constituïda majoritàriament per regions codificants, i presenta una taxa d'evolució ràpida (Wilson i col., 1985; Avise i col., 1987).

El DNA mitocondrial té, en general, una estructura circular de doble cadena (anomenades cadena pesada o H (*heavy*) i cadena lleugera o L (*light*), tancada covalentment i amb seqüències que són de copia única, excepte a la *regió A+T* on presenta DNA repetitiu (Figura 7). La grandària de la molècula varia entre individus de diferent espècies i entre individus de la mateixa espècie. Si hi ha variacions en un mateix individu, el fenomen és anomenat *heteroplàsmia* (Brown, 1985; Kvist i col., 2003). En els metazous, la grandària varia entre 14,2 kb i 19,5 kb (Gray, 1989), i el de *Drosophila yakuba* és de 16.019 parells de bases (Clary i Wolstenholme, 1985).

A *Drosophila subobscura*, el DNA mitocondrial és d'aproximadament 15,8 kb i fins ara només s'ha seqüenciat parcialment: Moya i col. (1993) estudiaren la diversitat nucleotídica de sis regions funcionals del mtDNA (2.377 parells de bases; 15% del genoma) als dos haplotips majoritaris (I i II), mentre que Castro i col. (2010), estudiaren un fragment de 942 parells de bases del gen ND5 a una ampla gama d'haplotips mitocondrials.

A *Drosophila* s'han descrit polimorfismes de longitud des d'1 a 5 Kb (Fauron i

Wolstenholme, 1980; Brehm i col., 2004). Aquesta variabilitat sempre està localitzada a la *regió A+T*. Per a quatre espècies del subgrup *melanogaster*, Solignac i col., (1986) varen demostrar que la variabilitat era deguda a insercions/delecions, i a variacions en el nombre de repeticions (de dues a sis vegades) d'una seqüència de 470 pb. Townsend i Rand (2004) també varen detectar variació, deguda a insercions i delecions de repeticions en tàndem, en la regió control (A+T) del genoma mitocondrial de *Drosophila melanogaster*. De la mateixa manera, la variació en la longitud del mtDNA en les espècies del grup *obscura* de *Drosophila*, és també deguda quasi exclusivament a insercions/delecions petites a la regió variable (Monforte i col., 1993). En el present estudi no es detectaren diferències significatives en la grandària del mtDNA de les isolínies analitzades.

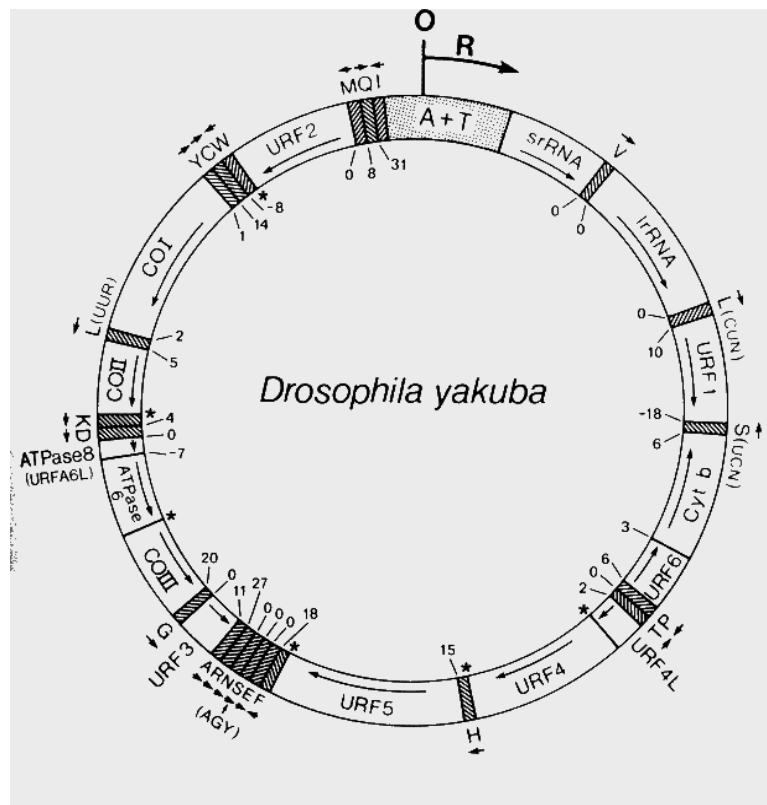


Figura 7. Mapa genètic del mtDNA de *Drosophila yakuba* (Clary i Wolstenholme, 1985). L'origen de replicació (O) està localitzat dins la *regió A+T* i la direcció de replicació està indicada per R. Cada gen tRNA (àrees fosques) és identificat per una lletra del codi aminoacídic, una serina i leucina dels gens tRNA són identificats per la família del codó (en parèntesi). Les fletxes indiquen la direcció de transcripció de cada gen. Els nombres de nucleòtids que aparentment no codifiquen entre els gens són al límit del gen. Els nombres negatius indiquen nucleòtids solapats de gens adjacents. Un asterisc indica un codó de terminació incomplet (T o TA).

1.2.1. Regió control

Al gènere *Drosophila*, la regió control és rica en les bases A i T. Per aquesta raó s'anomena *regió A+T*. La presència d'aquesta regió fou documentada, per primera vegada, a partir d'observacions de desnaturalització tèrmica del mtDNA de *Drosophila melanogaster* (Peacock i col., 1974; Goldring i Peacock, 1977). La longitud de la *regió A+T* en *Drosophila subobscura* és d'uns 964pb i presenta tres regions diferents. La primera, A (des de la base 11 a la 157) es troba adjacent al gen tRNA^{Ile} i és la que presenta la major diversitat nucleotídica; la central, B (des de la posició 158 a la 437), és la més conservada, i conté una estructura *stem-and-loop* (Clary i Wolstenholme, 1987) que suggereix un origen de replicació secundari; i la tercera, C (des de la posició 438 a la 973) també variable, però menys que la regió A (Brehm i col., 2001). La taxa de substitució nucleotídica per a aquesta regió, en el subgrup *subobscura* és de $0,116 \pm 0,030$ per milió d'anys, quatre vegades major que les regions codificants dels DNA mitocondrial ($0,029 \pm 0,006$ per milió d'anys, per a les mateixes espècies (Barrio i col., 1994)).

1.2.2. Regió codificadora

El genoma mitocondrial conté 13 gens que codifiquen per a proteïnes implicades en la síntesi d'ATP i de la cadena de transport d'electrons. Entre aquests gens hi ha COI-III, tres subunitats del complex de la citocrom oxidasa; cyt b, apoenzim del complex citocrom b-c1; ATPasa 6 i ATPasa 8; i ND1-6, les sis subunitats del complex de la NADH deshidrogenasa. A més, codifica vint-i-dos tRNA i dos rRNA (12S i 16S). Pràcticament no hi ha nucleòtids entre gens i, si n'hi ha, són pocs: d'1 a 31. La resta de proteïnes i subunitats necessàries pel funcionament dels enzims estan codificades pel DNA nuclear, establint-se, d'aquesta manera, una forta coadaptació nucli-mitocondri.

La meitat dels gens de la molècula de DNA mitocondrial de *Drosophila yakuba* estan a la dreta de la regió rica d'A+T. Excepte els gens que codifiquen per citocrom b, URF 6 i els gens tRNA^{Ser} i tRNA^{Thr}, els altres es transcriuen en el mateix sentit de la replicació de la molècula. Els gens que es troben a l'altra meitat, amb excepció dels gens tRNA^{Gly}, tRNA^{Cys} i tRNA^{Tyr}, es transcriuen en sentit oposat al de la replicació (Anderson i col., 1981, 1982; Bibb i col., 1981).

1.2.3. L'herència mitocondrial

L'herència dels mitocondris i del mtDNA és principalment materna, degut a la gran diferència existent entre el nombre de mitocondris de l'òvul respecte al de l'espermatozoide i/o als mecanismes de destrucció específica dels mitocondris paternals (Sutovsky i col., 1999). De tota manera, s'ha detectat ocasionalment herència biparental en ratolins, musclos, *Drosophila*, humans i ocells (Kvist i col., 2003), que pot donar lloc a l'aparició d'heteroplàsmia. L'aparició d'individus amb heteroplàsmia és degut principalment a la "fuita paterna" (Kondo i col., 1990). L'heteroplàsmia és un fenomen rar d'observar a *Drosophila subobscura* (Afonso i col., 1990; Morel i col., 2006).

El tema de l'heteroplàsmia és molt important en l'herència mitocondrial. En individus normals, aproximadament el 99.9% de les molècules del mtDNA són idèntiques (homoplàsmia). Però si apareix una nova mutació i s'estén en la població del mtDNA, trobarem dos genotips mtDNA amb freqüències significatives (heteroplàsmia). També podria donar-se el fet de que una nova mutació apareguda en una sola molècula es fixés en la població: la molècula mutant prolifera i reemplaça a totes les altres molècules, restaurant l'estat d'homoplàsmia. El procés de fixació no és facilitat, en principi, per l'absència de recombinació entre molècules de mtDNA, encara que sí s'ha descrit en algun cas puntual l'existència de recombinació entre DNAs mitocondrials (Rokas i col., 2003). Intuïtivament, es podria pensar que el temps de fixació d'una mutació mitocondrial, podria ser més llarg que el de la fixació d'una mutació en el genoma nuclear, on sí que es donen processos de recombinació (Strachan i Read, 1996), però, paradoxalment, les taxes de fixació de les mutacions del mtDNA en cèl·lules de mamífers, resulten ser 10 vegades més altes que les detectades en el DNA nuclear. Una possible explicació la donaria l'existència del coll d'ampolla durant l'oogènesi. El nombre efectiu de molècules de mtDNA es veu dràsticament reduït en aquest procés i, després, una sobrereplicació del mtDNA, torna a la proporció normal el nombre de molècules de mtDNA (Hauswirth i Laipis, 1985; Gemmell i col., 2004).

El valor de la taxa d'evolució del mtDNA ha estat molt estudiat. Les estimacions assumeixen que es compleix la hipòtesi del "rellotge molecular". La taxa de substitució nucleotídica estimada al mtDNA de mamífers varia de $2,5 \times 10^{-9}$ a $25,4 \times 10^{-9}$ per lloc i any, essent 10×10^{-9} el valor estàndard acceptat. Les estimacions de la taxa d'evolució del mtDNA de *Drosophila*, varien de $2,4 \times 10^{-9}$ a $62,5 \times 10^{-9}$ per lloc i any. Si apliquem aquestes dades per calcular el temps de divergència entre els diferents morfes

mitocondrials de *Drosophila subobscura*, obtenim un valor aproximat de 14 milions d'anys (en un interval de 4-27 milions d'anys), fent el càlcul amb el valor inferior. Amb el valor superior, el temps de divergència seria de 540.000 anys (en un interval de 0,16-1,0 milions d'anys) (Latorre i col., 1986).

1.3. Estudis de variabilitat a *Drosophila subobscura*

Aquesta espècie és la més intensament investigada de les espècies europees del gènere *Drosophila* en els estudis de genètica poblacional. Aquest fet es degut a la seva ja esmentada extensiva distribució geogràfica, la relativa abundància i el seu ric polimorfisme cromosòmic.

En quant a la variabilitat, els estudis més freqüents es basen en al·loenzims, inversions cromosòmiques i DNA mitocondrial. Els resultats demostren que les poblacions naturals de *Drosophila subobscura* estan estructurades geogràficament, i també a una escala més fina, ho estan a nivell d'espai i temps.

1.3.1. Al·loenzims

Molts estudis de genètica poblacional han estimat la variació de les proteïnes, com a mesura de la variació en les seqüències de DNA. La idea és que les proteïnes que tenen distintes seqüències aminoacídiques, es poden detectar mitjançant les seves diferents mobilitats electroforètiques. Els al·loenzims són enzims que, diferin en la seqüència aminoacídica, catalitzen una mateixa reacció química. Aquests enzims solen mostrar diferents paràmetres cinètics o distintes propietats de regulació.

Els estudis d'al·loenzims mostren generalment una distribució geogràfica bastant uniforme d'al·lels, excepte a les Illes Canàries, on les poblacions estan clarament diferenciades de la resta de poblacions (Larruga i col., 1983). Cabrera i col. (1985) trobaren diferències en l'activitat diària entre les diverses variants al·loenzimàtiques. Diferents estudis han descrit associacions no aleatòries, entre al·loenzims i inversions cromosòmiques (Loukas i Krimbas, 1975; Prevosti i col., 1983; Zapata i col., 2000) i entre al·loenzims i haplotips mitocondrials, encara que aquestes associacions són difícils de demostrar a llarg plaç degut a que són, en general, transitòries (Castro i col., 1999).

1.3.2. Inversions cromosòmiques

Una inversió cromosòmica apareix quan hi ha un canvi en l'ordenació del material genètic d'un cromosoma. Succeeix quan una part del cromosoma es trenca i el fragment romput assumeix una posició invertida. La inversió pot ser pericèntrica (si afecta al centròmer) o paracèntrica (si no conté el centròmer). Les inversions tendeixen a suprimir la recombinació, ja que els entrecreuaments produïts dins les sinapsis d'inversió, generalment no arriben a generar cromosomes recombinants viables. En conseqüència, certes combinacions favorables d'al·lels s'hereten junts i queden protegides de la recombinació (Krimbas i Powell, 1992). Per a aquest motiu, les inversions cromosòmiques tenen un important caràcter adaptatiu, mitjançant tres mecanismes (Santos, 2009): la coadaptació, la selecció de supergens i l'adaptació local.

El polimorfisme d'inversions ha estat molt estudiat a *Drosophila subobscura*. Els resultats indiquen que l'espècie presenta un polimorfisme molt ric a poblacions naturals i, a més, aquestes inversions, tenen una forta naturalesa adaptativa. Tant a Europa, com a les regions colonitzades d'Amèrica, s'ha detectat la mateixa clina latitudinal pels polimorfismes d'inversió, la qual cosa suggereix una adaptació a condicions ambientals anàlogues (Prevosti i col., 1988; Krimbas, 1992; Balanya i col., 2009). L'agent causal d'aquesta configuració latitudinal de distribució de les variants, seria principalment la temperatura, però els resultats de Céspedes (2006) discrepen i indiquen com a causa un altre agent no identificat.

Altres estudis han trobat variacions a les freqüències, segons l'estació de l'any (De Frutos i Prevosti, 1984). També s'han detectat microdispersions no aleatòries de les inversions cromosòmiques (Krimbas i Alevizos, 1973; Burla i col., 1986) i elecció de distints hàbitats (Cabrera i col., 1985). Orengo i Prevosti (2002) trobaren una associació entre les inversions més freqüents i la grandària de l'ala. Aquest tret és la forma més emprada per a extrapolar la grandària dels individus i, a *Drosophila*, s'ha correlacionat amb diversos components d'eficàcia biològica (Monclús i Prevosti, 1971; Taylor i Kekic, 1988; Santos i col., 1992). Més recentment, Oliver i col. (2002) trobaren un significatiu desequilibri citonuclear entre inversions cromosòmiques i haplotips mitocondrials, on l'haplotip I de *Drosophila subobscura* estava associat amb la inversió J_{ST}, i l'haplotip II amb la inversió J₁.

1.3.3. RFLPs del mtDNA

Els RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), de vegades, anomenats també RSA (*Restriction Site Analyses*), són polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció. Diferències en les seqüències específiques (dianes) que són reconegudes i tallades pels enzims de restricció o endonucleases, generen fragments de diferent longitud que poden variar entre els individus d'una població, per la qual cosa es diu que la població és polimòrfica per a aquests fragments de restricció. Com a la resta d'espècies animals, la utilització de RFLPs en l'estudi de la variabilitat del mtDNA a *Drosophila subobscura*, ha estat molt útil per a determinar a escala fina estructures poblacionals intraespecífiques, pel seu considerable polimorfisme i la seva sensibilitat a efectes de fundació o subdivisió poblacional.

Els enzims emprats en aquests estudis són endonucleases de restricció de tipus II. Aquests enzims tallen en fragments les molècules de DNA aïllades. L'enzim reconeix una seqüència de 4, 5 ó 6 parells de bases de longitud (anomenada seqüència diana) i talla dos ponts fosfodiéster, un a cada cadena de la doble hèlix, dins o a prop de la seqüència diana. Aquests enzims tenen activitat metilasa i de restricció, la seqüència de reconeixement és palindròmica i no és necessari l'aport d'ATP.

L'aplicació dels RFLPs al mtDNA, ha aportat un important coneixement de la taxa de substitució nucleotídica a l'evolució i estructura genètica de les poblacions (Upholt i Dawid, 1977; Rand i Harrison, 1989; Castro i col., 1999). L'estudi de la variació genètica mitjançant enzims de restricció, no detecta necessàriament tota la variació genètica, però és molt més senzill que la seqüenciació completa del DNA.

Els nivells de polimorfisme de DNA detectats per endonucleases de restricció, poden ser analitzats per mètodes estadístics, amb la finalitat de mesurar la diversitat dins i entre poblacions. A *Drosophila*, aquests mètodes estadístics, foren aplicats a l'estudi de la variabilitat genètica en el DNA mitocondrial de *Drosophila melanogaster*, *simulans* i *virilis* en el treball clàssic de Shah i Langley (1979). Aquests autors varen suggerir que el canvi evolutiu del mtDNA d'organismes superiors, és degut principalment a la substitució nucleotídica, mentre que en el DNA nuclear les delecions i insercions pareixen ser més importants (Nei i Tajima, 1981). Encara que, com hem vist abans, també poden aparèixer delecions i insercions en la regió control del mtDNA de *Drosophila* (Townsend i Rand, 2004).

En els treballs sobre el mtDNA a *Drosophila subobscura*, els enzims de restricció més utilitzats són *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HindIII* i *HpaII* (Figura 8), degut a que són els

que més polimorfisme detecten (Latorre i col., 1986; Oliver i col., 2002). Per exemple, en el present treball, tots els enzims menys *EcoRI* detectaren polimorfisme per a fragments de restricció. Els diferents patrons de restricció del mtDNA de cada isolínia, s'obtenen mitjançant totes les possibles digestions, senzilles i dobles. Els fragments de restricció resultants, es separen mitjançant la tècnica d'electroforesi horitzontal en gels d'agarosa, i es visualitzen amb llum ultraviolada.

Per a determinar la grandària dels fragments de DNA, s'empren marcadors de pes molecular (Figura 9), que es carreguen en el mateix gel que les mostres. Els marcadors emprats en aquest estudi foren el Marcador II (λ -DNA, tallat amb *HindIII*), Marcador IV (mescla de λ -DNA i DNA pSPTBM20 tallat amb *StyI* i *SauI*), i Marcador VI (mescla de DNA pBR328 tallat amb *BglI* i DNA pBR328 tallat amb *HinfI*).

Els diferents patrons de restricció i haplotips s'han anomenat d'acord amb la notació de Latorre i col. (1986, 1992). Quan hi ha polimorfisme per a un enzim, es refereix al morf més habitual com a morf **A** (Figura 9) i, als morfs rars, amb altres lletres de l'alfabet segons s'han anat descrivint. En el cas de l'enzim *HaeIII* hi ha dos morfs majoritaris, l'**A** i el **C**. Una vegada que es coneix el morf per a cada enzim de restricció, la combinació resultant permet determinar un haplotip. D'aquesta manera, la combinació **AAAAA** determina l'haplotip **I** i la combinació **AACAA** determina l'haplotip **II**, i així successivament. Els haplotips s'anomenen mitjançant numeració romana.

<u>Enzim</u>	<u>Seqüència de reconeixement</u>
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC
<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC
<i>HaeIII</i>	GG↓CC
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT
<i>HpaII</i>	C↓CGG

Figura 8. Enzims de restricció més emprats en estudis del mtDNA de *Drosophila subobscura* amb les seves respectives seqüències diana (sentit 5'→3').

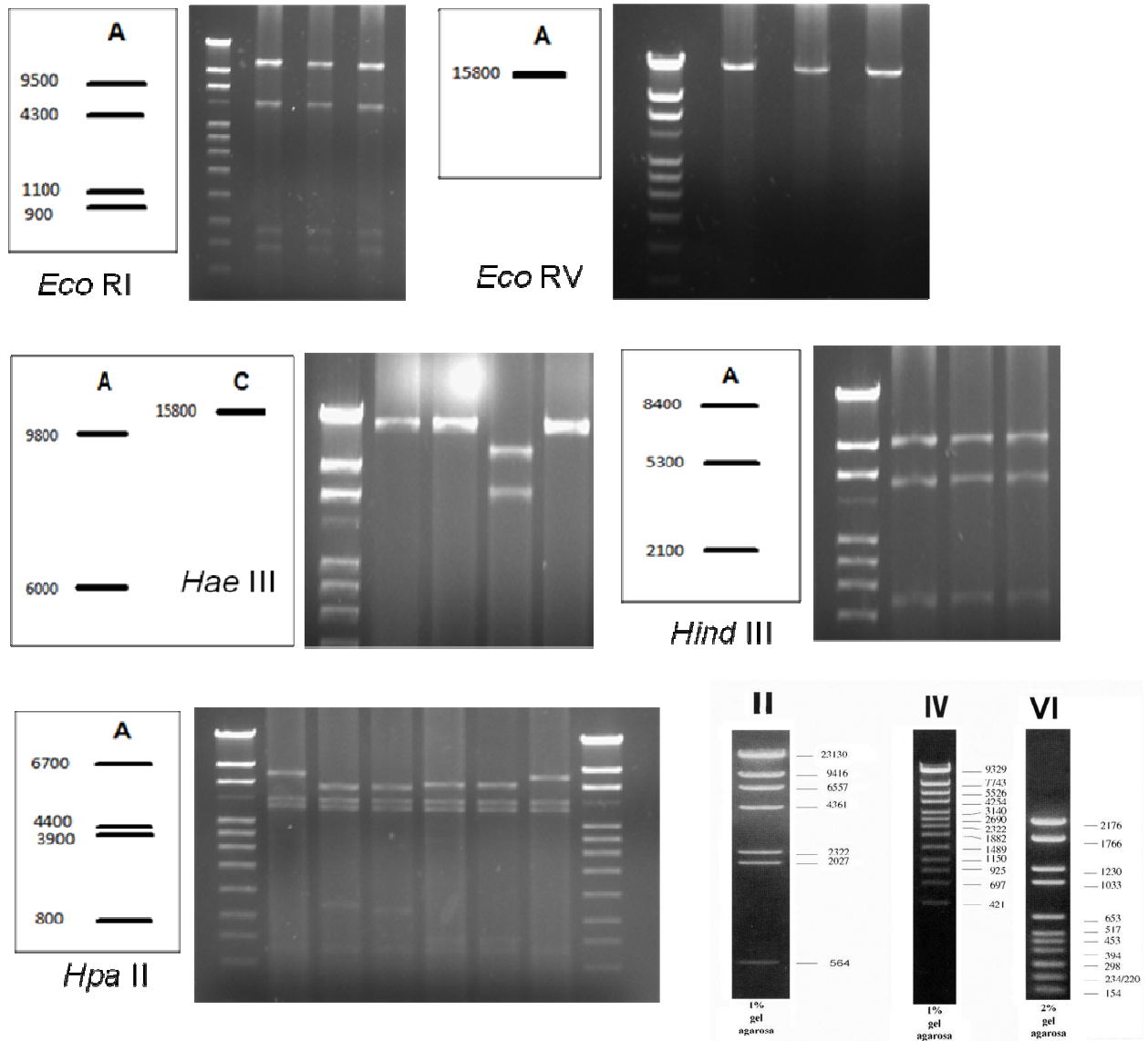


Figura 9. Gels d'electroforesi amb els patrons de bandes més habituals, per a les enzims de restricció *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HindIII* i *HpaII*, al mtDNA de *Drosophila subobscura*. A la primera pista, el marcador de pes molecular **IV**. A l'esquerra de cada gel hi ha el nombre aproximat de parell de bases per a cada fragment del morf majoritari (**A**). En el gel per a *HpaII*, s'observa el patró majoritari als pouets 2 i 7. Els quatre pouets centrals, corresponen a haplotips descrits de bell nou en Christie i col. (2010). D'esquerra a dreta, els haplotips **XX**, **XXI**, **XXII** i **XXIII**. A baix a la dreta, els marcadors de pes molecular **II**, **IV** i **VI**.

1.4. Relació nucli-citoplasma

1.4.1. Interacció nucli-mitocondri

Com ja hem indicat abans, la fosforilació oxidativa i el transport d'electrons que es produeix al mitocondri, estan regulats per complexos proteics, constituïts per subunitats codificades conjuntament per gens del nucli i del mitocondri (Attardi i Schatz, 1988). La variació funcional d'aquests compostos proteics, pot afectar a l'eficàcia biològica dels individus. Per tant, la selecció pot actuar de forma directa sobre el mtDNA o, indirectament, mitjançant el nucli, a través dels productes gènics nuclears, que interactuen funcionalment en els processos bioquímics amb els productes gènics mitocondrials (epístasi).

L'estudi de les interaccions nucli-mitocòndri a *Drosophila* es pot realitzar mitjançant la detecció dels desequilibris citonuclears. El desequilibri citonuclear mesura associacions no a l'atzar entre haplotips mitocondrials (citotips) i els al·lels nuclears o genotips. Les dades d'associacions entre el nucli i el mitocondri poden proporcionar noves pistes sobre les forces evolutives que actuen en les poblacions naturals. Molta d'aquesta informació està codificada per les associacions no a l'atzar que s'observen cada vegada més entre marcadors nuclears i citoplasmàtics (Lamb i Avise, 1986; Saghai-Marroof i col., 1992; Castro i col., 1999). Existeix una estructura teòrica substancial, des de la qual es poden analitzar dades citonuclears i emprar-les per realitzar inferències sobre un conjunt de processos evolutius importants. Les aplicacions inicials a zones híbrides han resultat fructíferes, produint estimacions estadístiques formals de les taxes de flux genètic i aparellament aleatori, les quals pareixen ser més sensibles i que, pot ser, no puguin ser obtingudes a partir dels sistemes nuclears o citoplasmàtics (Arnold i col., 1988; Asmussen i col., 1989; Avise i col., 1990). El fonament teòric ha estat emprat dades citonuclears (entre d'altres) com a marcadors de mescla, subdivisió de poblacions i deriva genètica (Asmussen i Arnold, 1991; Fu i Arnold, 1991, 1992). Una important aplicació del desequilibri citonuclear inclou estudis poblacionals d'alloenzims nuclears, en conjunció amb gens de mitocondris, cloroplasts o microorganismes heretats citoplasmàticament.

En aquest sentit, s'han descrit interaccions nucli-mitocondri a *Drosophila subobscura*. Castro i col. (1999) varen trobar associacions entre al·loenzims i haplotips mitocondrials, mentre que Oliver i col. (2002) varen trobar desequilibri citonuclear entre inversions cromosòmiques i haplotips mitocondrials, on l'haplotip I de *Drosophila subobscura* estava associat amb la J_{ST} , i l'haplotip II amb la J_1 . Encara així, aquests

autors argumentaren que aquestes associacions són difícils de demostrar degut a que són transitòries. Anteriorment, Fos i col. (1990) ja demostraren la importància de la coadaptació entre el DNA nuclear i mitocondrial quan posaren a competir a caixes de poblacions els haplotips I i VIII a diferents densitats i genomes nuclears. El resultat va ser que l'haplotip mitocondrial que aconseguia fixar-se era sempre aquell situat al seu propi genoma nuclear.

1.4.2. Incompatibilitat citoplasmàtica

Les freqüències dels haplotips mitocondrials poden variar degut als efectes d'endosimbionts com pot ser *Wolbachia*. És tracta d'un bacteri paràsit que s'hereta via materna i afecta principalment a artròpodes i a nematodes. Fou descrit per primera vegada en el complex *Culex pipiens*, una espècie de mosquit (Hertig i Wolbach, 1924). La infecció de *Wolbachia* és notable pel fet que altera significativament les capacitats reproductores dels seus hostes. Aquests bacteris poden infectar diferents tipus d'òrgans, però són destacables les infeccions a testicles i ovaris. Les infeccions per *Wolbachia* poden causar quatre efectes diferents:

1. **Mort** de mascles infectats.
2. **Feminització**. Les femelles portadores de *Wolbachia*, produeixen una descendència majoritàriament composta per femelles. Els embrions infectats amb una dotació genètica masculina, es desenvolupen com a femelles morfològiques i funcionals (Rigaud i col., 1991; Rigaud i Juchault, 1993).
3. **Partenogènesi**. Les femelles infectades són capaces de reproduir-se asexualment a partir d'òvuls no fecundats, produint filles com a descendència. La partenogènesi per la presència de *Wolbachia* s'ha observat en Hymenoptera (Stouthamer i col., 1993; Zchori-Fein i col., 1995).
4. **Incompatibilitat citoplasmàtica**. La relació causa efecte entre *Wolbachia* i la incompatibilitat citoplasmàtica va ser establerta per primera vegada per Yen i Barr (1971). Aquesta incompatibilitat pot afectar a les freqüències dels haplotips mitocondrials. Els mascles infectats únicament poden generar una descendència normal (en nombre) si s'aparellen amb femelles infectades per *Wolbachia*. La incompatibilitat citoplasmàtica es produeix quan l'esperma d'un mascle infectat fecunda l'òvul d'una femella no infectada i, com a resultat, l'embrió té mitosis anormals i mor. Tots els demés encreuaments donen descendència viable (De

Crespigny i col, 2006) encara que en alguns d'ells es pot presentar una distorsió de la proporció de sexes. També es pot produir incompatibilitat citoplasmàtica bidireccional. Es el cas d'entrecreuaments entre mascles i femelles infectats de soques distintes de la mateixa espècie o d'espècies diferents de *Wolbachia*.

S'està estudiant també la importància de *Wolbachia* en el manteniment de l'estructura poblacional (Dean i col., 2003; De Crespigny i col, 2006), així com en els processos d'aïllament sexual (Koukou i col., 2006), on s'ha vist que la presència de *Wolbachia* actua com un factor additiu que contribueix al nivell d'aïllament entre poblacions de *Drosophila melanogaster*.

Per a conèixer si una població d'insectes està infectada per *Wolbachia*, es fa una anàlisi per PCR de les seqüències dels gens rDNA16S específics de *Wolbachia*. Estudis en diferents taxons d'insectes han indicat que tots ells estan molt relacionats i pertanyen a la subdivisió de proteobacteris, formant un grup monofilètic assignat al tipus d'espècie *W. pipientis* (Breeuwer i col., 1992; O'Neill i col., 1992; Rousset i col., 1992; Stouthamer i col., 1993). L'eradicació de *Wolbachia* del teixit de l'insecte és possible mitjançant un tractament amb antibiòtic (tetraciclina), o amb un xoc a elevades temperatures.

A les poblacions locals i de laboratori de *Drosophila subobscura* emprades en aquest estudi, no s'ha detectat la presència d'aquest paràsit. Assaigs de PCR per a *Wolbachia* s'han realitzat diverses vegades i sempre han proporcionat resultats negatius (Figura 10). García-Martínez i col. (1998) realitzaren aquesta prova a una població d'Esporles (Mallorca), mentre que Christie i col. (2004) realitzaren la mateixa prova a una població de Calvià (Mallorca). A més a més, mai s'han observat efectes de incompatibilitat citoplasmàtica, com ara mort embriònica o una distorsió en la proporció de sexes a entrecreuaments entre distintes línies.

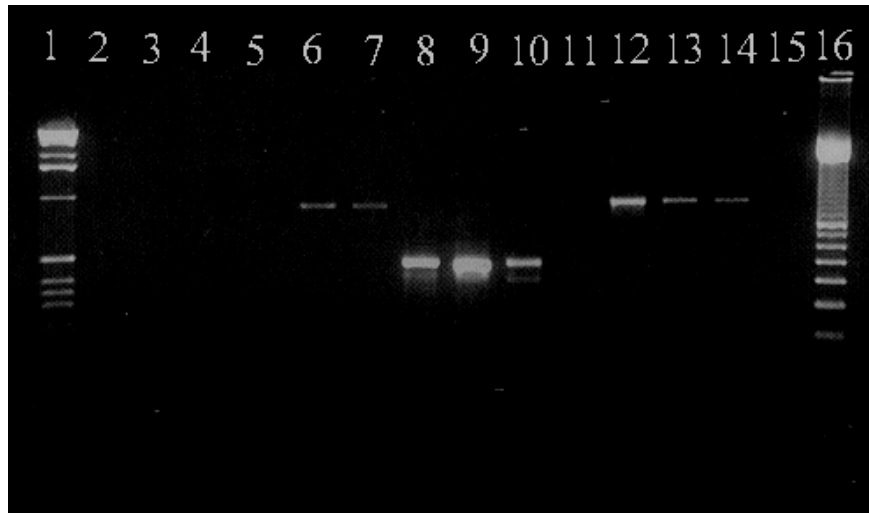


Figura 10. Gel d'electroforesi amb resultat negatiu per a *Wolbachia* (García-Martínez i col, 1998). Els pouets 1 i 16 porten marcadors de pes molecular. Els pouets 2, 3 i 4 corresponen a DNA total de *D. subobscura* amplificat amb encebadors 16S rDNA específics de *Wolbachia* (s'observa absència d'amplificació). Els pouets 8, 9 i 10 són les mateixes mostres però amplificades amb encebadors V4-18S rDNA de *D. subobscura*. Els pouets 12, 13 i 14 són les mateixes mostres però amplificades amb encebadors per a la subunitat ND5 de *D. subobscura*. Els pouets 5, 11 i 15 són controls negatius per a cada encebador (s'observa absència d'amplificació). Els pouets 6 i 7 porten DNA de *Wolbachia* de dues soques de *S. oryzae* amplificades amb encebadors específics 16S rDNA.

1.5. Selecció: components d'eficàcia biològica i característiques de la història de la vida

La "teoria de la història de la vida" (*Life-History Theory*) és una teoria de la biologia evolutiva que postula que els punts clau a la vida dels organismes (cicle vital) són modulats per l'acció de la selecció natural amb l'objectiu de poder produir el nombre més gran possible de descendents reproductors. Es considera que aquests punts clau són principalment la taxa de desenvolupament juvenil, l'edat de maduresa sexual, la primera reproducció, el nombre de descendents, el nivell d'inversió parental en les seves cries, l'envelliment i la mort, i que depenen de l'entorn físic i ecològic dels organismes. La "teoria de la història de la vida" és una teoria dels cicles vitals, però és encara més: és una teoria de l'eficàcia biològica (*fitness*).

Es coneix com a *eficàcia biològica* la capacitat d'un individu portador d'un cert genotip de reproduir-se, de deixar progènie o descendents, de transmetre els seus gens, o de deixar la seva empremta al conjunt dels gens de la següent generació. Si les diferències entre distints genotips afecten l'eficàcia biològica, llavors, les freqüències dels genotips canviaran i els genotips que proporcionin una major eficàcia augmentaran en proporció. Hi ha dues mesures de l'eficàcia biològica: *l'eficàcia absoluta*, com a

quocient entre el nombre d'individus amb un genotip després i abans d'un procés de selecció; i l'*eficàcia biològica relativa*, és a dir, l'habilitat d'un genotip particular relatiu a altres genotips, de transmetre al·lels a la següent i successives generacions.

Maynard Smith (1989) va definir l'eficàcia biològica com una propietat, però no d'un individu, sinó d'una classe d'individus. Llavors el nombre de descendents (o la contribució d'al·lels) a la següent generació realment significa el nombre mitjà de descendents, no el nombre de descendents (o contribució al·lèlica) d'un individu particular. I ho va explicar amb un exemple il·lustratiu: "si el primer infant humà amb un gen per a la levitació fos mort per un llamp al seu cotxet de bebè, això no provaria que aquest nou genotip tingués una baixa eficàcia biològica, només que aquest nin hauria estat desafortunat".

Per a evitar la redundància i les explicacions *ad hoc* de les definicions de l'eficàcia biològica, establertes només en termes de selecció passada, necessitem definicions o models d'eficàcia biològica, que es puguin fer servir per a generar prediccions. Models com, per exemple, "l'èxit reproductiu" o la "taxa intrínseca d'increment" d'un genotip que codifica per a un cert conjunt de característiques fenotípiques, són sempre establerts en termes de caràcters d'història de la vida (*life-history traits*), com, per exemple, el temps de generació i la fecunditat (Nylin i Gotthard, 1998).

1.5.1. Components de l'eficàcia biològica

En termes d'eficàcia biològica, la selecció diferencial es pot donar a totes, o a qualsevol etapa del cicle complet d'una generació d'un organisme, com a l'estadi gamètic, juvenil o d'adult. Els aspectes del cicle de la vida d'un organisme, poden ser organitzats per a reflectir la selecció a distintes etapes. En aquest aspecte, Bundgaard i Christiansen (1972) dividiren la totalitat de la selecció en quatre components majoritaris: viabilitat (zigòtica), sexual, gamètica, i fecunditat (Figura 11). Aquest esquema general es pot emprar a insectes, mamífers, plantes i altres organismes, tenint en compte els aspectes que són més importants de cada espècie en particular (Hedrick, 2000). D'aquestes diferents components, la selecció que afecta a la viabilitat o supervivència ha estat emfatitzada sovint dins la genètica poblacional, en part perquè és la més fàcil de quantificar i d'emprar en models teòrics, però distints estudis indiquen que, a moltes situacions, la selecció sexual, la gamètica i la de la fecunditat poden ser igual d'importants.

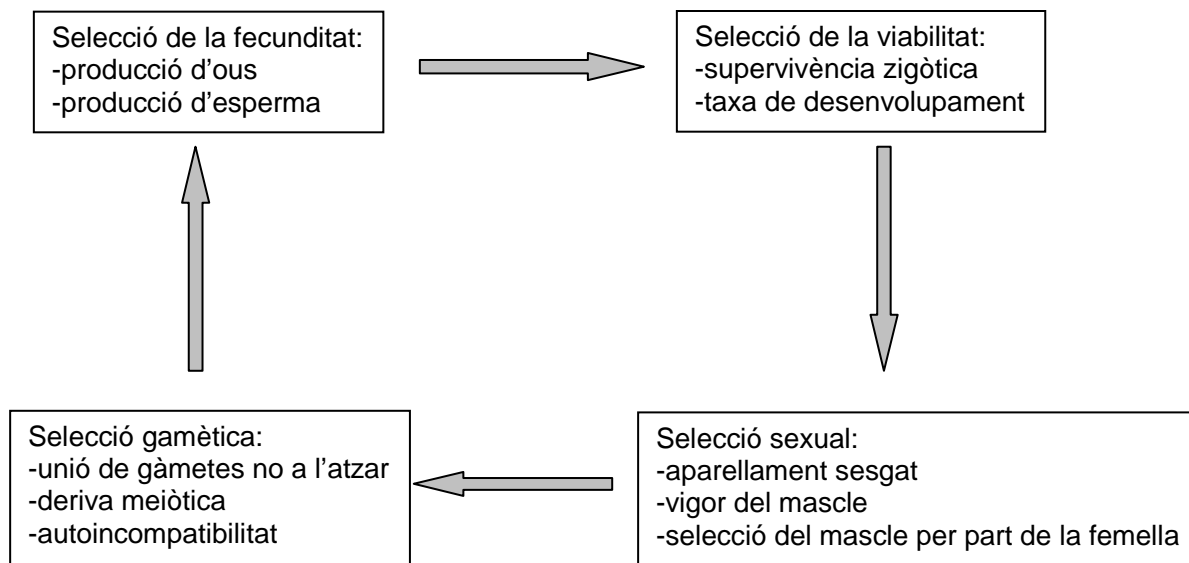


Figura 11. Diagrama que mostra la divisió de la selecció en components, a través d'un cycle generacional complet, amb exemples de tipus de selecció a cada etapa (segons Bundgaard i Christiansen (1972), amb modificacions).

Una generació comença amb una determinada composició de zigots, que es veu modificada per una supervivència diferencial a les diverses etapes de la vida (selecció de la viabilitat). Als insectes holometàbols, podem considerar la supervivència dels ous, de les larves, de les pupes i dels adults abans d'aparellar-se. A més a més, a molts organismes, els factors ambientals poden variar en els dos sexes, és a dir, per a unes mateixes condicions, mascles i femelles poden tenir distintes viabilitats. Addicionalment, diferents taxes de desenvolupament (temps necessari per a superar cada etapa), poden influir o modificar les proporcions dels distints genotips que s'obtidran a etapes posteriors. En el present estudi es realitzaren diferents experiments, per a estudiar i avaluar les viabilitats i temps de desenvolupament ou-larva i larva-adult. Els resultats indicaren la importància de les relacions citonuclears i de la selecció sobre el mtDNA.

La selecció sexual es produeix quan les proporcions genotípiques de mascles i femelles reproductors, no són les mateixes que entre els adults que aconseguen aparellar-se. Per exemple, algunes combinacions genotípiques de mascles i femelles, poden ser afavorides per aparellaments esbiaixats entre tipus semblants o distints. Els mascles poden tenir un vigor distint per a l'aparellament, o les femelles poden tenir una receptivitat distinta als mascles, degut a variacions de la seva capacitat d'elecció. Els aparellaments esbiaixats poden ser *positius*, quan es produeixen més aparellaments

entre individus semblants que els esperats si fossin a l'atzar, o poden ser *negatius*, a on en canvi, es produeixen més aparellaments dels esperats entre individus no semblants. Castro i col. (2003) estudiaren aquesta capacitat en l'aparellament dels individus amb haplotips I i II del mtDNA en *Drosophila subobscura*. El patró d'aparellament indicà un aparellament esbiaixat, on les parelles del mateix haplotip mitocondrial eren les més freqüents, principalment les de l'haplotip I; però les significacions detectades a poblacions de laboratori, no es varen observar a poblacions naturals, on es donà l'aparellament a l'atzar.

A part dels aparellaments esbiaixats, hi ha altres tipus de selecció sexual. Darwin (1871), ja va reconèixer que els mascles poden tenir un vigor distint per a l'aparellament (quan els mascles competeixen entre ells per a les femelles), i que les femelles poden tenir una receptivitat als mascles distinta (quan tenen capacitat d'elecció i són elles qui elegeixen als mascles). En molts d'aquests casos, els mascles tenen unes característiques morfològiques i del comportament extremes i, s'assumeix, que les variacions en les característiques fenotípiques, indiquen diferències en la seva qualitat genètica (Wilkinson i col., 1998). Un altre tipus de selecció sexual és aquell del "mascle rar" o d'aparellament dependent de la freqüència. Es produeixen casos a on es produeix un avantatge per a l'aparellament dels mascles, quan aquests són del tipus rar o menys freqüent. Ayala (1972) va detectar a *Drosophila pseudoobscura* que, a distints percentatges, els mascles amb una inversió cromosòmica minoritària, tenien major probabilitat d'aparellar-se del que s'esperava. Castro i col. (1985), varen estudiar aquesta dinàmica de selecció dependent de la freqüència, en tres soques de *Drosophila melanogaster* a nivell de mono-, di- i tricultius.

En algunes situacions, es pot donar selecció gamètica, atès que els gàmetes no són produïts pels individus heterozigots en proporcions equivalents, com és el cas de la deriva meiótica (distorsió a la segregació), o pot haver una unió de gàmetes no a l'atzar respecte als distints al·lels. En aquests casos, les proporcions zigòtiques poden no reflectir les freqüències al·lèliques dels genotips parentals, com s'espera segons la segregació mendeliana i la unió a l'atzar de gàmetes.

La selecció de la fecunditat es dona quan la contribució al conjunt de la següent generació, varia amb el tipus d'aparellament mascle-femella. Es considera que la selecció de la fecunditat és deguda, principalment, a les diferències en el potencial gamètic de les femelles, ja que la producció d'esperma no sol ser limitant, encara que s'ha demostrat recentment que, mutacions deletèries al mtDNA, afecten principalment a

la fertilitat masculina (Gemmell i col., 2004). A més a més, la posta d'ous al llarg del temps, pot ser un factor important que determini la contribució a la següent generació. En quant a *Drosophila subobscura*, també s'han realitzat experiments per a l'estudi de la selecció de la fecunditat. Castro i col. (2003) determinaren a poblacions de laboratori, que les femelles tenien més descendència quan eren aparellades amb mascles de l'haplotip I, que quan eren aparellades amb mascles de l'haplotip II. En l'estudi que presentem en aquesta tesi, determinarem que el mtDNA pot afectar el nombre de descendents que pot tenir una femella, així com que alguns haplotips mitocondrials, especialment els rars, poden tenir un efecte negatiu sobre la fertilitat.

1.5.2. Característiques de la història de la vida

Hem vist que la "teoria de la història de la vida" postula que els punts clau a la vida dels organismes, són modulats per l'acció de la selecció natural, amb l'objectiu de poder produir el nombre més gran possible de descendents reproductors. Aquests punts clau inclouen els components d'eficàcia biològica que ja hem vist, organitzats per etapes del cycle biològic per en Bundgaard i Christiansen (1972), però s'han d'incloure altres components clau del cycle vital.

Les característiques de la història de la vida són trets que afecten al cycle vital d'un organisme, i es poden imaginar com a diverses inversions, per part d'aquests organismes, en creixement, reproducció i supervivència. Exemples específics d'aquests trets són: l'edat de la primera reproducció, el temps que els individus són reproductors, la senescència, la longevitat, el nombre i la mida dels descendents, la resistència a condicions adverses, etc. Variacions en aquestes característiques o trets, poden dependre dels diferents ambients en que es poden trobar els organismes i, reflecteixen, distintes inversions dels recursos limitats amb que es troben els individus. Recursos com el temps, l'esforç o el cost energètic, que s'han d'optimitzar per a poder sobreviure i, a la vegada, produir el màxim nombre de descendents reproductors. Com a conseqüència, la inversió en un tret redueix la inversió en altres trets. Per exemple, Rose i Charlesworth (1981) varen observar a *Drosophila melanogaster*, que una baixa fecunditat a edat primerenca, es recompensava amb una major longevitat. Això es coneix com a *pleiotropia antagonista*, on es produeix una correlació negativa entre diferents components de la selecció.

Les característiques de la història de la vida a les espècies, poden canviar per motius de densitat poblacional o per canvis en l'estabilitat de l'ambient. Hi ha distints

models que donen explicacions alternatives, respecte a l'adaptació de les característiques del cicle vital:

- **El model de selecció r-K.** Proposat per primera vegada per MacArthur i Wilson (1967), prediu que a un ambient amb recursos abundants, on el creixement poblacional pot ser exponencial i, on els organismes estan exposats principalment a una mortalitat independent de la densitat; la població evolucionarà cap a una combinació de maduresa precoç, major fertilitat, i major esforç reproductiu, però menor longevitat. En canvi, a un ambient amb recursos escassos, a on una població s'aproxima a la capacitat de càrrega de l'entorn, on la mortalitat serà depenen de la densitat; la selecció afavorirà l'increment de l'habilitat competitiva i s'observaran les característiques contràries.
- **L'estratègia de *bet-hedging*.** Segons la definició de Ripa i col. (2010), aquesta estratègia redueix la variància temporal de l'eficàcia biològica, a costa de baixar la seva mitjana. En ambients fluctuants, si el major impacte és sobre la mortalitat juvenil, la selecció natural afavorirà la reducció de l'esforç reproductiu i augmentarà la longevitat; en canvi, si el major impacte és sobre la mortalitat adulta, es seleccionaran els trets oposats. Es postula el contrari que al model r-K.
- **Models dinàmics a l'espai i al temps i amb pressions selectives múltiples.** Segons la revisió de Matos i col (1990), aquests models s'apliquen perquè els ambients són temporal i espacialment heterogenis, per la qual cosa la força de la selecció no és unidireccional i pot variar de un moment i/o lloc a un altre, és a dir, no hi ha un òptim constant. Les estratègies poden ser temporalment dinàmiques, es poden afavorir polimorfismes, diverses estratègies poden coexistir a una mateixa població, i es pot afavorir la plasticitat fenotípica. Per tant, les característiques de la història de la vida resultants, són una resposta adaptativa única a la totalitat de l'ambient.

Les característiques del cicle vital que no poden considerar-se com a components d'eficàcia biològica, tenen a veure bàsicament amb la supervivència dels individus. Components emprats a diferents estudis, inclouen la resistència a la dessecació (Gibbs, 2002), la mida dels adults, que es determina mesurant la longitud de les ales (Gilchrist i col., 2004), l'adaptació a nous ambients amb elevades condicions de densitat (Mueller i col., 1993), la senectut (Rose, 1984), la temperatura (Huey i col.

1991), la longevitat (Matos i col., 2000), i la divergència poblacional (Kennington i col., 2001), entre altres.

A continuació es comenten els components estudiats al nostre laboratori:

La "resistència a la dessecació" és un problema particularment important, per a insectes i altres petits organismes que viuen a ambients àrids o amb estacions seques. A *Drosophila*, les espècies i poblacions que viuen a aquests ambients, han de presentar adaptacions per a sobreviure. En aquest context, Gibbs (2002) va determinar que espècies de *Drosophila* que viuen a ambients àrids, perden aigua menys ràpidament i són capaces de tolerar la pèrdua d'un major percentatge d'aigua corporal. Poblacions de laboratori seleccionades per a tolerar l'estrès a la dessecació, també presenten aquestes adaptacions, però difereixen en què els individus presenten un major contingut en aigua, no tenint les mateixes respostes davant condicions de dessecació.

La mida de les ales és la forma més emprada per a extrapolar la grandària dels individus. La mida del cos i de les ales de diversos drosofilids, a l'igual que a *Drosophila subobscura*, presenten variacions latitudinals (Gilchrist i col. 2001) i estacionals (Kari i Huey, 2000), i s'ha demostrat una relació amb els polimorfismes cromosòmics (Orengo i Prevosti, 2002). Mentre que a poblacions europees s'ha observat una clina, on la grandària de les ales augmenta amb la latitud, a poblacions nord americanes, amb una existència de només 30 anys, s'ha desenvolupat la mateixa clina, imitant la línia ancestral (Huey i col. 2000). A més a més, a *Drosophila*, la mida de les ales s'ha correlacionat amb diversos components d'eficàcia biològica (Monclús i Prevosti, 1971; Taylor i Kekic, 1988; Santos i col., 1992).

La "senectut" (envelliment) es defineix com la baixada en el rendiment o eficàcia biològica amb l'avanç de l'edat. La senectut és una característica gairebé universal als organismes pluricel·lulars, i la comprensió de per què es dona és un problema clàssic a biologia. L'evolució de la senectut s'explica mitjançant dos mecanismes genètics distints, que no s'exclouen mutualment (Hughes i Reynolds, 2005). Primer, la hipòtesi de *la pleiotropia antagonista* prediu que la senectut és una conseqüència de la fixació d'al·lels amb efectes pleiotròpics, que afavoreixen una major eficàcia de jove, però amb un cost a edats posteriors. Segon, la hipòtesi de *l'acumulació de mutacions*, suggereix que la senectut és deguda a l'acumulació de mutacions deletèries, amb efectes sobre l'eficàcia a edats tardanes, dins d'un equilibri de mutació-selecció.

1.5.3. Determinació de la selecció

Determinar o fer estimacions de la selecció no és senzill. En estudiar l'eficàcia biològica d'un genotip, es determina sempre una eficàcia biològica relativa, definida com l'habilitat d'un genotip particular, relatiu a la d'altres genotips, de transmetre al·lels a la següent i successives generacions. Encara que pareixi un concepte senzill, la mesura dels valors de les eficàcies biològiques relatives, per a distints genotips, és complicat (Hedrick i Murray, 1983). L'eficàcia biològica relativa no només depèn dels genotips presents, sinó també de l'entorn en el qual aquests genotips coexisteixen. Mentre que un genotip pot tenir una eficàcia biològica relativa elevada a un entorn, pot presentar un baix rendiment a un altre. Hi ha multitud de factors ambientals, que potencialment afecten l'eficàcia biològica relativa: factors físics, com la temperatura, humitat, tipus de substrat, etc.; factors biòtics d'altres espècies, com competidors interespecífics, predadors, preses, hostes i paràsits; i la composició de la població considerada: nombre d'individus, densitat poblacional, distribució d'edats, i proporcions genotípiques. Generalment, aquestes determinacions són aplicades a poblacions de laboratori, o també a poblacions naturals, sempre ben establertes i on altres factors estan controlats; però diversos components de la selecció, poden ser també avaluats a poblacions naturals.

Dobzhansky (1955) va suggerir que la genètica poblacional necessitava mètodes fiables, per a poder comparar les eficàcies biològiques de distintes poblacions. A la genètica poblacional, l'eficàcia biològica d'una població es defineix com a la mitjana ponderada de les eficàcies biològiques relatives dels seus genotips. Però, en aquest sentit, l'eficàcia biològica d'una població és d'un valor limitat per ser utilitzada en les comparacions entre poblacions, degut a què és una mitjana de valors relatius, mesurats dins d'una població. Com a intent d'enfocar allò que és evolutivament important, Dobzhansky (1970) va definir la mesura absoluta d'adaptabilitat, com l'habilitat d'una població, organisme, o genotip de sobreviure i reproduir-se a un ambient determinat. En aquest context, en els estudis d'ecologia poblacional, són útils com a mesures, la taxa intrínseca d'increment i la capacitat de càrrega a determinats ambients. En canvi, s'empren habitualment, per la seva facilitat d'ús, dues mesures relacionades: la productivitat (el nombre o la biomassa d'adults produïts a la població, per unitat de temps) i la grandària poblacional (la biomassa mitjana o nombre d'individus que viuen a la població).

En aquests termes, s'han realitzat treballs d'investigació amb *Drosophila*

subobscura, per a intentar resoldre les forces evolutives involucrades en el patró de haplotips. Fos i col. (1990) posaren a competir en caixes de poblacions als haplotips I i VIII; l'augment de freqüència i fixació d'un haplotip *versus* un altre depenia del genoma nuclear amb el que estaven associats. D'igual manera, García-Martínez i col. (1998) i Oliver i col. (2005), posaren a competir els haplotips I i II sobre un genoma nuclear heterogeni. Mentre que al primer estudi es va imposar l'haplotip II sobre l'haplotip I, al segon, ambdós haplotips seguien coexistint després de 33 generacions. En el treball actual que es presenta, per tal d'aprofundir en aquesta dinàmica, s'estudiaren les densitats òptimes per als dos haplotips majoritaris I i II, com a mesures poblacionals de l'història de la vida de *Drosophila subobscura*.

1.5.4. Mutacions i canvis en l'eficàcia biològica.

Una classe de variants genètiques, consisteix en el grup format per aquelles que tenen un efecte demostrable sobre l'eficàcia biològica, normalment desavantatjós a la natura. Aquestes variants poden ésser reconegudes com a mutants visibles, pels seus efectes fenotípics sobre altres caràcters, o només es posen de manifest pel seu efecte sobre l'eficàcia biològica, com succeeix amb moltes mutacions letals. Les letals o variants perjudicials, poden no ser representatives de les variants genètiques a una població, perquè provoquen conseqüències fenotípiques extremes, i perquè el seu efecte negatiu sobre l'eficàcia biològica les condueix a baixes freqüències. Per altra banda, loci amb formes variants que contribueixen a l'eficàcia biològica, especialment aquells amb efectes positius, són el "material de l'evolució", encara que només es coneixen pel seu efecte sobre l'eficàcia biològica i no puguin ser caracteritzades més enllà (Hedrick, 2000).

Virtualment, tota població que s'ha mostrejat extensivament, té variants morfològiques presents en baixes freqüències, que tenen efectes dràstics o fenotípicament perjudicials. Com a exemples, l'albinisme a moltes espècies animals i la deficiència de clorofil·la a les plantes. De la mateixa manera, es poden considerar com habituals al·lells perjudicials sense efectes fenotípics visibles, però que sí tenen efectes sobre l'eficàcia biològica. A diverses espècies de *Drosophila*, s'han fet estudis d'identificació i quantificació de mutacions letals, i s'ha estimat que la proporció aproximada de gens letals per cromosoma, a *Drosophila melanogaster*, pot variar entre 0,12 i 0,95 segons la població (Dobzhansky, 1970). En quant a l'espècie humana, l'estimació és que cada persona és heterozigòtica per a entre quatre i sis al·lells

perjudicials o letals, mentre que un 1% dels nadons és homozigot per al menys un d'ells (Hedrick, 2000; pàg. 38). Tant les mutacions visibles com les mutacions letals, pareixen ser relativament infreqüents, i probablement no són els principals determinants de la considerable variació observada en l'eficàcia biològica dels diferents individus. Llavors, hi deu haver variants que, individualment, afecten l'eficàcia biològica o al fenotip de maneres més subtils, que són la base del canvi evolutiu. Aquestes variants, denominades *modificadors d'eficàcia*, poden investigar-se de la mateixa manera que els letals.

En el cas dels gens nuclears, pels quals els organismes són generalment diploides, moltes d'aquestes variants solen ser recessives, i només apareixen en casos de consanguinitat, o com a resultat de l'estudi d'una mostra gran. En el cas de mutacions perjudicials al DNA mitocondrial, aquests al·lels perduren, encara que siguin lleugerament deleteris, al tractar-se d'un genoma haploide. S'ha constatat un elevat nombre de malalties associades al mtDNA i es pensa que és el resultat d'una o més, de les quatre característiques principals del genoma mitocondrial: la seva elevada taxa de mutació, l'aparent falta de recombinació, el seu reduït nombre poblacional efectiu, i la seva transmissió materna. A més a més, es considera que una important proporció de diversitat intraespecífica del mtDNA, resulta de mutacions lleugerament deletèries que només es fixen rarament (Rand i Kann, 1996; Nachman, 1998). En aquest sentit, a les poblacions de *Drosophila subobscura*, hi ha normalment un 5% aproximat d'haplotips mitocondrials rars, variants presents a només una localitat, a part dels dos haplotips majoritaris amb una equidistribució geogràfica i temporal. Diferents estudis han intentat determinar quines forces evolutives determinen la distribució d'aquests haplotips a la natura (Afonso i col., 1990; García-Martínez i col., 1998; Moya i col., 1993; Christie i col., 2010). Els resultats han apuntat fins ara, com a mecanismes possibles: la deriva genètica, la coadaptació citonuclear i la selecció directa al mtDNA.

La selecció directa al mtDNA és possible sempre i quan existeixin canvis no sinònims. La seqüenciació de la regió *ND5* a una gamma d'haplotips (**I**, **II** i **rars**) duita a terme per Castro i col. (2010), va provar l'existència de canvis nucleotídics no sinònims, encara que els canvis sinònims eren molt més freqüents. Així, aquest autors proposaren que, el polimorfisme a la regió *ND5* era més consistent, amb expansions poblacionals després de colls d'ampolla (deriva genètica). Per això, en l'estudi que es presenta, s'estudiaren els components d'eficàcia biològica als haplotips **rars**, per saber si es comporten com a variants neutres o no.

2. OBJECTIUS

L'**objectiu principal** d'aquest treball ha estat intentar contribuir al coneixement de les forces evolutives implicades en el manteniment espacial i temporal, del patró d'haplotips mitocondrials de *Drosophila subobscura*, observades a les seves poblacions naturals. Per aconseguir-lo, es varen realitzar una sèrie d'estudis amb objectius més específics:

1. Determinar el valor dels components d'eficàcia biològica i del cicle vital als dos haplotips majoritaris de DNA mitocondrial de *Drosophila subobscura*

1.1. Determinar la viabilitat i el temps de desenvolupament ou-larva i larva-adult per a cada haplotip.

1.2. Estudiar la resistència a la dessecació en els adults en condicions òptimes i de forma individual, separant mascles de femelles, de cada haplotip.

1.3. Esbrinar el temps de vida d'un individu (longevitat) en condicions òptimes d'aliment i d'humitat, en estat adult.

1.4. La determinació de la densitat òptima per a cada haplotip. Aquest paràmetre està relacionat amb la capacitat d'aprofitament del medi de cultiu, tant a nivell alimentari com d'espai vital.

2. Estudiar la dinàmica de la variabilitat haplotípica del DNA mitocondrial a una població de *Drosophila subobscura* durant un període de dos anys

2.1. Analitzar la diversitat estructural, a nivell d'haplotips mitocondrials, d'una població natural de *Drosophila subobscura*, i comparar els resultats amb aquells d'estudis anteriors respecte a l'homogeneïtat geogràfica, dels dos haplotips mitocondrials majoritaris.

2.2. Realitzar un estudi de seguiment temporal minucios (mensualment), dels haplotips mitocondrials durant dos anys, i comparar els resultats amb aquells d'estudis anteriors respecte a l'homogeneïtat temporal, dels dos haplotips mitocondrials majoritaris.

3. Analitzar els efectes del DNA mitocondrial sobre l'eficàcia biològica a *Drosophila subobscura*

3.1. Estudiar l'eficàcia biològica dels haplotips rars, respecte als haplotips majoritaris.

3.2. Avaluar l'eficàcia biològica de l'haplotip **VIII**, endèmic de les Illes Canàries.

3.3. Valorar la importància de l'herència nuclear, comparant dues isolínies amb el mateix haplotip mitocondrial, però amb distint genoma nuclear.

3. PUBLICACIONS

Fitness and life-history traits of the two major mitochondrial DNA haplotypes of *Drosophila subobscura*

JS Christie¹, JA Castro¹, P Oliver¹, A Picornell¹, MM Ramon¹ and A Moya²

¹Laboratori de Genètica, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Edifici Guillem Colom, Universitat de les Illes Balears, Campus de la UIB, Palma de Mallorca, Balears 07122, Spain.

²Institut 'Cavanilles' de Biodiversitat i Biologia Evolutiva i Departament de Genètica, Universitat de València, Burjassot, València, Spain.

Heredity (2004) 93: 371–378

Abstract

Mitochondrial DNA restriction site analyses on natural populations of *Drosophila subobscura* have proved the existence of two common, coexisting haplotypes (I and II), as well as a set of less frequent ones derived from them. To explain this distribution, experiments to date point practically to all possible genetic mechanisms being involved in the changes of gene frequencies (cytonuclear coadaptation, direct natural selection on mtDNA and genetic drift). In an attempt to find differences that help to understand the dynamics of these haplotypes and to detect the effect of selection, we measured certain fitness components and life-history traits (egg–larva and larva–adult viabilities and developmental times, longevity, resistance to desiccation and optimal density) of the two main haplotypes I and II when maintained in laboratory population cages. As a general trend, haplotype II showed a higher net fitness than haplotype I, which explains the superiority of haplotype II over haplotype I in experimental populations but not their coexistence in nature, where additional factors must be considered.

Keywords: fitness components; natural selection; cytonuclear interactions; mtDNA haplotypes; *Drosophila subobscura*

Resum

Les anàlisis de llocs de restricció de DNA mitocondrials en poblacions naturals de *Drosophila subobscura* han demostrat l'existència de dos haplotips comuns, coexistent (I i II), així com un conjunt d'haplotips menys freqüents que deriven dels primers. Per explicar aquesta distribució, els experiments fins avui assenyalen pràcticament a tots els mecanismes genètics possibles que estan implicats en els canvis de freqüències de gens (coadaptació citonuclear, selecció directa del mtDNA, i deriva genètica). En un intent de trobar diferències que ajudin a entendre la dinàmica d'aquests haplotips i detectar l'efecte de selecció, hem mesurat certs components de fitness i trets d'història de vida (viabilitats i temps de desenvolupament ou-larva i larva-adult, longevitat, resistència a la dessecació i densitat òptima) dels dos haplotips principals I i II mantinguts en poblacions de laboratori. Com a tendència general, l'haplotip II va mostrar una eficàcia biològica neta més alta que l'haplotip I, el que explica la superioritat de l'haplotip II sobre l'haplotip I en poblacions experimentals però no la seva coexistència en la natura, on s'han de considerar factors addicionals.

Paraules clau: components d'eficàcia; selecció natural; interaccions citonuclears; haplotips de mtDNA; *Drosophila subobscura*

Introduction

It is a constant observation in the Old World that *Drosophila subobscura* shows widespread geographical homogeneity with a high prevalence of two main and coexisting mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes at the level of restriction site analyses (named I and II), as well as a set of less common haplotypes, derived from these two, which appear at much lower frequencies (Latorre *et al.*, 1992; García-Martínez *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 1999; Oliver *et al.*, 2002). Studies on populations colonizing the New World have given similar results (Rozas *et al.*, 1990). The unique exception to date has been detected on the Canary Islands, where an endemic haplotype (named VIII) is predominant on some islands. In recent years, we have studied the dynamics of these haplotypes, trying to answer the questions as to why the two main haplotypes are approximately equally frequent in nature and which evolutionary forces are implicated. Moya *et al.* (1993) studied the degree of differentiation of the two haplotypes at the nucleotide level. A total of 2377 bp from six mtDNA functional regions, representing 15% of the mtDNA genome, were sequenced per haplotype. Only three differences were found and they proved to be silent changes at the protein level, one of which corresponded to the HaeIII restriction site, located in the ND5 gene, which distinguishes the haplotypes. On the basis of these results, as well as others involving the geographical distribution, they considered haplotypes I and II to be phenotypically equivalent, although it is possible (and even probable) that further sequencing could reveal significant differences between the two mtDNAs in the remaining 85% (Moya *et al.*, 1993). In fact, when these haplotypes were put together at different frequencies in population cages, haplotype II always displaced haplotype I (García-Martínez *et al.*, 1998). Likewise, in another study, when haplotypes I and VIII were put together to compete in population cages at different densities and nuclear backgrounds, the mtDNA haplotype that reached fixation was the one placed within its own nuclear background, thus indicating the importance of nuclear–mtDNA coadaptation (Fos *et al.*, 1990). More recently, Castro *et al.* (1999) and Oliver *et al.* (2002) proved the existence of transient cytonuclear disequilibria, with nuclear allozyme loci and chromosomal arrangements. In summary, different studies to date have pointed practically to all the populational mechanisms that can change gene frequencies (cytonuclear coadaptation, direct natural selection on mtDNA and random genetic drift) as being forces potentially acting on the mtDNA haplotypes.

The present research falls within the series of studies that many groups have been carrying out in recent years, on the populational forces that are acting on the mtDNA. In the literature, studies concerning the population genetic dynamics of mtDNA have often, although not always, rejected neutral patterns, mainly in humans and their associated commensal taxa (flies and mice) (see, Gerber *et al.*, 2001, for a recent revision). Similarly, studies on other species of *Drosophila* have also observed non-neutral behaviour of mtDNA variants (Hutter and Rand, 1995) and have provided evidence that maintenance of mtDNA variability could be mediated through cytonuclear interactions (Clark and Lyckegaard, 1988; MacRae and Anderson, 1988; but see Singh and Hale, 1990, for an alternative view). Rand *et al.* (2001) recently showed that nuclear-cytoplasmic polymorphisms could also be maintained by interaction between X-chromosomes and cytoplasm.

In the present work, research was focused on fitness components and life-history traits as components of natural selection. These components have been extensively reported in the literature for several organisms. In *Drosophila*, the adaptation to novel environments involving high-density conditions has been studied (Mueller *et al.*, 1993), as well as senescence (Rose, 1984), starvation (Rose *et al.*, 1992), temperature (Huey *et al.*, 1991), fecundity, longevity and developmental time (Matos *et al.*, 2000), and population divergence (Kennington *et al.*, 2001) among others.

Therefore, the purpose of this work was the detection of the differential action of natural selection on flies with these mtDNA haplotypes. The study was a continuation of the work we have been undertaking on the forces acting on the populational dynamics of the two haplotypes (I and II). Thus, we studied the egg–larva and larva–adult viabilities and developmental times, longevity and the resistance to desiccation. In addition, we also studied the optimal density (OD) (density at which the food medium yields the highest number of adult individuals) to measure the way in which the medium is exploited (Wallace, 1981; Castro *et al.*, 1985). Other fitness components, such as mating pattern and female fertility, which are especially important in mtDNA dynamics due to maternal inheritance, were studied in flies from population cages (the same used in the present paper) and in a recently collected lines from a natural population (Castro *et al.*, 2003).

Materials and methods

Haplotype populations

Two different populational cages were founded, one with haplotype I and another with haplotype II. The cage with haplotype I was created with 71 isofemale lines and the cage with haplotype II with 98. The isofemale lines were collected in a pine forest near Calvià (Majorca, Spain) in the spring of 1997, and the mtDNA haplotypes determined as indicated in Castro *et al.* (1999). Each isoline contributed approximately five males and five females. They were maintained in the laboratory at 19°C, 70% relative humidity, a 1:1 day–night cycle and with 12 jars containing corn-meal food. The mean number of individuals was approximately 1500 per generation. From these cages, two samples, one with 18 haplotype I isofemales and another with 21 haplotype II isofemales, were obtained in order to establish separate populations for the experiments. When these samples were taken, the cages had passed nine discrete generations. The mtDNA haplotypes of these isofemales were checked through the offspring by a simple mtDNA analysis (Castro *et al.*, 1999). The use of 18 and of 21 isofemale lines, respectively, should be enough to capture 95% of the variability in nuclear alleles that is present in the cages (Hedrick, 2000, p. 240). These two new populations were maintained by serial transfer in five 500 ml bottles, during the time that the experiments were being performed.

Presence of Wolbachia

To exclude an incompatibility system in *D. subobscura*, promoted by the presence of *Wolbachia*, a PCR assay using 16S rDNA *Wolbachia*-specific primers was carried out following the methodology of García-Martínez *et al.* (1998). Six lines were used at random (three of haplotype I and three of haplotype II) from the Calvià population before creating the cages. Since the results were negative, the presence of *Wolbachia* in the population was excluded. We only used a few lines of *D. subobscura* because this determination was the second one made on the island of Majorca. The first one was in a different population (Esporles) a few years ago and was also negative (García-Martínez *et al.*, 1998). Moreover, we have not detected any kind of cytoplasmic incompatibility in the population, such as embryonic death or sex ratio distortion in crosses with different isofemale lines.

Experiments

Egg viability and developmental time: Four groups of approximately 15 adult couples per haplotype were transferred for 24 h from the 500 ml maintaining bottles to 250 ml bottles with fresh food in order to provide sufficient adult offspring reared without competition. At 2 or 3 days after eclosion, offsprings (males and females together) were transferred to new 250 ml bottles with fresh food, where the flies could mate, feed and lay eggs freely for 1 week. These flies with 9–10 days of age were used for egg laying. They were transferred for 1 h to ‘oviposition vials’, which contained a watch glass with agar, water, acetic acid, ethyl alcohol and a few milligrams of live yeast. The eggs were laid on three watch glasses per haplotype and were immediately ordered into columns. Eggs were checked at 0, 14, 23, 35 h, and then at intervals of 30 min until 48 h, before being checked the next day at 62 h. Hatching was deduced from the number of empty eggs found. Four replicates were carried out on 4 consecutive days and the number of eggs used in each was 161/160, 125/130, 125/147 and 74/69, for haplotypes I and II, respectively. This procedure allowed the variations in developmental time and egg viability of each haplotype to be followed.

Larva–adult viability and developmental time without competition: Once having obtained eggs as in the previous experiment (except that egg laying lasted 2 h instead of one), they were kept in Petri dishes for 48 h at 19°C until the larvae hatched. Then 50 larvae of the same age were seeded in 10 × 3 cm tubes with 10 ml of fresh food. Larvae were picked up one by one directly from the watch glasses with a lancet under a microscope. The adults that emerged were counted daily, and a total of 13 replicates were carried out for each haplotype.

Viability was expressed as:

$$V = \frac{n}{N},$$

where N is the input number of larvae and n is the output number of adults emerging from these N larvae.

Developmental time (DT) was measured in days by the formula:

$$DT = \frac{\sum N_i d_i}{\sum N_i}$$

where N_i is the number of flies emerging d_i days after the larvae were placed on the medium.

Longevity: The flies tested for longevity were the offspring taken straight from the isofemale line population founder tubes, as they hatched from their pupae. Approximately 30 individuals of each haplotype and sex were maintained individually in 10 . 3 cm tubes with 10 ml of food medium containing active yeast on the surface. Flies were checked daily. Vials were changed every fortnight, before dehydration of food was evident. All the flies that escaped, were damaged or died during the experiment were included in the analyses.

Resistance to desiccation: In all, 30 flies of 8 days of age per haplotype and sex were put individually in empty 10 . 1.1 cm tubes, and they were checked hourly from the 23rd h until death. Flies for experiments were obtained as above.

Optimal density: Larvae were obtained with the same methodology indicated in the second experiment. Larvae were seeded in 7.5 . 1 cm tubes with 0.75 ml of food, in increasing densities of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 larvae. Adults emerging at each level were counted daily, and a total of four replicates were carried out for each haplotype.

Statistics

Statistical analyses were performed by means of the SPSS v 11.5 and the BIOM (Sokal and Rohlf, 1995) packages. Viabilities were subjected to the arcsine-square root transformation for statistical analyses, but the results with transformed data were qualitatively indistinguishable from analyses with untransformed data, so only the latter are presented. The longevity and the resistance to desiccation were analysed by means of the survival analysis procedure (included in the SPSS package). The method was that of Kaplan–Meier survival curves. The analysis gives, among others parameters, the cumulative survival with time and the mean with standard error (SE) for each curve. The comparison of the several curves was made with the log-rank test, so called because it can be shown to be related to a test that uses the logarithms of the ranks of the data. We made comparisons of the four curves globally and by pairs. To diminish any statistical artefacts in the significance that could arise when multiple comparisons are made, a sequential Bonferroni test (Rice, 1989) was applied to correct the probabilities when many tests are carried out simultaneously.

E-statistic (Moya *et al.*, 1986) is a fitness parameter that combines data of viabilities and developmental times, and follows the optimality principle that the largest number of adults emerged in the shortest possible time gives the best fitness. The

characteristic of this parameter is that it simultaneously maximizes viability, V , and the reciprocal of the development time, DT , as follows:

$$E_{max} = \max \left(V \frac{1}{DT} \right)$$

The function adopted for E is

$$E = \sum_{i=0}^k \frac{V_i}{T_i}$$

where $V_i = s_i / N$ and $T_i = t_i / t_{optimal}$; s_i is the number of individuals emerged at t_i time; N is the input number; and $t_{optimal}$ is a conventional minimum developmental time (in the egg-larva test it was considered as 40 h, and in the larva-adult test as 20 days).

Hence, for computational purposes we can use

$$E = \sum_{i=0}^k V_i \frac{t_{optimal}}{t_i}$$

It is worthy of remark that E -statistic is only a combination of viabilities and developmental times; thus, it does not include other fitness components such as population growth rates or fecundities.

Results

No differences in the egg-to-larva viability, developmental time or the E -statistic were statistically significant, although the trend was the same as found by Matos and Rocha Pit e (1989) for young female flies, where percentages for eclosion showed very high values, close to or attaining 100%. Flies with haplotype II had higher viability and developed faster than haplotype I (Table 1). The same table shows the larva-to-adult viabilities, developmental times and E -statistic, always favouring haplotype II, although statistically different were only found in the DT and E . However, in both experiments, the developmental times were longer than those of previous studies (Rocha Pit e, 1982) where this species developed faster even at lower temperatures. In both strains, the viabilities were low and in the same range as those found in the literature (Budnik *et al.*, 1991).

The survival curves for the adult males and females of both haplotypes are shown in Figure 1. As can be observed in Table 2, the females of both haplotypes have similar mean longevity and lived longer than males. The survival analyses showed a great similarity in the dynamics of both females, but not in males, different between

them and in relation to the females, as indicated by the log-rank tests (Table 2). Longevity results were similar to those of Maynard Smith (1956) in that many female flies were alive 100 days after eclosion, but they were dissimilar to Clarke and Maynard Smith (1955), whose flies all lived less than 96 days.

Haplotype II was more resistant to desiccation than haplotype I in both sexes, as can be seen in Figure 2. Within the haplotypes, females were more resistant than their corresponding males. These results are in accordance with those obtained by Levine (1986) for *D. pseudoobscura* and *D. melanogaster*. All comparisons were significant except between haplotype II males and both female haplotypes (see Table 2).

Table 3 shows the *V*'s, DTs and E-statistic with SEs for each density and haplotype from the OD test. As a general trend, haplotype II had a higher *V* but also a higher DT. E-statistic showed globally a higher value for haplotype II. In this experiment, only trends were detected in the results, because, overall, there were no statistically significant differences in the densities between the two haplotypes with respect to the three parameters (haplotype II in *V* and E were significantly higher than haplotype I in only the 10 and 60 density bands). It is possible that more replicates in this experiment would confirm these tendencies. Nevertheless, these results show that the differences between the two haplotypes were very small.

As expected, viability and developmental time were density-dependent parameters, with the first decreasing and the second increasing as the density increased. In the literature, it is reported that the best statistical fit of these parameters is not always linear and it is common to fit the data to a second- or third-degree polynomial regression (see, for example, Castro *et al.*, 1985 and references inside for a detailed explanation of the method). Table 4 shows the best fit of the *V*'s, DTs and E by density that corresponded to second-degree polynomial regressions based on the analysis of variance for both haplotypes. From the polynomial regression, optimal densities of 32 individuals for haplotypes I and II were obtained in viability, but haplotype II showed a slightly better use of the medium by having a higher number of survivors at this OD (11.7 vs 9.6). The results with *E* were similar (Table 4 and Figure 3). The curves in Figure 3 resulted from the polynomial regression for *V* and *E* multiplied by *N*. Only the first part of the curves (up to density 50) that include the OD values are represented, and the original survival points are also indicated. This methodology coincides with similar experiments on *D. melanogaster*. The crowding conditions caused by progressive density provoke an increasing exploitation of the medium to a maximum

level (the *OD*). From this point onwards, the limitation of resources and the increasing concentration of nitrogen catabolites from larval excretion cause a self-poisoning of the larvae, which explain, at least in part, the dynamics of the process, mainly at high densities (Castro *et al.*, 1985; Moya and Botella, 1985; Moya and Castro, 1986; Botella *et al.*, 1988).

Discussion

We have tested the differences in some fitness and lifehistory components for the two main RFLP haplotypes, I and II, in an attempt to find differences that would help us to understand their populational dynamics. We have studied those characteristics commonly used in the literature (Hedrick, 2000), although we are conscious that the prediction of the outcome of natural selection based on separate fitness components could be risky (Prout, 1971a, b). As a general trend, it was observed that haplotype II was more efficient than haplotype I. Egg viabilities, egg–larva developmental times and *E*-statistic gave no significant differences. The larva–adult developmental time was significantly shorter for haplotype II and the global *E*-statistic was higher. These results indicate an advantage over haplotype I because in population cages, with discrete generations, we can follow the optimality principle that the largest number of adults emerging in the shortest possible time gives the best fitness. In these laboratory conditions, flies that emerge earlier can mate and lay eggs earlier and, as a consequence, their larvae take the best place on the medium and so feed better. However, this explanation cannot be fully applied to natural conditions, because trade-offs may exist in such a way that slower could be better under certain conditions due to the complexity existing in nature. In relation to *E*-statistic, we think that it is a good approximation to the global fitness of viability and developmental time, although we are aware that the developmental time could have an exponential impact on reproduction, whereas the other traits (not just viability) may only be multiplicative.

For longevity, haplotype II showed a higher longevity trend in both sexes, although significant differences within sexes were found only in males. This advantage is relevant in females because the mtDNA has a maternal transmission, whereas it is not relevant in males because they do not transfer it. Nevertheless, males contribute pattern relevant, and this is an experiment that we with nuclear genes, which generates the nuclear varia-carried out (Castro *et al.*, 2003); in this experiment, the bility necessary in cytonuclear relationships. In this mating pattern indicated an assortative

mating in sense, as indicated above, we also consider the mating population cages, where couples of the same haplotype mated more often. Nevertheless, in wild populations, random mating was the rule.

In resistance to desiccation, both males and females of haplotype II are superior to haplotype I. Ecologically, this would mean a higher fitness in haplotype II flies during the driest periods of the year. This is supported by González *et al.* (1994) whose autumn samples (flies and descendants of flies just after the dry season) showed larger frequency differences between the two main haplotypes in favour of haplotype II compared to their spring samples. The cause of a difference between haplotypes and not just sexes could be explained by differences in certain proteins that would result in a different functionality with conditions of rising cell osmolarity during the dehydration of the fly. Interestingly, Kennington *et al.* (2001) showed, by means of this trait, the importance of the maternal contribution to population differentiation in *Drosophila melanogaster*. In the OD experiment, the general trend was for haplotype II to make the best use of the medium, since the survival of haplotype II at OD (which has some similarities with carrying capacity in population dynamics studies) was higher than that of haplotype I. This means that haplotype II has a better fitness than haplotype I so that it can profit from the laboratory medium, and it is possible that this advantage persists in nature when seasonal conditions are extreme. However, the interpolation from monocultures to dicultures must be treated with caution, because the response pattern of both haplotypes competing together is not fully predictable from monocultures due to intergenotypic competition (Castro *et al.*, 1985).

The differences in fitness component values found in the present work raise certain questions. (1) What are these fitness components measuring? We think that selection is acting differentially on the two haplotypes, either directly on the mtDNA or by some kind of selective coadaptation between the nuclear and the mtDNA genomes (epistatic selection and/or hitchhiking on mtDNA haplotypes). At a nuclear level, we can reasonably assume that both haplotypes had the same nuclear variability when the populational cages were founded, because of the high number of isofemale lines used for each haplotype. At the mtDNA level, 15% of the sequence of the mtDNA molecule showed three silent changes, including that of HaeIII. It is expected (and is probably true) that more differences could be found (not necessarily silent) in the remaining 85%. With our experimental design, we cannot distinguish clearly between factors that are exclusively from mtDNA for nuclear–mtDNA interactions, although we can say that the

mtDNA is always implicated. Previous data (Castro *et al.*, 1999; Oliver *et al.*, 2002) showed the presence of cytonuclear disequilibria, permitting the possibility of some kind of epistatic selection. Despite the transience of the cytonuclear interactions (Babcock and Asmussen, 1996), in the cages and after nine generations, it is possible that some could be formed (differently in both cages) in response to laboratory environmental homogeneity, and therefore persist over time (or reappear recurrently). The consequence would be a net superiority of haplotype II over haplotype I, because the former could have developed a better functional coadaptation than the latter, as also indicated by Fos *et al.* (1990). This would be mainly in the nuclear genes related to the more relevant fitness components (resistance to desiccation, longevity and optimum density). (2) Can these differences be extrapolated to nature? The life in a population cage is very different from nature (no microhabitats, no differences in food, the same temperature and humidity, the nonexistence of early morning dew, a closed environment with competition for food and space, etc.), so a direct extrapolation to nature is not possible. In fact, Castro *et al.* (2003) found, in relation to female fertility, that the adaptation to laboratory conditions gave a more global efficiency in the production of the offspring. In this situation, we can only say that under laboratory conditions, flies with haplotype II have a higher fitness than flies with haplotype I, and, thus, haplotype II would displace haplotype I in competition experiments. This was exactly what García-Martínez *et al.* (1998) found in population cages. Therefore, our experiments could explain, at least partially, the displacement of haplotype I by haplotype II in those experiments. In nature, the situation is more complicated than in laboratory cages, and the superiority of one haplotype must be counterbalanced by the other in different situations. The demographic structural characteristics in *D. subobscura* have shown significant differences between seasons (Matos and Rocha Pité, 1989). Since patterns differ remarkably throughout the year, a seasonal analysis could be important to characterize the demographic parameters of each haplotype, as one haplotype is favoured momentarily to the detriment to the other. Therefore, flies with haplotype I must have some advantage over flies with haplotype II in order to explain the proportions found in nature, developing cytonuclear interactions, even transient, that could have selective importance in a changing environment.

Finally, we have to consider the sex-by-genotype interactions because they could, in part, maintain the variation in the populations. In this way, Rand *et al.* (2001) developed a model for *D. melanogaster* in which nuclearcytoplasmic polymorphism

could be maintained by selection in X chromosome–cytoplasm interactions. They showed experimentally significant sex-by-genotype interactions for mtDNA haplotype, cytoplasm (the factors inherited through the female cytoplasm in *Drosophila* with different mtDNA, such as Wolbachia, s and C virus and maternally loaded mRNA) and X chromosomes. Moreover, these interactions were sexually antagonistic (the good cytoplasm in females was bad in males). This model reveals the complexity of the interactions that we have to take into account.

Acknowledgements

This work has been supported by Grant PB96-0793 and BOS2000-1000 from the Dirección General de Enseñanza Superior (Ministerio de Educación y Cultura, Spain).

References

- Babcock CS, Asmussen M (1996). Effects of differential selection in the sexes on cytonuclear polymorphism and disequilibria. *Genetics* 144: 839–853.
- Botella LM, Moya A, Mensua JL (1988). The effects of competition for food on pupal mortality in *Drosophila*. *Evol Biol* 2: 109–121.
- Budnik M, Cifuentes L, Brncic O (1991). Quantitative analysis of genetic differentiation among European and Chilean strains of *Drosophila subobscura*. *Heredity* 67: 29–33.
- Castro J, Moya A, Mensua JL (1985). Competitive selection in mono-, di-, and tri-genotype cultures of *Drosophila melanogaster*. *Z Zool Syst Evolut-forsch* 23: 214–228.
- Castro JA, Oliver P, Christie JS, Picornell A, Ramon M, Moya A (2003). Assortative mating and fertility in two *Drosophila subobscura* strains with different mitochondrial DNA haplotypes. *Genetica* 119: 295–301.
- Castro JA, Ramon M, Picornell A, Moya A (1999). The genetic structure of *Drosophila subobscura* populations from the islands of Majorca and Minorca (Balearic Islands, Spain) based on allozymes and mitochondrial DNA. *Heredity* 83: 271–279.
- Clark AG, Lyckegaard EMS (1988). Natural selection with nuclear and cytoplasmic transmission. III. Joint analysis of segregation and mtDNA in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118: 471–481.
- Clarke JM, Maynard Smith J (1955). The genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. XI. Hybrid vigour and longevity. *J Genet* 53: 172.
- Fos M, Domínguez MA, Latorre A, Moya A (1990). Mitochondrial DNA evolution in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4198–4201.
- García-Martínez J, Castro JA, Ramón M, Latorre A, Moya A (1998). Mitochondrial DNA haplotype frequencies in natural and experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics* 149: 1377–1382.
- Gerber AS, Loggins R, Kumar S, Dowling TE (2001). Does nonneutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes? *Ann Rev Genet* 35: 539–566.

- González A, Carrió R, Fernández-Pedrosa V, Moya A (1994). Lack of seasonal changes in mitochondrial DNA variability of a *Drosophila subobscura* population. *J Evol Biol* 7: 29–38.
- Hedrick PW (2000). *Genetics of Populations*, 2nd edn. Jones and Barlett Publishers International: London.
- Huey RBL, Partridge L, Fowler K (1991). Thermal sensitivity of *Drosophila melanogaster* responds rapidly to laboratory natural selection. *Evolution* 45: 751–756.
- Hutter CM, Rand DM (1995). Competition between mitochondrial haplotypes in distinct nuclear genetic environments: *Drosophila pseudoobscura* vs *D. persimilis*. *Genetics* 140: 537–548.
- Kennington WJ, Gilchrist AS, Goldstein DB, Partridge L (2001). The genetic bases of divergence in desiccation and starvation resistance among tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 87: 363–372.
- Latorre A, Hernández C, Martínez D, Castro JA, Ramón M, Moya A (1992). Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of *Drosophila subobscura*. *Heredity* 68: 15–24.
- Levine L (1986). Desiccation resistance in two species of *Drosophila*. *J Hered* 77: 359–360.
- MacRae AF, Anderson WW (1988). Evidence for non-neutrality of mitochondrial DNA haplotypes in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 120: 485–494.
- Matos M, Rocha Pité MT (1989). Egg viability in *Drosophila subobscura* throughout one year under semi-natural conditions. *Evol Biol* 3: 369–382.
- Matos M, Rose MR, Rocha Pité MT, Rego C, Avelar T (2000). Adaptation to the laboratory environment in *Drosophila subobscura*. *J Evol Biol* 13: 9–19.
- Maynard Smith J (1956). Fertility, mating behaviour and sexual selection in *Drosophila subobscura*. *J Genet* 54: 261–279.
- Moya A, Barrio E, Martínez D, Latorre A, González-Candelas F, Ramón M *et al.* (1993). Molecular characterization and cytonuclear disequilibria of two *Drosophila subobscura* mitochondrial haplotypes. *Genome* 36: 890–898.
- Moya A, Botella LM (1985). Larva-to-adult and pupa-to-adult mortality dynamics in crowded cultures of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 67: 201–207.
- Moya A, Castro JA (1986). Larval competition in *Drosophila melanogaster*: the model of the bands of density. *Oikos* 47: 280–286.
- Moya A, González-Candelas F, Ayala FJ (1986). Intra-and intergenotypic competition in *Drosophila melanogaster*: effects of density on larval survival and rate of development. *Genetica* 70: 59–67.
- Mueller LD, Graves JL, Rose MR (1993). Interactions between density-dependent and age-specific selection in *Drosophila melanogaster*. *Funct Ecol* 7: 469–479.
- Oliver P, Castro JA, Picornell A, Ramon MM, Solé E, Balanyà J *et al.* (2002). Linkage disequilibria between mtDNA haplotypes and chromosomal arrangements in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Heredity* 89: 133–138.
- Pinto FM, Brehm A, Hernandez M, Larruga JM, González AM, Cabrera VM (1997). Population genetic structure and colonization sequence of *Drosophila subobscura* in the Canaries and Madeira Atlantic islands as inferred by autosomal, sex-linked and mtDNA traits. *J Hered* 88: 108–114.
- Prout T (1971a). The relation between fitness components and population prediction in *Drosophila*. I: the estimation of fitness components. *Genetics* 68: 127–149.
- Prout T (1971b). The relation between fitness components and population prediction in *Drosophila*. II: population prediction. *Genetics* 68: 151–167.

- Rand DM, Clark AG, Kann LM (2001). Sexually antagonistic cytonuclear fitness interaction in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 159: 173–187.
- Rice WR (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Rocha Pité MT (1982). Influence of temperature on physiological characters of *D. phalerata*, *D. subobscura* and *D. simulans* (Insecta, Diptera, Drosophilidae.). 1 – Larval–pupal mortality and duration of the development. *Bolm Soc Port Ent* 27: 1–16.
- Rose MR (1984). Laboratory evolution of postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 38: 1004–1010.
- Rose MR, Vu LN, Park SU, Graves JL (1992). Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 27: 241–250.
- Rozas JM, Hernandez M, Cabrera VM, Prevosti A (1990). Colonization of America by *Drosophila subobscura*: effect of the founder event on the mitochondrial DNA polymorphism. *Mol Biol Evol* 7: 103–109.
- Singh RS, Hale LR (1990). Are mitochondrial DNA variants selectively non-neutral? *Genetics* 124: 995–997.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995). *Biometry*, 3rd edn. WH Freeman and Co: New York.
- Wallace B (1981). *Basic Population Genetics*. Columbia University Press: New York.

Table 1. Means with SEs for the egg-larva and larva-adult *V*, *DT* and *E*-statistic for haplotypes I and II

		Haplotypes		t-test (d.f.)
		I	II	
Egg-larva	V	0.968 ± 0.014	0.988 ± 0.006	1.32 ^{ns} (6)
	DT (hours)	42.49 ± 0.18	42.15 ± 0.40	0.77 ^{ns} (6)
	E	0.914 ± 0.016	0.943 ± 0.012	1.42 ^{ns} (6)
Larva-adult	V	0.632 ± 0.024	0.689 ± 0.023	1.73 ^{ns} (24)
	DT (days)	24.75 ± 0.20	23.21 ± 0.08	6.99 ^{***} (24)
	E	0.512 ± 0.017	0.595 ± 0.019	3.19 ^{**} (24)

d.f.: degrees of freedom

^{ns}: not significant; **: P<0.01; ***: P<0.001

Table 2. Means with SEs for longevity (in days) and desiccation resistance (in h) for sexes in haplotypes I and II. The log-rank tests based on the survival analyses are indicated (the global analysis and by pairs)

	<i>Longevity</i>	<i>Desiccation resistance</i>
MI	65.14 ± 3.88	35.57 ± 0.95
MII	76.54 ± 5.25	42.20 ± 2.12
FI	93.48 ± 5.27	39.55 ± 1.07
FII	94.74 ± 5.54	46.27 ± 2.05
Global	39.20 ^{***} (3)	28.44 ^{***} (3)
MI-MII	8.00* (1)	10.46 ^{**} (1)
FI-FII	0.06 ^{ns} (1)	9.16 ^{**} (1)
MI-FI	27.54 ^{***} (1)	6.32* (1)
MII-FII	6.59* (1)	1.38 ^{ns} (1)
MI-FII	21.86 ^{***} (1)	22.36 ^{***} (1)
MII-FI	9.38 ^{**} (1)	3.38 ^{ns} (1)

MI and FI: males and females for haplotype I

MII and FII: males and females for haplotype II

^{ns}: not significant; *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001

The probabilities were corrected by the sequential Bonferroni test.

Degrees of freedom are given within parentheses

Table 3. Mean Vs, DTs (in days) and *E*-statistic with SEs for each density and haplotype

Larval Density	Viability		Developmental time		<i>E</i>	
	I	II	I	II	I	II
10	0.52 ± 0.07	0.75 ± 0.03	22.72 ± 0.25	23.81 ± 0.43	0.461 ± 0.062	0.632 ± 0.014
20	0.42 ± 0.04	0.44 ± 0.02	25.46 ± 0.79	28.02 ± 0.99	0.334 ± 0.027	0.317 ± 0.029
30	0.36 ± 0.07	0.31 ± 0.04	30.93 ± 0.83	34.27 ± 1.17	0.233 ± 0.045	0.188 ± 0.027
40	0.22 ± 0.05	0.26 ± 0.04	36.41 ± 0.86	36.53 ± 1.04	0.127 ± 0.029	0.144 ± 0.026
50	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.03	43.00 ± 2.29	42.84 ± 1.54	0.072 ± 0.014	0.081 ± 0.016
60	0.06 ± 0.02	0.16 ± 0.02	45.36 ± 2.85	44.75 ± 1.94	0.027 ± 0.008	0.078 ± 0.009
70	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.02	47.08 ± 2.04	45.92 ± 3.72	0.033 ± 0.006	0.050 ± 0.007
80	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	47.87 ± 3.29	53.01 ± 1.35	0.023 ± 0.008	0.024 ± 0.005
90	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.01	45.46 ± 4.24	50.61 ± 1.26	0.026 ± 0.010	0.033 ± 0.006
100	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.01	51.16 ± 3.08	54.20 ± 1.11	0.026 ± 0.012	0.029 ± 0.002

Table 4. Parameter values for the polynomial regression and OD (with the corresponding survival within parentheses) for each of the three fitness components in the two haplotypes

Fitness Components	Haplotype I			Haplotype II		
	Parameter values	R ²	OD (S)	Parameter values	R ²	OD (S)
V	a = 0.689 b ₁ = -1.5E-2 b ₂ = 9E-5	0.984	32 (9.64)	a = 0.850 b ₁ = -1.90E-2 b ₂ = 1.20E-4	0.951	32 (11.67)
DT	a = 14.25 b ₁ = 0.719 b ₂ = -3.70E-3	0.966		a = 17.97 b ₁ = 0.583 b ₂ = -2.25E-3	0.983	
E	a = 0.594 b ₁ = -0.015 b ₂ = 9.5E-5	0.990	26 (6.97)	a = 0.712 b ₁ = -0.019 b ₂ = 1.23E-4	0.921	25 (8.02)

R² measures the proportion of the experimental variance explained by the regression

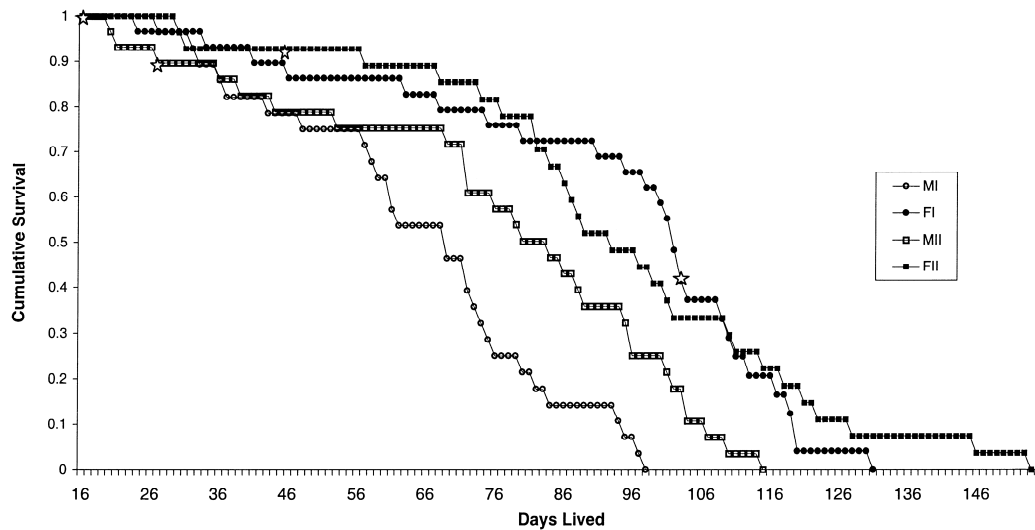


Figure 1. Survival curves for longevity (in days) for haplotypes I and II (MI and MII: males; FI and FII: females). Censored individuals are indicated by stars.

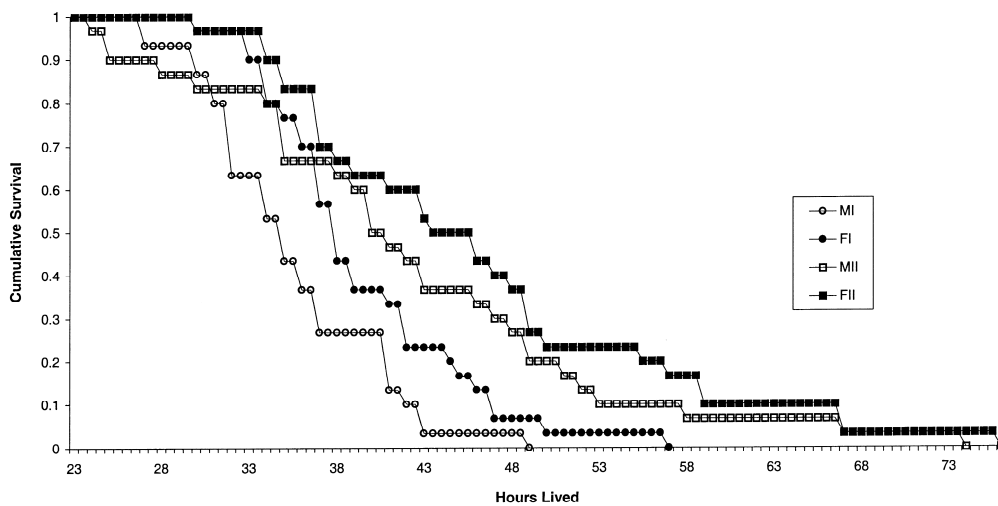


Figure 2. Survival curves for the desiccation resistance (in hours) for males and females of haplotypes I and II.

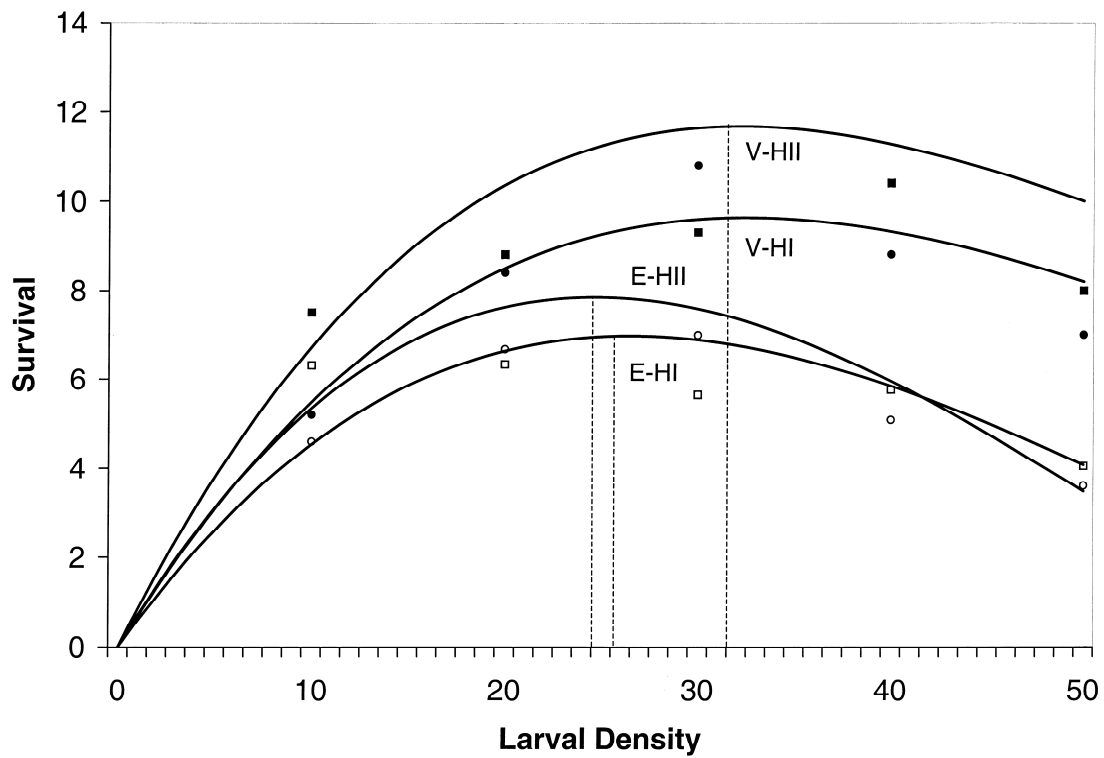


Figure 3. Viability (V) and *E-statistic* (E) as a function of the input densities for the two haplotypes I and II. The predicted function is shown. The vertical dash lines indicate the optimal input density. The original survival points are also represented (VHI: ● ; VHII: ■ ; EHI: ● ; EHII: ■).

Dynamics of the mtDNA haplotype variability in a *Drosophila subobscura* population over a two-year period

John S. Christie¹, Antònia Picornell¹, Andrés Moya², María M. Ramon¹ and José A. Castro¹

¹Laboratori de Genètica, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Edifici Guillem Colom, Universitat de les Illes Balears, Campus de la UIB, Palma de Mallorca, Balears, 07122, Spain.

²Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, Apartado de Correos 22085, 46071 València. Centre Superior d' Investigación en Salut Pública (CSISP), Av. de Catalunya 21, 46020, València, CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBEResp), Spain.

The Open Evolution Journal (2010) 4: 23-30

Abstract

Restriction site analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) was carried out on 607 isofemale lines, corresponding to monthly samples obtained over a two-year period, from a single geographic population of *Drosophila subobscura* to evaluate the possible changes in the action of the evolutionary forces with respect to the variation of the seasonal environmental conditions. The haplotype distribution pattern was: (1) two highly frequent haplotypes and (2) sporadic haplotypes that were almost never found again after a population bottleneck; similar to that observed for the entire range of this species on the European continent. We detected significant negative *D*-values for the entire population, reflecting an excess of rare haplotypes. The results confirm that the coexistence of the main haplotypes in nature, and the rare ones, could be mainly caused by seasonal population expansions. However, the fact that the frequencies of the two major haplotypes are exchanged in some months, could indicate that the action of selection cannot be discarded, possibly acting upon gene arrangement associated with mtDNA haplotypes.

Key words: mtDNA; haplotype variability; *Drosophila subobscura*

Resum

L'anàlisi de llocs de restricció de DNA mitocondrial (mtDNA) es realitzà en 607 isolínies femenines, corresponent a mostres mensuals obtingudes durant un període de dos anys, d'una única població geogràfica de *Drosophila subobscura* per avaluar els canvis possibles a l'acció de les forces evolucionàries respecte a la variació de les condicions ambientals estacionals. El patró de distribució d'haplotips va ser: (1) dos haplotips altament freqüents i (2) haplotips esporàdics que gairebé mai no es trobaven una altra vegada després d'un coll d'ampolla poblacional; similar a allò observat per a aquesta espècie al continent europeu. Detectàrem valors negatius significatius per a la *D* de Tajima per a la població sencera, reflectint un excés d'haplotips rars. Els resultats confirmen que la coexistència dels haplotips principals en la natura, i els rars, podria principalment ser provocada per expansions de població estacionals. Tanmateix, el fet que les freqüències dels dos haplotips principals s'intercanviïn en alguns mesos, podria indicar que l'acció de selecció no es pugui descartar, possiblement actuant sobre l'arranjament de gens associat amb haplotips de mtDNA.

Paraules clau: mtDNA; variabilitat haplotípica; *Drosophila subobscura*

Introduction

Drosophila subobscura is a Palaearctic species of the obscura subgroup of *Drosophila*. It is distributed over most of Europe, the Middle East, northern Africa, and the Atlantic islands of the Azores, Madeira, and the Canaries. In addition, it has recently colonized the American continent [1, 2]. A consistent observation in studies of mitochondrial DNA (mtDNA) evolution in Old and New World populations of this species is the high prevalence of two widespread and almost equally frequent haplotypes (I and II) and the sporadic appearance of rare haplotypes that are generally present in not more than a single locality [3-8]. The exception is the Canary Islands, where an endemic haplotype (VIII) is the most frequent on some of the islands [9]. Formally, this variability distribution can be classified as a classical polymorphism, with a number of rare haplotypes within each population [10].

In recent years, different studies have tried to identify the evolutionary forces accounting for the widespread equidistribution of the two main haplotypes as well as the low frequency of the remaining haplotypes, and the relative roles played by random genetic drift and natural selection [5, 11]. Many studies concerning the genetic dynamics of mtDNA in *D. subobscura* indicate the existence of cytonuclear interactions between mtDNA and nuclear markers. Oliver *et al.* [8] found linkage disequilibria between mtDNA haplotypes and chromosomal arrangements, with haplotype I associated with the J_{ST} inversion and haplotype II with the J_1 inversion. When haplotypes I and VIII were allowed to compete in experimental populations, fixation depended on the nuclear genetic background with which these haplotypes were associated [12]. Similar experiments with haplotypes I and II (with heterogeneous nuclear genetic backgrounds) were not conclusive. Haplotype II prevailed in the study of García-Martínez *et al.* [11], but not that of Oliver *et al.* [13], in which both haplotypes coexisted after 33 generations. However, when the experiments aimed to examine the fitness and life-history traits of laboratory populations, haplotype II proved to have a selective superiority over haplotype I with respect to longevity, resistance to desiccation, and larval development time [14], whereas females mated to haplotype I males had more offspring [15]. In the same study, the mating pattern indicated assortative mating, with couples of the same haplotype, mainly those of haplotype I, mating more often. However, the significant differences detected under experimental conditions disappeared in wild populations, where random mating was the rule.

The results of other studies on *D. subobscura* populations indicate that the equidistribution of haplotypes I and II can be explained by random drift of selectively neutral mutants. Partial mtDNA sequencing (15%) only identified three silent substitutions, one of which corresponded to the *HaeIII* restriction site that distinguishes both haplotypes. Moya *et al.* [5] considered the two haplotypes to be phenotypically equivalent, although they recognized that further sequencing could reveal certain differences between the two mtDNAs. González *et al.* [6] failed to detect significant seasonal changes in mtDNA variability in a *D. subobscura* population, contrary to what was found by DeSalle *et al.* [16] in a similar experiment with *Drosophila mercatorum*.

The main purpose of the present work was to evaluate the possible changes in the action of the evolutionary forces that could be acting on the population dynamics of the mtDNA haplotypes in the wild along the seasons and weather conditions. For this reason, we have studied the genetic structure of a natural Mediterranean population of *D. subobscura* in relation to mtDNA and the resolution of the dilemma regarding the temporal and geographical homogeneity of frequencies of the two most common haplotypes in this species, by studying their monthly variation over a two-year period. At the same time, the subsistence of the rare haplotypes was studied, comparing the results to those from previous studies on the same population.

Materials and Methods

***Drosophila* stocks**

Mitochondrial DNA restriction site polymorphisms were analyzed in 607 isofemale lines of *Drosophila subobscura* from a wild population in Calvià (Balearic Islands, Spain). The isofemale lines were obtained during monthly captures in 2001 and 2002. Sampling was done at the beginning of each month and lasted from one day (when flies were abundant) to two weeks (when flies were scarce). The samples were collected at the time of day when conditions, such as temperature, were most favourable for *D. subobscura*. Each monthly capture resulted in a maximum of 50 female flies. The flies were collected with conventional traps containing fermented bananas. Once in the laboratory, females were placed individually into tubes with food and two male flies and maintained in an incubator at 19°C.

mtDNA analysis

Enriched fractions of mtDNA from each isofemale line were obtained by the methods described in Latorre *et al.* [17]. The mtDNA was digested with five restriction enzymes (*HaeIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, and *HpaII*). These enzymes were selected for their ability to detect mtDNA polymorphisms [17]. Digestion fragments were separated on horizontal slab 1–2% agarose gels containing 0.5 µg of ethidium bromide per ml, visualized with a 260-nm UV light transilluminator, and photographed when necessary. Fragment sizes were determined with DNA molecular mass markers (II, IV, and VI; Roche). An mtDNA restriction map was created based on all possible single and double digestions of the mtDNA. The different composite restriction patterns or haplotypes are named in accordance with Latorre *et al.* [17] and Castro *et al.* [7].

Statistical analyses

The degree of mtDNA differentiation within and between populations (*V_w* and *V_b*), and the degree of population subdivision (*N_{ST}*) were estimated following the method of Lynch and Crease [18], with a computer program kindly supplied by the authors. The degree of mtDNA differentiation depends on the number of substitutions per nucleotide site between pairs of random haplotypes and is estimated according to the maximum likelihood estimator developed by Nei [19] (p. 104). The existence of 4- and 6-bp-specific enzymes was taken into account. To test the homogeneity of haplotype temporal distribution, the *V* statistic [16] (equation 2) was applied to the arcsin-transformed frequency of each haplotype. Under the null hypothesis of no temporal heterogeneity, the *V* statistic is distributed as a chi-square with *n*-1 degrees of freedom, *n* being the number of populations sampled. Tajima's *D*-test [20] was used to test for any departure from neutrality for the mtDNA haplotype distribution in the different monthly and seasonal samples, as well as in the entire population. The rationale of the test is that in a panmictic population, under the neutral mutation model, no difference is expected between the average number of nucleotide differences and the number of segregating sites. Any departure of the frequency spectrum of variants from the neutral prediction will affect estimates of the latter, but not the former.

Results

The cleavage map of the restriction enzymes, based on the physical mtDNA map of *D. yakuba* [21], is shown at the bottom of Fig. 1. Seventeen polymorphic sites and

eleven conserved regions were found. As seen in the figure, genes encoding the NADH and CO complexes account for most of the polymorphic sites. One endonuclease, *EcoRI*, yielded the same restriction pattern in all the isofemale lines analyzed, while the restriction patterns obtained with the other four enzymes were polymorphic, ranging between 2 (*EcoRV*) and 12 (*HpaII*). Table 1 shows the different polymorphic sites used to define each haplotype identified in this study. Based on the polymorphic sites distinguished by the four restriction enzymes, 23 composite restriction patterns or haplotypes were obtained. The relationship between haplotypes I and II and the rare haplotypes is depicted in Fig. 1, which shows an unrooted phylogenetic tree of the 23 detected haplotypes. Ten of the haplotypes were derived from haplotype I and 11 from haplotype II. All were caused by unique mutational events in the mtDNA; the exception was haplotype XVI, with two.

Table 2 shows, on a monthly, seasonal, and yearly basis, the number of isofemale lines of each haplotype between the years 2001 and 2002 (months in which no flies were captured are not represented), and Fig. 2 is a climograph with the superimposed absolute frequencies of the haplotypes (the rare haplotypes being grouped). Few or no isolines were obtained in some months due to adverse weather conditions for *D. subobscura*. Flies were captured in summer 2002 due to an unusual wet season, but not in summer 2001 due to the hot and dry weather that is typical of the Mediterranean climate during this season. Of the 607 analyzed isolines, 272 (44.81%) proved to be of haplotype I, 311 (51.23%) were haplotype II, and only 24 (3.95%) could be assigned to the other 21 haplotypes. Rare haplotypes were usually detected in a single isofemale line, with the exceptions being haplotypes XII (with two) and XVII (with three, and detected in both years). As found in other populations [4, 8], haplotypes I and II were highly predominant and the remaining haplotypes were derived from them, appearing at low frequencies. It is interesting to note that none of the rare haplotypes identified in this study were found in the first sample at the same location in 1997 by Oliver *et al.* [8].

No evidence of temporal heterogeneity in haplotype frequency was found when the *V* statistic [16] was applied to the two-year period. *V* was 17.3 for haplotype I and 14.7 for haplotype II. As the remaining haplotypes were sporadic, they were pooled into one group, with a *V*= 12.8 (23 degrees of freedom). Similar and non-significant results were recorded for 2001 and 2002.

Table 3 shows the mtDNA differences between samples pooled by seasons. The total amount of mtDNA polymorphism can be estimated by the sum of the average number (V_w) of substitutions per nucleotide site for random pairs of haplotypes from the same population and the average number (V_b) between populations. Most of the observed variation in our data was concentrated within the seasonal samples ($V_w = 0.00431 \pm 0.00384$), whereas the between-samples variation was very low ($V_b = -0.00002 \pm 0.00007$). Additionally, the fraction of the nucleotide variation between samples, N_{ST} , was 0.006 ± 0.081 , which was not significantly different from zero, indicating between-samples homogeneity. The monthly and yearly data gave very similar results and can be obtained from the senior author upon request.

Table 4 gives the estimates of Tajima's D -test [20] for the monthly samples and for samples pooled by seasons and years. Positive D -values were recorded for the spring months in both years and in the autumn months of 2001, while in the remaining months the D -values were negative. With respect to samples pooled by seasons and years, the D -values were always negative except in autumn 2001. Only when all the flies were pooled the data allowed to reject the hypothesis of neutrality.

Discussion

In the present work, the mtDNA structure diversity of a *D. subobscura* population was determined and the information applied with the goal of deepening in the evolutionary forces implicated to solve the dilemma of the temporal and geographical homogeneity in frequencies of the two main haplotypes in nature, and the distribution of the rare ones. Although sampling proved arduous or non-productive in most winter and summer months due to adverse weather conditions for *D. subobscura*, the results indicate at least one important seasonal bottleneck in summer 2001 (Fig. 2). There are references to population bottlenecks due to cold winters [4, 6], but our experience suggests that dry summers are the main reason for the depletion of Mediterranean populations. *D. subobscura* is found as far north as Scandinavia, and in the coldest months we observed the flies on the bait (at 10–13°C they would hop and walk, but not fly); however, when the weather was hot and dry they were completely absent.

The degree of mtDNA differentiation within and between monthly samples (V_w and V_b) as well as the degree of population subdivision (N_{ST}) gave no significant results, indicating population homogeneity. Furthermore, the use of the V statistic did not yield evidence of temporal heterogeneity in haplotype frequency. These results,

jointly with the negative D -values for the entire population, support an excess of low-frequency polymorphisms in the population. This excess of rare haplotypes could arise due to recovery from a recent selective sweep (the sweep of a single allele followed by the recovery of single mutations), but this explanation seems unlikely due to the presence of the two main equally frequent haplotypes in the population; or from population expansions after a bottleneck in summer and winter; process repeated over time. This last explanation seems to be the most plausible to explain the distribution of haplotypes I and II and the rare ones.

Can we discard the action of selection? In both 2001 and 2002, in general haplotype II was more numerous than I, but II was clearly surpassed in number by haplotype I in June 01 and May and June 02 (Table 2, Fig. 2). González *et al.* [6] did not find temporal heterogeneity either but, in their study, although haplotype I was always less frequent than haplotype II, the difference between them was lowest in the spring samples. Our work has similarities with González *et al.* [6], but we have improved it mainly in the fine dissection of the temporal samples (monthly), the sample size (607) and the knowledge of climatic conditions. In spite of the lack of statistical significance our results could reflect selection due to environmental heterogeneity. For example, in spring, there might be a factor favouring haplotype I. Note that in the spring months there is a conjunction of humidity and optimum temperature for the species (19°C, Fig. 2). That the superiority of one haplotype could be counterbalanced by the other in different situations, which would explain the haplotype proportions found in nature, was pointed out by Castro *et al.* [15] and Christie *et al.* [14]. Both studies noted that one haplotype proved more efficient than the other depending on the fitness or life-history trait studied. These authors also suggested that differences in adaptation could be promoted by the differential effects of selection acting on the two haplotypes, either directly on the mtDNA or by selective co-adaptation between the nuclear and mtDNA genomes (epistatic selection and/or hitchhiking on mtDNA haplotypes). Seasonal changes in gene arrangement frequencies have been extensively reported in the literature [22-24] and transient linkage disequilibria between mtDNA haplotypes and chromosomal arrangements were recently described [8, 13]; therefore, the most plausible explanation would not be direct selection on mtDNA but epistatic selection. Furthermore, the demographic structural characteristics of *D. subobscura* have pointed to significant seasonal differences [25]. Since these differ remarkably throughout the year, the monthly analysis has been very important to characterize the demographic

parameters of each haplotype, as one haplotype could effectively be favoured momentarily to the detriment of the other.

What happens to the less common haplotypes? None of our rare haplotypes correspond to those reported in the study by Oliver *et al.* [8] (done at the same location in 1997), even though our study is the most extensive to date and is based on the largest number of *D. subobscura* isolines analyzed thus far. Nonetheless, we must admit that unsuccessful resampling of those rare haplotypes reported by Oliver *et al.* [8] could also have been due to their extremely low frequencies. Furthermore, with respect to the rare haplotypes described herein, it is interesting to note that while the five restriction enzymes yielded 17 polymorphic sites, a total of 21 haplotypes were obtained, 10 derived from I and 11 derived from II (Table 1, Fig. 1). This is because some of the haplotypes shared the same rare polymorphic site for one restriction enzyme, i.e., *Hind* III or *Hpa*II, but differed in the polymorphic site for *Hae*III that distinguishes haplotype I from haplotype II. This is not a new observation, because while in this study there were five such cases (Table 1), other cases are documented in the literature. There is at least one such case in Afonso *et al.* [3], one in García-Martínez *et al.* [11], another in González *et al.* [6], and five in Castro *et al.* [7], four of which were detected within the same neighbouring populations.

Conclusion

We can say that the most parsimonious explanation for the populational dynamics of the major mtDNA haplotypes over time in natural populations is by means of population size fluctuations due to periodic seasonal bottlenecks followed by expansions. However, the fact that the frequencies of the two major haplotypes are exchanged in some months could indicate that the action of selection cannot be discarded. Epistatic selection due to environmental heterogeneity (seasonal changes) could act upon the gene arrangement frequencies associated with the mtDNA haplotypes. These results confirm what was previously established in others papers. In addition, rare haplotypes that appear locally and are expected to accumulate with time instead mainly become extinct due to bottlenecks, but also to selection when non-silent changes at the protein level are involved.

Acknowledgements

This work was supported by grants PB96-0793 and BOS2000-1000 from the Dirección General de Enseñanza Superior (Ministerio de Educación y Cultura, Spain). Meteorological data were supplied by the Agencia Estatal de Meteorología (Spain).

References

- [1] Ayala, F. J.; Serra, L.L.; Prevosti, A. A grand experiment in evolution: the *Drosophila subobscura* colonization of the Americas. *Genome*, **1989**, *31*, 246–255.
- [2] Rozas, J.M.; Hernandez, M.; Cabrera, V.M.; Prevosti, A. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: effect of the founder event on the mitochondrial DNA polymorphism. *Mol. Biol. Evol.*, **1990**, *7*, 103-109.
- [3] Afonso, J.M.; Volz, A.; Hernández, M.; Ruttkay, H.; González, A.M.; Larruga, J.M. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in Old-World populations of *Drosophila subobscura*. *Mol. Biol. Evol.*, **1990**, *7*, 123-142.
- [4] Latorre, A.; Hernández, C.; Martínez, D.; Castro, J.A.; Ramón, M.; Moya, A. Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of *Drosophila subobscura*. *Heredity*, **1992**, *68*, 15-24.
- [5] Moya, A.; Barrio, E.; Martínez, D.; Latorre, A.; González-Candelas, F.; Ramón, M.; Castro, J.A. Molecular characterization and cytonuclear disequilibria of two *Drosophila subobscura* mitochondrial haplotypes. *Genome*, **1993**, *36*, 890-898.
- [6] González, A.; Carrió, R.; Fernández-Pedrosa, V.; Moya, A. Lack of seasonal changes in mitochondrial DNA variability of a *Drosophila subobscura* population. *J. Evol. Biol.* **1994**, *7*, 29-38.
- [7] Castro, J.A.; Ramon, M.; Picornell, A.; Moya, A. The genetic structure of *Drosophila subobscura* populations from the islands of Majorca and Minorca (Balearic Islands, Spain) based on allozymes and mitochondrial DNA. *Heredity*, **1999**, *83*, 271-279.
- [8] Oliver, P.; Castro, J.A.; Picornell, A.; Ramon, M.M.; Solé, E.; Balanyà, J.; Serra, L.; Latorre, A.; Moya, A. Linkage disequilibria between mtDNA haplotypes and chromosomal arrangements in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Heredity*, **2002**, *89*, 133–138.
- [9] Pinto, F.M.; Brehm, A.; Hernandez, M.; Larruga, J.M.; González, A.M.; Cabrera, V.M. Population genetic structure and colonization sequence of *Drosophila subobscura* in the Canaries and Madeira Atlantic islands as inferred by autosomal, sex-linked and mtDNA traits. *J. Hered.*, **1997**, *88*, 108-114.
- [10] Lewontin, R.C. Population genetics. *Annu. Rev. Genet.*, **1985**, *19*, 81-102.
- [11] García-Martínez, J.; Castro, J.A.; Ramón, M.; Latorre, A.; Moya, A. Mitochondrial DNA haplotype frequencies in natural and experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics*, **1998**, *149*, 1377-1382.
- [12] Fos, M.; Domínguez, M.A.; Latorre, A.; Moya, A. Mitochondrial DNA evolution in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 4198-4201.
- [13] Oliver, P.; Balanyà, J.; Ramon, M.M.; Picornell, A.; Serra, L.; Moya, A.; Castro, J.A. Population dynamics of the 2 major mitochondrial DNA haplotypes in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genome*, **2005**, *48*, 1010–1018.

- [14] Christie, J.S.; Castro, J.A.; Oliver, P.; Picornell, A.; Ramon, M.M.; Moya, A. Fitness and life-history traits of the two major mitochondrial DNA haplotypes of *Drosophila subobscura*. *Heredity*, **2004**, *93*, 371–378.
- [15] Castro, J.A.; Oliver, P.; Christie, J.S.; Picornell, A.; Ramon, M.; Moya, A. Assortative mating and fertility in two *Drosophila subobscura* strains with different mitochondrial DNA haplotypes. *Genetica*, **2003**, *119*, 295–301.
- [16] DeSalle, R.; Templeton, A.; Mori, I.; Pletschert, S.; Johnston, J.P. Temporal and spatial heterogeneity of mtDNA polymorphisms in natural populations of *Drosophila mercatorum*. *Genetics*, **1987**, *116*, 215-223.
- [17] Latorre, A.; Moya, A.; Ayala, F.J. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*, 8649-8653.
- [18] Lynch, M.; Crease, T.J. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol. Biol. Evol.*, **1990**, *7*, 377-394.
- [19] Nei, M. *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press: New York, **1987**.
- [20] Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **1989**, *123*, 585-595.
- [21] Clary, D.O.; Wolstenholme, D.R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.*, **1985**, *22*, 252-271.
- [22] De Frutos, R.; Prevosti, A. Temporal changes of chromosomal polymorphism in natural populations of *Drosophila subobscura*. *Genetica*, **1984**, *63*, 181–187.
- [23] Rodríguez-Trelles, F.; Alvarez, G.; Zapata, C. Time-Series analysis of seasonal changes of the O inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetics*, **1996**, *142*, 179-187.
- [24] Zivanovic, G. Seasonal changes in chromosomal inversion polymorphism in a *Drosophila subobscura* natural population from a southeastern European continental refugium of the last glaciation period. *Russ. J. Genet.*, **2007**, *43*, 1344-1349.
- [25] Matos, M.; Rocha Pité, M.T. Egg viability in *Drosophila subobscura* throughout one year under semi-natural conditions. *Evol. Biol. (Bogotá)*, **1989**, *3*, 369-382.

Table 1. The different haplotypes, defined by the polymorphic sites, and their corresponding number of isofemale lines from the *D. subobscura* Calvià population between 2001 and 2002. Each site is named as in the restriction map (Fig. 1). The presence or absence of a given polymorphic site is indicated by a plus (+) or minus (-) sign, respectively.

Haplotype	<i>EcoRV</i>		<i>HaeIII</i>		<i>HindIII</i>				<i>HpaII</i>								Total	
	c1	e2	e3	e4	f2	f3	f5	f6	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h10	h11		h12
I	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	272
II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	311
III	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
IV	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
V	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
VI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
VII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
VIII	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
IX	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
X	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
XI	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
XII	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
XIII	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	1
XIV	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	1
XV	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	1
XVI	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
XVII	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	3
XVIII	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	1
XIX	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	1
XX	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	1
XXI	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	1
XXII	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	1
XXIII	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	1

Table 2. The number of isofemale lines showing a given haplotype as determined in the *D. subobscura* population in Calvià between 2001 and 2002. Results are given by month, season, and year. Observe that few or no isolines were obtained in some months due to adverse weather conditions for *D. subobscura*. Months in which no flies were captured are not represented.

Haplotype Group	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	Total	
Feb. 01	20	30				1		1					1												53
Mar. 01	25	28	1							1						1									56
Winter 2001	45	58	1			1		1		1			1			1									109
Apr. 01	20	32																		1					53
May 01	21	29																				1	1		52
June 01	17	8															1								26
Spring 2001	58	69															1				1		1	1	131
Summer 01																									
Nov. 01	4	9																							13
Dec. 01	5	5																							10
Autumn 01	9	14																							23
Total 2001	112	141	1			1		1		1			1			1	1				1		1	1	263
Jan. 02	2	0																							2
Feb. 02	24	26			1				1																52
Mar. 02	23	24										2		1											50
Winter 2002	49	50			1				1			2		1											104
Apr. 02	21	30																							51
May 02	28	23															1								52
June 02	27	23																1							51
Spring 2002	76	76															1	1							154
July 02	0	1															1								2
Aug. 02	19	28		1						1					1								1		51
Summer 02	19	29		1						1					1								1		53
Oct. 02	0	1																							1
Nov. 02	16	14						1											1						32
Autumn 02	16	15						1												1					33
Total 2002	160	170		1	1		1		1	1		2		1	1		2	1	1			1			344
Total	272	311	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	607

Table 3. mtDNA differentiation ($\times 10^{-5}$) in *D. subobscura* within and between seasons (Standard errors in parentheses). Values on the main diagonal are the within-population differentiation (*V_w*), and those above the diagonal the between-populations differentiation (*V_b*).

	Winter01	Spring01	Autumn01	Winter02	Spring02	Summer02	Autumn02
Winter 01	462(384)	-3 (389)	-7 (400)	-3 (380)	-1 (412)	-1 (325)	-4 (367)
Spring 01		409(378)	-7 (428)	-2 (402)	-1 (434)	-1 (354)	-4 (389)
Autumn01			365 (376)	-2 (421)	0 (455)	-11 (359)	-2 (411)
Winter 02				441(392)	-3 (418)	+4 (350)	-7 (372)
Spring 02					387(377)	+6 (382)	-7 (402)
Summer02						487 (390)	+5 (341)
Autumn02							469 (404)

Table 4. Estimates of *D* values and their significance, according to Tajima [20], for the *D. subobscura* population in Calvià between 2001 and 2002. Note that a minimum of 3 individuals must be used; accordingly, samples with fewer individuals are not represented.

Sample	Sample size	<i>D</i>
Feb 01	53	-0.695
Mar 01	56	-0.561
Apr 01	53	0.303
May 01	52	0.521
Jun 01	26	0.096
Nov 01	13	0.950
Dec 01	10	1.464
Feb 02	52	-0.238
Mar 02	50	-0.137
Apr 02	51	1.635
May 02	52	0.410
Jun 02	51	0.398
Aug 02	51	-1.017
Nov 02	32	-0.328
Winter 2001	109	-1.221
Spring 2001	131	-0.450
Autumn 2001	23	1.433
Winter 2002	104	-0.790
Spring 2002	154	-0.017
Summer 2002	53	-1.246
Autumn 2002	33	-0.319
Year 2001	263	-1.455
Year 2002	344	-1.580*
2001+2002	607	-2.252**

*: $p < 0.10$ **: $p < 0.01$

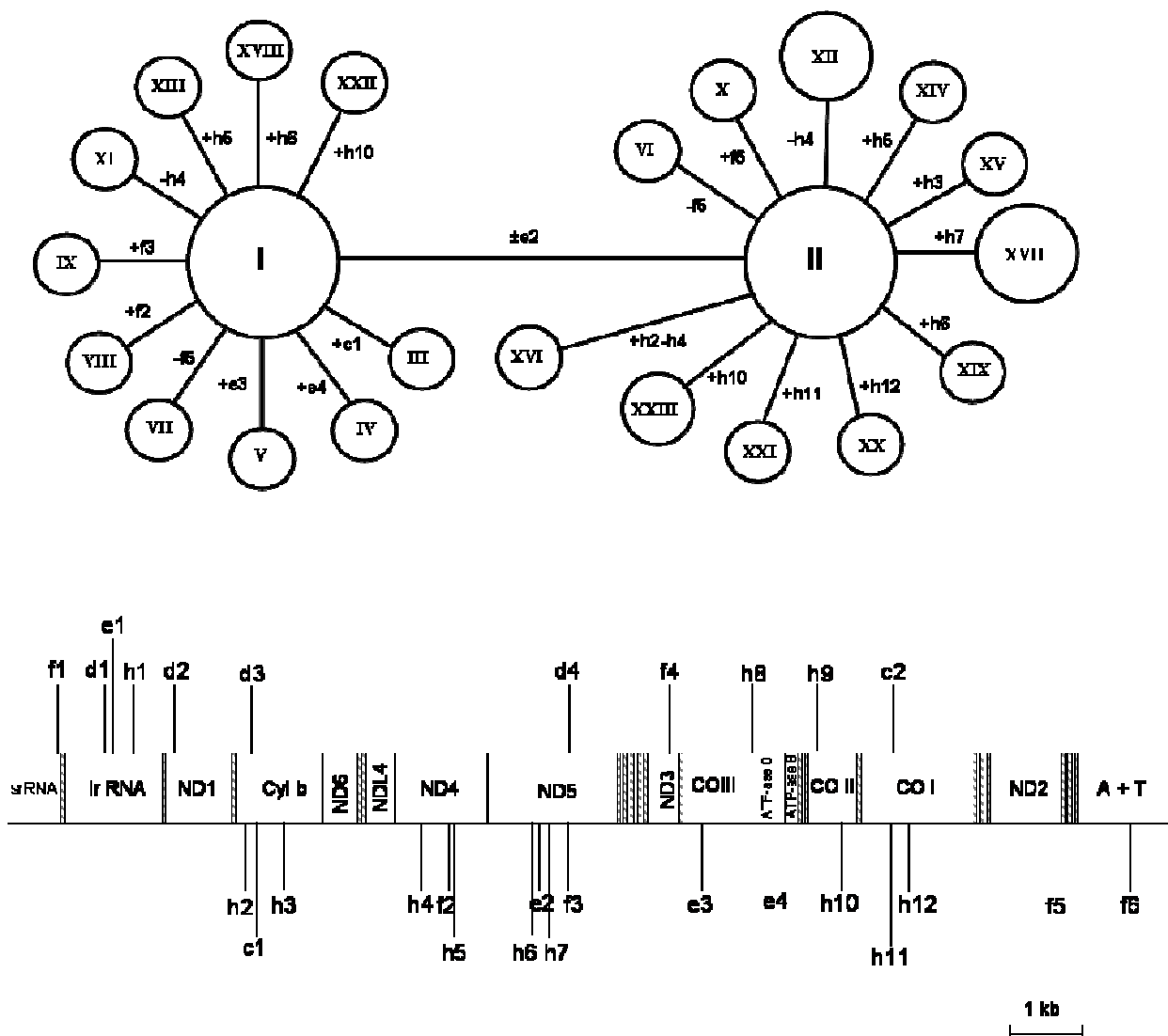


Figure 1. *Top:* Unrooted phylogenetic tree for the 23 haplotypes of *D. subobscura* identified between 2001 and 2002 in Calvià (see Table 1). The haplotypes are connected in a way that minimizes the number of site changes. The number of mutational steps is indicated on each branch. *Bottom:* *D. subobscura* mtDNA organization based on the genetic map of *D. yakuba* reported by Clary and Wolstenholme [21]. Conserved sites are shown above and polymorphic sites below the map. Abbreviations for the genes are as follows: srRNA and lrRNA, small and large subunits of ribosomal RNA, respectively; ND1–6, subunits of the NADH dehydrogenase complex; Cytb, cytochrome b; COI–III, subunits of cytochrome oxidase; 8, ATPase 8; A+T, regulatory noncoding region. Each site is named with a letter, for each of the restriction endonucleases, followed by a number corresponding to a specific restriction site. (d) *EcoRI*; (c) *EcoRV*; (e) *HaeIII*; (h) *HpaII* and (f) *HindIII*.

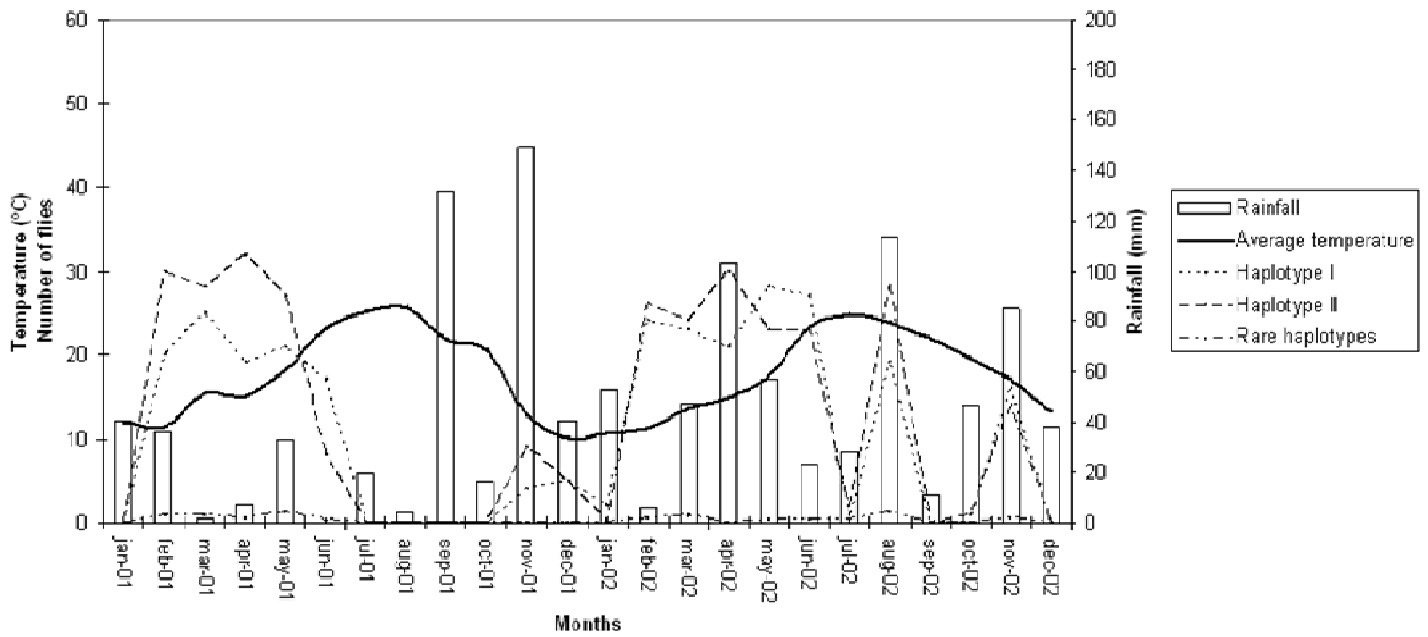


Figure 2. Climograph corresponding to Calvià between 2001 and 2002, with the superimposed absolute frequencies of the haplotypes (the rare haplotypes are grouped). Few or no isolines were obtained in some months due to adverse weather conditions for *D. subobscura*.

Mitochondrial DNA effects on fitness in *Drosophila subobscura*

John S. Christie¹, Antònia Picornell¹, Andrés Moya², Maria M. Ramon¹ and José A. Castro¹

¹Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS) i Laboratori de Genètica, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Edifici Guillem Colom, Universitat de les Illes Balears, Illes Balears, Spain.

²Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, València. Centre Superior d'Investigació en Salut Pública (CSISP), València, CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBEResp), València, Spain.

Heredity (2011), on line

Abstract

We tested different fitness components on a series of conspecific mtDNA haplotypes detected by RFLPs in *Drosophila subobscura*. Additionally, haplotype VIII, endemic to the Canary Islands, was tested upon its own native nuclear DNA background and upon that of the rest of mtDNAs tested herein. We found that both nuclear and mitochondrial DNA can have a significant effect upon their hosts' fitness and that negative selection is one of the mechanisms that can intervene in this species' mtDNA haplotype pattern. We discuss the importance of this mechanism in relation to genetic drift, in the form of periodic population bottlenecks, and how the latter can enhance the former. We also detected a significant positive effect of haplotype VIII upon fitness that could explain in part the dominance of this endemic haplotype on some of the Canary Islands, and a mitochondrial heterosis involving this haplotype when on a foreign nuclear DNA background.

Keywords: RFLPs, mtDNA haplotypes, fitness components, *Drosophila subobscura*,

Resum

Hem provat diferents components de l'eficàcia biològica en una sèrie d'haplotips del mtDNA conspecifics detectats per RFLPs en *Drosophila subobscura*. A més, l'haplotip VIII, endèmic de les Illes Canàries, es va provar al seu propi fons natiu de DNA nuclear i en la resta de mtDNAs provats aquí. Es va trobar que tant el DNA nuclear com el mitocondrial pot tenir un efecte significatiu sobre l'eficàcia biològica dels seus hostes i que la selecció negativa és un dels mecanismes que poden intervenir en el patró haplotípic del mtDNA d'aquesta espècie. Es discuteix la importància d'aquest mecanisme en relació amb la deriva genètica, en forma de colls d'ampolla poblacionals periòdics, i com aquest pot millorar la primera. També es va detectar un efecte positiu significatiu de l'haplotip VIII sobre l'eficàcia biològica, que podria explicar en part el domini d'aquest haplotip endèmic en algunes de les Illes Canàries, i una heterosi mitocondrial relacionada amb aquest haplotip quan està en un fons de DNA nuclear estrany.

Paraules clau: RFLPs, haplotips de mtDNA, components d'eficàcia biològica, *Drosophila subobscura*

Introduction

Drosophila subobscura is a Palearctic species of the obscura subgroup of *Drosophila*. It is distributed over most Europe, the Middle East, northern Africa and the Atlantic islands of the Azores, Madeira and the Canaries. In addition, in recent times it has colonized the American continent (Ayala *et al.*, 1989; Rozas *et al.*, 1990).

A consistent observation in studies of mtDNA evolution in Old and New World populations of this species is the high prevalence of two widespread and almost equally frequent RFLP haplotypes (I and II) and the sporadic appearance of rare ones at low frequencies generally present in never more than a single locality (Afonso *et al.*, 1990; Latorre *et al.*, 1992; Moya *et al.*, 1993; González *et al.*, 1994; Castro *et al.*, 1999; Oliver *et al.*, 2002; Christie *et al.*, 2010). The exception is on the Canary Islands where an endemic haplotype (VIII) is the most frequent on some islands (Pinto *et al.*, 1997).

Different studies have tried to determine which evolutionary forces account for this species' mtDNA haplotype pattern in nature. The maintenance of the widespread equidistribution of the two main haplotypes has been thoroughly studied, but not so the case of the local less common haplotypes. The equidistribution of haplotypes I and II has been mainly explained by population expansion but not ruling out the action of natural selection (García-Martínez *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2010). Recently, Christie *et al.* (2010) studied monthly samples in a single geographic population of *Drosophila subobscura* over a two year period. Results indicated that natural populations have not yet reached a drift-selection equilibrium, due to periodic bottlenecks as well as to some kind of selection, due to environmental heterogeneity (seasonal changes), possibly acting upon nuclear inversion polymorphism frequencies associated with mtDNA haplotypes. Many studies concerning the genetic dynamics of mtDNA in *D. subobscura* indicate the existence of cytonuclear interactions between the mtDNA and nuclear markers (García-Martínez *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 2002; Fos *et al.*, 1990; Castro *et al.*, 2003; Christie *et al.*, 2004).

In relation to the nucleotide composition of the mtDNA in *Drosophila subobscura*, up to date only partial sequencing has been carried out. Moya *et al.* (1993) sequenced 15% of the genome and only found three silent substitutions between haplotypes I and II, one of which corresponded to the *Hae*III restriction site that distinguishes haplotypes I and II, which is located on the *ND5* gene. These authors supported the idea that haplotypes I and II were selectively neutral and the individuals phenotypically equivalent. Further sequencing by Castro *et al.* (2010) analysed nucleotide diversity in a

942-bp fragment of the mtDNA ND5 gene in haplotypes I, II and some rare ones. Results revealed some non-synonymous substitutions, although synonymous substitutions were far more frequent, so most of the rare haplotypes should also be considered *a priori* as neutral variants. Even though, it is reported that a substantial proportion of intraspecific diversity in mtDNA results from slightly deleterious mutations (Rand and Kann, 1996). In relation to the presence of rare haplotypes in nature, Christie *et al.* (2010) found significant *D* values of the Tajima test for non-neutral evolution which reflected an excess of rare haplotypes. This population dynamics was explained mainly due to periodic population bottlenecks followed by expansions but, at the same time, without discarding the possibility of purifying (negative) selection when non silent changes at the protein level are involved. Thus the competence of the rare mtDNA haplotypes of *Drosophila subobscura* in nature in comparison to that of haplotypes I and II might be an interesting issue.

In the present research, we focus in particular on the effect of mtDNA on its host's fitness. We tested the fitness of different conspecific mtDNA variants upon a same common nuclear DNA background with the aims of: *i*) investigate the fitness of the rare mtDNA haplotypes of *Drosophila subobscura* in comparison to haplotypes I and II, and *ii*) determine the importance of selection in the populational dynamics of the mtDNA haplotypes. We demonstrate that mtDNAs have a significant effect upon their host's fitness and that purifying (negative) selection is one of the mechanisms that can intervene in this species' mtDNA haplotype pattern in nature.

Materials and Methods

mtDNA haplotypes

A total of eleven mtDNA RFLP haplotypes were used in this paper. Ten of the haplotypes were sampled at a pine forest in Calvià, on Majorca (Spain). These were the two main haplotypes present in *D. subobscura*, I and II, and eight local rare haplotypes: III, IV, V, VI, IX, XI, XIII, and XVI, described in Christie *et al.* (2010). The eleventh was haplotype VIII, described in Latorre *et al.* (1992), endemic to the Canary Islands, and sampled at La Laguna, on Tenerife (Spain). The flies were collected with conventional traps containing fermented bananas, and classified individually under a microscope. Extraction and digestion of mtDNA was obtained by the method described by Latorre *et al.* (1986). mtDNA haplotypes were named following the notation used by Latorre *et al.* (1986, 1992).

Construction of isofemale lines

A total of twelve isofemale lines were established. Ten corresponded to the haplotypes from Calvià with their own native nuclear background. Additionally, two haplotype VIII isofemale lines (derived from the same female fly) were established: one with its native Tenerife nuclear background (VIII_t) and another with that of Calvià (VIII_c). In order to uniform the nuclear DNA variability, introgression of nuclear background was carried out in all the isofemale lines by backcrossing for eight generations. Twenty virgin females (except generation 0, with one) from all lines were mated to twice as many wild males (from generations 0, 1 or 2 from established population cages; see below). In theory, 99.61% of the original nuclear genome was replaced with that of the wild populations. Each isofemale line's haplotype was re-confirmed after backcrossing concluded to discard mtDNA contamination. Isofemale lines for experiments were maintained by serial transfer in five 500 ml bottles. All flies were maintained in the laboratory at 19°C, 70% relative humidity, 1:1 day–night cycle and fed with corn-meal food.

Population cages

Additionally, two population cages were established for the wild stock nuclear backgrounds of Calvià and Tenerife used for backcrossing; consisting of boxes with 12 jars of corn-meal food with a mean number of approximately 2000 individuals per generation. These cages were founded with at least 50 wild females plus corresponding males. The cage with the Calvià nuclear background was re-founded every three generations, thanks to the proximity of the local population.

Presence of Wolbachia

An incompatibility system in *D. subobscura* promoted by the presence of *Wolbachia* was excluded. PCR assays using 16S rDNA *Wolbachia*-specific primers on local populations were carried out in the recent past (García-Martínez *et al.*, 1998; Christie *et al.*, 2004), giving negative results. Original *Drosophila* stocks from Tenerife were treated with tetracycline, and PCR assayed. The cure was carried out at least ten generations prior to experiments, avoiding, in this way, the negative consequences indicated by Ballard and Melvin (2007). Moreover, no kind of cytoplasmic incompatibility was detected, such as embryonic death or sex ratio distortion in crosses with different isofemale lines.

Experiments

Larva–adult viability and developmental time without competition (VDT): Groups of approximately 15 adult couples per haplotype were transferred for 24 h from the 500 ml maintaining bottles to 250 ml bottles with fresh food in order to provide sufficient adult offspring reared without competition. At 2 or 3 days after eclosion, offspring (males and females together) were transferred to new 250 ml bottles with fresh food, where the flies could mate, feed and lay eggs freely for 1 week. These flies with 9–10 days of age were used for egg laying. They were transferred for 2 hours to ‘oviposition vials’, which contained a watch glass with agar, water, acetic acid, ethyl alcohol and a few milligrams of live yeast. The eggs were kept in Petri dishes for 40 hours at 19°C until the larvae hatched. Then 50 larvae of the same age were seeded in 10x3 cm tubes with 10 ml of fresh food. Larvae were picked up one by one directly from the watch glasses with a lancet under a microscope. The adults that emerged were counted daily, and a total of 13 to 15 replicates were carried out for each isofemale line.

Viability (V) was expressed as:

$$V = \frac{n}{N}$$

where N is the input number of larvae and n is the output number of adults emerging from these N larvae.

Developmental time (DT) was measured in days by the formula:

$$DT = \frac{\sum n_d \cdot d}{\sum n_d}$$

where n_d is the number of flies emerging d days after the larvae were placed on the medium.

Longevity: The flies tested for longevity were obtained as explained in the previous experiment (reared without competition) and taken as they hatched from their pupae. 50 individuals of each isoline and sex were maintained individually in 10x3 cm vials with 10 ml of food medium containing active yeast on the surface. Flies were checked daily. Vials were changed every fortnight, before dehydration of food was evident. All the flies that escaped, were damaged or died during the experiment were included in the analyses.

Fertility: The flies tested for fertility were taken at eclosion from pupae, and were obtained as in the experiments above (reared without competition). Females were

mated individually to two males and were transferred daily to vials with fresh food for 21 consecutive days. The emerged offspring were counted and sexed.

Statistics

Results from each experiment were analyzed globally, all 12 isofemale lines; considering only those isolines with Calvià nuclear DNA, 11 isofemale lines; and considering only those haplotypes native to Calvià, 10 isofemale lines. Additionally, direct comparisons were done of haplotype I and II, and of both lines with haplotype VIII.

Statistical analyses were performed by means of the *SPSS* package (IBM SPSS Statistics, New York, NY, USA). One-way ANOVA was used to test for differences among the several independent groups in the fertility and *VTD* experiments. Viabilities were subjected to the arcsine-square root transformation for statistical analyses, but the results with transformed data were qualitatively indistinguishable from analyses with untransformed data, so only the latter are presented. The longevity was analysed by means of the *Survival Analysis Procedure* (included in the *SPSS* package). The method was that of *Kaplan–Meier survival curves*. The analysis gives, among others parameters, the cumulative survival with time and the mean with standard error (SE) for each curve. The comparison of the several curves was made with the *log-rank test*, so called because it can be shown to be related to a test that uses the logarithms of the ranks of the data.

E-statistic (Moya *et al.*, 1986; Christie *et al.*, 2004) is a fitness parameter that combines data of viabilities and developmental times, and follows the optimality principle that the largest number of adults emerged in the shortest possible time gives the best fitness. The characteristic of this parameter is that it simultaneously maximizes viability, *V*, and the reciprocal of the development time, *DT*, as follows:

$$E = \sum \frac{V_t}{T}$$

where $V_t = n_t/N$ and $T = t/t_{optimal}$; n_t is the number of individuals emerged at time t , N is the input number; and $t_{optimal}$ is a conventional minimum developmental time (here considered 17 days). Hence:

$$E = \sum V_t \frac{t_{optimal}}{t}$$

For computational purposes this formula can also be expressed as

$$E = \frac{t_{optimal}}{N} \sum \frac{n_t}{t}$$

E-statistic is only a combination of viabilities and developmental times and it does not include other fitness components (such as population growth rates or fecundities).

Results

Longevity

Average longevities with standard errors calculated with Kaplan-Meier for males and females of each haplotype are presented on Table 1. In general, females of each haplotype lived significantly longer than their corresponding males. Survival analyses showed significant differences in the dynamics of the different haplotypes. Considering only those haplotypes native to Calvià, haplotypes I and II had intermediate values, and log-rank tests between them were not significant; haplotypes XI and XIII stood out for having the lowest longevities in both sexes, while haplotypes IV and V had the longest longevities for females and males, respectively. With respect to haplotype VIII, log-rank tests between both isofemale lines (VIIIc and VIIIt) indicated a superiority of the flies with the Calvià nuclear DNA background. Furthermore, when comparing all groups, this line was the longest lived, while haplotype VIII upon its own native nuclear background was the shortest lived, in both males and females.

Fertility

Average offspring with standard errors per female and haplotype is presented on Table 2. ANOVA analyses considering all isofemale lines, those with Calvià nuclear DNA, and only those with mtDNA native to Calvià, showed significant differences. On the other hand, *t-tests* between haplotypes I and II, and between both lines with haplotype VIII, were not significant. Haplotypes I and II, and both isolines with haplotype VIII, had intermediate fertility values. Considering those haplotypes native to Calvià, haplotypes XI and XIII, as in the case of longevity, stood out for having the lowest average fertility, while haplotypes IV and V had the most offspring.

Larval viability

Larva-to-adult viabilities with standard errors are shown on Table 3. ANOVA analyses showed significant differences between haplotypes as long as both haplotype

VIII isofemale lines were included; these lines obtained the highest viabilities and were significantly different to the Calvià haplotypes. *t*-tests between haplotypes I and II and between lines with haplotype VIII were not significant.

Developmental time

Average developmental times with standard errors of each haplotype are also presented on Table 3. ANOVA analyses were only significant when isolate VIII_{It} was included. *t*-tests between haplotypes I and II were not significant. *t*-tests between haplotypes VIII were significant and, similarly to that found in the longevity experiment, males and females had the lowest fitness results when upon their own native nuclear background, and had the best fitness results for males and females when upon the nuclear DNA from Calvià.

E-statistic

E-statistic is a fitness parameter that combines data of viabilities and developmental times. Results are shown on Table 3. Results depend heavily upon each haplotype's viability. ANOVA analyses showed significant differences when considering all isolines and when considering those with Calvià nuclear DNA. ANOVA analyses were not significant when both isolines with haplotype VIII were excluded. *t*-tests between haplotypes I and II were not significant, but were so between isolines with haplotypes VIII.

Discussion

In this study we tested different fitness components on a series of isofemale lines of *Drosophila subobscura* that differed in their mtDNAs. The main aim was to study the effects of those conspecific mtDNAs upon their hosts' fitness. Nuclear DNA background variability was uniform due to backcrossing. In doing so, we attempted to: 1) resolve the competence of the rare mtDNA haplotypes of *Drosophila subobscura* in nature in comparison to that of haplotypes I and II, and 2) determine if selection is one of the mechanisms that intervene in this species' mtDNA haplotype pattern. Additionally, in order to observe the effect of nuclear DNA, haplotype VIII, endemic to the Canary Islands, was tested upon its own native nuclear DNA and upon that of Calvià. Our results demonstrate that mtDNA can compromise fitness in *D. subobscura*. Significant differences in fitness were detected in adult longevities, larval viabilities, fertilities and statistic *E*. Although single parameters cannot be directly used to estimate global fitness because of the possibility of antagonistic pleiotropy (Prout, 1971a, b), in the present

work we can affirm that as a general trend some haplotypes were more efficient than others. Considering only those haplotypes native to Calvià, haplotypes XI and XIII seemed to have a negative effect upon their hosts' fitness as they obtained the worst results in various experiments. These disadvantageous haplotypes would surely tend to disappear from the population unless they only affect males, while having apparently little or no effect on females (Ruiz-Pesini *et al.*, 2000; Rand *et al.*, 2001; Sackton *et al.*, 2003). Recent work indicates that mutations in mtDNA are mainly expected to affect males, playing an important role in sperm function, male fertility, and male fitness (Gemmell *et al.*, 2004). Our results support these facts as differences between haplotypes were always higher among males than among females. Although in some experiments we have failed to distinguish between male and female fitness, as in the fertility experiment, we have observed that these mtDNAs can clearly affect female fitness too, as seen in the longevity experiment.

The significant differences in fitness that we have detected in the different experiments could indicate the implication of non-synonymous mutations in the mtDNA with deleterious or near-neutral effects and be the consequence of a gradual accumulation of point mutations in mtDNA rather than by a single specific point mutation, as indicated by other authors (Nachman, 1998; Holyoake *et al.*, 2001; St John *et al.*, 2001). Consequently, the mean fitness of each isofemale line could reflect the total number of deleterious mutations in that one line (Bergstrom and Pritchard, 1998), although evidently selective effects of deleterious mutations will vary, with some being effectively neutral and others strongly deleterious. The accumulation of these non-beneficial mutations in mtDNA would be caused mainly by the bottlenecking of germline mitochondria during transmission between generations (Bergstrom and Pritchard, 1998; Neiman and Taylor, 2009).

The accumulation of deleterious mutations and irreversible decline in fitness in obligatory asexual lineages, known as Muller's Ratchet, has been described in organelle genomes like mitochondria (Lynch, 1996). This process within each particular mtDNA lineage would presumably proceed undetected by RFLPs until a chance mutation would determine a novel haplotype, but a larger accumulation of mutations implies a higher chance of being detected as a novel haplotype and of also having an impaired fitness. As a result, negative selection can be expected to purge from populations these novel or rare haplotypes, reducing their frequency and number instead of them accumulating over time, as would be expected if they were all

selectively neutral variants. Therefore, we consider that negative selection can be considered one of the mechanisms that contribute to this species' mtDNA haplotype pattern in nature. Although there is recent accumulated evidence of recombination in mtDNA and that it may occur regularly (Piganeau *et al.*, 2004; Tsaousis *et al.*, 2005), reparation of the fixed deleterious mutations in a host's mtDNA through recombination is not possible unless the individuals be heteroplasmic through paternal leakage. Reports in *D. subobscura* of heteroplasmy are scarce (Afonso *et al.*, 1990; Volz-Lingenhöhl *et al.*, 1992; Morel *et al.*, 2006). Moreover, in Christie *et al.* (2010) heteroplasmy was not detected in none of the 607 isofemale lines characterized. Consequently, it would be reasonable to suppose that the role of recombination in mitochondrial haplotype survival would not be relevant in *Drosophila* through infrequency, but its importance should not be underestimated if very little recombination is required to counter mutation accumulation (Neiman and Taylor, 2009).

Previous studies have mainly indicated genetic drift as the main mechanism implicated in this dilemma, in part because population bottlenecks in *D. subobscura* are known to be frequent and to have important effects (González *et al.*, 1994; Christie *et al.*, 2010), with a lack of a stable population equilibrium, reflected in an excess of rare haplotypes, indicated by the negative Tajima's *D* values. The results of the present work also support genetic drift because many of the novel haplotypes studied in this paper have similar fitnesses to haplotypes I and II, and so can be considered selectively neutral variants. But which of the two mechanisms would mainly determine this species' mtDNA haplotype pattern? Hedrick (1970) argued that changes in haplotype frequency would be determined primarily by genetic drift rather than by natural selection when the product of the effective population size and the selection coefficient is less than one, because chance effects outweigh those of selection. In this case, we consider that the extinction of rare haplotypes would be mainly due to genetic drift, as the result of seasonal population bottlenecks (with a decrease in the effective population size), having selection when implicated a secondary role. During the seasonal population expansions, disadvantageous mtDNAs would relatively reduce their hosts' offspring production in comparison to other mtDNAs. This phenomenon would increment the probability of extinction of those mtDNA lineages (already at low frequencies as them being novel) upon the event of the annually occurring population bottlenecks. Further still, it is interesting to note the close relationship between bottlenecks and selection. The event of a bottleneck itself has been proved to enhance selection among mtDNA

lineages (Bergstrom and Pritchard, 1998). These authors determined that population size bottlenecks between host generations increase the efficiency of selection among mtDNA lineages against deleterious mutations by increasing the variance in fitness among their eukaryotic hosts.

With respect to haplotype VIII, it is interesting to note that this mtDNA may have a positive effect upon the fitness of its hosts independently to the nuclear DNA background considered, because both isofemale lines with this haplotype obtained the best results in the larval viability test and comparisons among lineages lost significance when both were excluded. This result could partially explain why haplotype VIII is the most frequent haplotype on some of the Canary Islands. Additionally, comparisons between haplotypes I and II did not give significant differences, contrarily to Castro *et al.*, (2003) and Christie *et al.*, (2004). These present results confirm that the fitness differences observed in these two haplotypes were surely due to cytonuclear interactions and not to direct selection upon the mtDNA.

On the other hand, our results also confirm that nuclear DNA has an important effect upon fitness too in *D. subobscura*. In this case, significant differences were observed when comparing haplotype VIII isolines. Against what was expected, haplotype VIII upon a foreign nuclear DNA (isofemale line VIIIc) not only provided better results than upon its own native nuclear DNA (isofemale line VIIIt) but scored better fitness results than the local haplotypes too. Line VIIIc enjoyed of some sort of hybrid vigour that indicates a strong *nuclear x mtDNA* epistatic interaction effect. We find this *mitochondrial heterosis* hard to explain because disruption of nuclear-mitochondrial coadaptation is generally expected to lower fitness (Fos *et al.*, 1990), although it has been observed in interspecific *Drosophila* mtDNA strains (Rand *et al.*, 2006). On the other hand, we consider the poor results of line VIIIt due to the adaptation of the species to the particular conditions found on the Canary Islands and not to inbreeding in the population cages: although the expectation of life at eclosion of inbred flies is approximately half that of non inbred flies (Clarke and Maynard Smith, 1955), fertility results were normal and viability results were the highest indicating that these flies were not inbred (Hollingsworth and Maynard Smith, 1955).

In conclusion, both nuclear and mitochondrial DNA can affect fitness in *D. subobscura* and negative selection can be considered one of the mechanisms that contribute to this species' mtDNA haplotype pattern in nature. The importance of

genetic drift, in the form of seasonal population bottlenecks, must also be considered (Castro *et al.*, 2010; Christie *et al.*, 2010).

Acknowledgements

This work was supported by grants PB96-0793 and BOS2000-1000 from the Dirección General de Enseñanza Superior (Ministerio de Educación y Cultura, Spain).

References

- Afonso JM, Volz A, Hernández M, Ruttkay H, González AM, Larruga JM, Cabrera VM (1990). Mitochondrial DNA variation and genetic structure in Old-World populations of *Drosophila subobscura*. *Mol Biol Evol* **7**:123–142.
- Ayala FJ, Serra LL, Prevosti A (1989). A grand experiment in evolution: the *Drosophila subobscura* colonization of the Americas. *Genome* **31**: 246–255.
- Ballard JWO, Melvin RG (2007). Tetracycline treatment influences mitochondrial metabolism and mtDNA density two generations after treatment in *Drosophila*. *Insect Mol Biol* **16**: 799–802.
- Bergstrom CT, Pritchard J (1998). Germline Bottlenecks and the Evolutionary Maintenance of Mitochondrial Genomes. *Genetics* **149**: 2135–2146
- Castro JA, Ramon M, Picornell A, Moya A (1999). The genetic structure of *Drosophila subobscura* populations from the islands of Majorca and Minorca (Balearic Islands, Spain) based on allozymes and mitochondrial DNA. *Heredity* **83**: 271–279.
- Castro JA, Oliver P, Christie JS, Picornell A, Ramon, M, Moya A (2003). Assortative mating and fertility in two *Drosophila subobscura* strains with different mitochondrial DNA haplotypes. *Genetica* **119**: 295–301.
- Castro JA, Barrio E, González A, Picornell A, Ramon MM, Moya A (2010). Nucleotide diversity of a ND5 fragment confirms that population expansion is the most suitable explanation for the mtDNA haplotype polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetica*. **138**: 819–829.
- Christie JS, Castro JA, Oliver P, Picornell A, Ramon MM, Moya A (2004). Fitness and life-history traits of the two major mitochondrial DNA haplotypes of *Drosophila subobscura*. *Heredity* **93**: 371–378.
- Christie JS, Picornell A, Moya A, Ramon MM, Castro JA (2010). Dynamics of the mtDNA haplotype variability in a *Drosophila subobscura* population over a two-year period. *The Open Evolution Journal* **4**: 23–30.
- Clarke JM, Maynard Smith J (1955). The genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. XI. Hybrid vigour and longevity. *J Genetics* **53**: 172.
- Fos M, Domínguez MA, Latorre A, Moya A (1990). Mitochondrial DNA evolution in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4198–4201.
- García-Martínez J, Castro J.A, Ramón M, Latorre A, Moya A (1998). Mitochondrial DNA haplotype frequencies in natural and experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **149**: 1377–1382.
- Gemmell NJ, Metcalf VJ, Allendorf, FW (2004). Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends Ecol Evol* **19**: 238–244.

- González A, Carrió R, Fernández-Pedrosa V, Moya A (1994). Lack of seasonal changes in mitochondrial DNA variability of a *Drosophila subobscura* population. *J Evol Biol* **7**: 29–38.
- Hedrick PW (1970). Selection in finite populations. I. The probability of fixation and rate of response using transition matrix iteration. *Genetics* **65**: 157–173.
- Hollingsworth MJ, Maynard Smith J (1955). The effects of inbreeding on rate of development and on fertility in *Drosophila subobscura*. *J Genet* **53**: 295–314.
- Holyoake AJ, McHugh P, Wu M, O'Carroll S, Benny P, Sin IL, Sin FY (2001). High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *Int J Androl* **24**: 175–182.
- Latorre A, Moya A, Ayala FJ (1986). Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8649–8653.
- Latorre A, Hernández C, Martínez D, Castro J.A, Ramón M, Moya A (1992). Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of *Drosophila subobscura*. *Heredity* **68**: 15–24.
- Lynch M (1996). Mutation Accumulation in Transfer RNAs: Molecular Evidence for Muller's Ratchet in Mitochondrial Genomes. *Mol Biol Evol* **13**: 209–220.
- Morel F, Renoux M, Alziari S (2006) Mitochondrial biochemical activities and heteroplasmy evolution in established *D. subobscura* cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **42**: 201–217.
- Moya A, González-Candelas F, Ayala FJ (1986). Intra- and intergenotypic competition in *Drosophila melanogaster*: effects of density on larval survival and rate of development. *Genetica* **70**: 59–67.
- Moya A., Barrio E, Martínez D, Latorre A, González-Candelas F, Ramón M, Castro JA (1993). Molecular characterization and cytonuclear disequilibria of two *Drosophila subobscura* mitochondrial haplotypes. *Genome* **36**: 890–898.
- Nachman MW (1998). Deleterious mutations in animal mitochondrial DNA. *Genetica* **103**: 61–69.
- Neiman M, Taylor DR (2009). The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes. *Proc R Soc B* **276**: 1201–1209.
- Oliver P, Castro JA, Picornell A, Ramon MM, Solé E, Balanyà J, Serra L, Latorre A, Moya A (2002). Linkage disequilibria between mtDNA haplotypes and chromosomal arrangements in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Heredity* **89**: 133–138.
- Oliver P, Balanyà J, Ramon MM, Picornell A, Serra L, Moya A, Castro JA (2005). Population dynamics of the two major mitochondrial DNA haplotypes in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genome* **48**: 1010–1018.
- Piganeau G, Gardner M, Eyre-Walker A (2004). A Broad Survey of Recombination in Animal Mitochondria. *Mol Biol Evol* **21**: 2319–2325.
- Pinto FM, Brehm A, Hernandez M, Larruga JM, González AM, Cabrera VM (1997). Population genetic structure and colonization sequence of *Drosophila subobscura* in the Canaries and Madeira Atlantic islands as inferred by autosomal, sex-linked and mtDNA traits. *J Hered* **88**: 108–114.
- Prout T (1971a). The relation between fitness components and population prediction in *Drosophila*. I: the estimation of fitness components. *Genetics* **68**: 127–149.
- Prout T (1971b). The relation between fitness components and population prediction in *Drosophila*. II: population prediction. *Genetics* **68**: 151–167.
- Rand DM, Kann LM (1996). Excess amino acid polymorphism in mitochondrial DNA: contrasts among genes from *Drosophila*, mice, and humans. *Mol Biol Evol* **13**: 737–748.

- Rand DM, Clark AG, Kann LM (2001). Sexually antagonistic cytonuclear fitness interaction in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **159**: 173–187.
- Rand DM, Fry A, Sheldahl L (2006). Nuclear–mitochondrial epistasis and *Drosophila* aging: Introgression of *Drosophila simulans* mtDNA modifies longevity in *D. melanogaster* nuclear backgrounds. *Genetics* **172**: 329–341.
- Rozas JM, Hernandez M, Cabrera VM, Prevosti A (1990). Colonization of America by *Drosophila subobscura*: effect of the founder event on the mitochondrial DNA polymorphism. *Mol Biol Evol* **7**: 103–109.
- Ruiz-Pesini E, Lapena AC, Diez-Sanchez C, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Diaz M, Urries, A, Montoro L, Lopez-Perez M J, Enriquez JA (2000). Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* **67**: 682–696.
- Sackton TB, Haney RA, Rand DM (2003). Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: disruption of cytochrome c oxidase activity in backcross genotypes. *Evolution* **57**: 2315–2325.
- St John JC, Jokhi RP, Barratt CLR (2001). Men with oligoasthenoteratazoospermia harbour higher numbers of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Mol Hum Reprod* **7**: 103–111.
- Tsaousis AD, Martin DP, Ladoukakis ED, Posada D, Zouros E (2005). Widespread Recombination in Published Animal mtDNA Sequences. *Mol Biol Evol* **22**: 925–933.
- Volz-Lingenhöhl A, Solignac M, Sperlich (1992). Stable heteroplasmy for a large-scale deletion in the coding region of *Drosophila subobscura* mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11528–11532.

Table 1. Average adult longevities with standard errors of males and females of each isofemale line, calculated with Kaplan-Meier.

Isofemale line	Adult Longevity (days)		
	Males	Females	Log-Rank
I	78.86 ± 3.78	91.21 ± 3.19	2.82 ns
II	70.44 ± 3.46	93.64 ± 3.83	17.56***
VIII_t	38.36 ± 2.58	52.76 ± 3.68	10.50**
VIII_c	83.76 ± 2.62	94.44 ± 4.49	12.74***
III	72.68 ± 3.43	82.82 ± 3.60	6.01*
IV	77.16 ± 3.55	94.44 ± 4.09	13.75***
V	82.42 ± 3.17	81.36 ± 3.60	0.03 ns
VI	63.46 ± 4.75	82.94 ± 3.65	6.06*
IX	67.49 ± 3.48	86.57 ± 3.89	12.79***
XI	58.24 ± 3.25	78.28 ± 2.94	12.26***
XIII	59.39 ± 3.28	77.74 ± 4.47	20.29***
XVI	68.58 ± 3.35	87.02 ± 4.01	13.63***

Comparisons	Sex	Log-Rank
Global	Females	117.39*** (11)
	Males	167.49*** (11)
Calvià nDNA	Females	30.68*** (10)
	Males	52.98*** (10)
Without VIII	Females	23.22**(9)
	Males	43.00***(9)
I vs II	Females	0.85 ns(1)
	Males	3.06 ns(1)
VIII_t vs VIII_c	Females	45.81***(1)
	Males	75.83***(1)

ns: not significant; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; Degrees of freedom are within parenthesis. Comparisons are calculated with Log-Rank. Comparisons are done globally (all 12 lines), with those lines with Calvià nuclear DNA (11 lines), excluding haplotype VIII (10 lines), haplotype I vs haplotype II, and between lines with haplotype VIII (VIII_t, with Tenerife nuclear DNA, and VIII_c, with Calvià nuclear DNA).

Table 2. Average fertility (offspring per female) with standard errors of each isofemale line. Comparisons are calculated with Log-Rank. Comparisons are done globally (all 12 lines), with those lines with Calvià nuclear DNA (11 lines), excluding haplotype VIII (10 lines), haplotype I vs haplotype II, and between lines with haplotype VIII (VIII_t, with Tenerife nuclear DNA, and VIII_c, with Calvià nuclear DNA).

Isofemale lines	Fertility (average offspring per female)
I	522.14 ± 36.11
II	570.33 ± 49.65
VIII_t	450.93 ± 37.91
VIII_c	506.29 ± 37.17
III	485.00 ± 41.78
IV	593.71 ± 57.48
V	575.14 ± 29.84
VI	468.86 ± 51.14
IX	509.93 ± 38.83
XI	364.54 ± 45.30
XIII	411.14 ± 39.95
XVI	442.93 ± 44.28

Comparisons	ANOVA/t-test
Global	2.520** (11)
Calvià nDNA	2.615** (10)
Without VIII	2.822** (9)
I vs II	-0.776 ns (27)
VIII_t vs VIII_c	-1.043 ns (26)

ns: not significant; ANOVA, analysis of variance; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; Degrees of freedom are within parenthesis.

Comparisons are calculated with Log-Rank. Comparisons are done globally (all 12 lines), with those lines with Calvià nuclear DNA (11 lines), excluding haplotype VIII (10 lines), haplotype I vs haplotype II, and between lines with haplotype VIII (VIII_t, with Tenerife nuclear DNA, and VIII_c, with Calvià nuclear DNA).

Table 3. Larval developmental times, viabilities, and resulting E statistic with standard errors of each isofemale line.

Isofemale line	Larval Developmental Time (days) ^a			Viability (%)	E statistic
	Males	Females	Both sexes	Both sexes	Both sexes
I	17.48 ± 0.30	17.75 ± 0.32	17.63 ± 0.31	80.80 ± 1.75	0.74 ± 0.02
II	17.46 ± 0.22	17.78 ± 0.23	17.63 ± 0.22	76.27 ± 1.91	0.69 ± 0.02
VIII ^t	19.06 ± 0.38	19.35 ± 0.43	19.22 ± 0.40	88.93 ± 1.74	0.74 ± 0.01
VIII ^c	17.05 ± 0.17	17.36 ± 0.19	17.22 ± 0.17	87.43 ± 2.38	0.81 ± 0.02
III	17.70 ± 0.31	17.92 ± 0.35	17.82 ± 0.33	83.57 ± 2.21	0.75 ± 0.02
IV	17.97 ± 0.23	18.33 ± 0.28	18.14 ± 0.25	85.47 ± 2.25	0.76 ± 0.02
V	17.46 ± 0.11	17.77 ± 0.14	17.62 ± 0.12	80.15 ± 1.75	0.73 ± 0.01
VI	17.75 ± 0.27	18.06 ± 0.30	17.90 ± 0.28	80.93 ± 2.08	0.73 ± 0.02
IX	18.17 ± 0.17	18.44 ± 0.17	18.31 ± 0.17	80.80 ± 2.87	0.71 ± 0.02
XI	17.78 ± 0.13	17.94 ± 0.13	17.86 ± 0.13	79.20 ± 1.69	0.71 ± 0.01
XIII	17.87 ± 0.19	18.27 ± 0.21	18.06 ± 0.19	78.40 ± 2.02	0.70 ± 0.02
XVI	17.49 ± 0.29	17.72 ± 0.30	17.60 ± 0.29	81.08 ± 2.18	0.74 ± 0.02

Comparisons	Sex	ANOVA/t-test	Comparisons	ANOVA/t-test	ANOVA/t-test
Global	Females	3.585*** (11)	Global	3.228** (11)	2.905** (11)
	Males	4.241*** (11)		Calvià nDNA	2.222* (10)
Calvià nDNA	Females	1.637 ns (10)	Without VIII	1.504 ns (9)	1.353 ns (9)
	Males	1.815 ns (10)		I vs II	1.747 ns (28)
Without VIII	Females	1.122 ns (9)	VIII ^t vs VIII ^c	0.515 ns (27)	-2.657* (27)
	Males	1.122 ns (9)			
I vs II	Females	-0.096 ns (28)			
	Males	0.06 ns (28)			
VIII ^t vs VIII ^c	Females	4.143*** (27)			
	Males	4.680*** (27)			

ns: not significant; ANOVA, analysis of variance; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; Degrees of freedom are within parenthesis; ^aThe *t*-test was not significant in any case when comparing males and females.

Comparisons are calculated with ANOVA (more than two lines) or with *t*-test (two lines). Comparisons are done globally (all 12 lines), with those lines with Calvià nuclear DNA (11 lines), excluding haplotype VIII (10 lines), haplotype I vs haplotype II, and between lines with haplotype VIII (VIII^t, with Tenerife nuclear DNA, and VIII^c, with Calvià nuclear DNA).

4. DISCUSSIÓ

En aquest treball, hem estudiat la dinàmica temporal i l'eficàcia biològica dels haplotips del DNA mitocondrial (mtDNA) a *Drosophila subobscura*, amb l'objectiu de contribuir al coneixement de les forces evolutives implicades en el manteniment en l'espai i al llarg del temps, del patró d'haplotips mitocondrials que presenten les seves poblacions naturals. En conseqüència, es varen realitzar una sèrie d'estudis en condicions controlades de laboratori, que podem dividir en tres blocs:

- **Primer:** Determinació dels principals components de l'eficàcia biològica i d'història de la vida (cicle vital), dels dos haplotips majoritaris del mtDNA, **I** i **II**.
- **Segon:** Seguiment mensual, durant dos anys, de la variació en les freqüències d'haplotips mitocondrials, en aquest cas a una població natural de *Drosophila subobscura*.
- **Terçer:** Estudi dels components de l'eficàcia biològica i del cicle vital, a una sèrie d'isolínies que només variaven en el seu mtDNA (haplotips **I**, **II** i alguns **rars**), mentre que el genoma nuclear era salvatge i amb variabilitat homogènia.

Els resultats d'aquests estudis confirmen que, a les poblacions naturals de *Drosophila subobscura*, al manteniment del patró d'haplotips mitocondrials s'hi troben implicades, principalment, tres forces evolutives: la deriva genètica, la selecció directa sobre el mtDNA i la selecció epistàtica citonuclear. Aquests resultats corroboren i completen, al menys en part, els resultats obtinguts en estudis previs (Moya i col., 1993; González i col., 1994; Castro i col., 1999 i 2010; Oliver i col., 2002 i 2005).

La discussió s'organitzarà en tres apartats principals:

1. Característiques de l' haplotip **I** versus haplotip **II**.
2. La dinàmica de l'haplotip **VIII**, endèmic de les Illes Canàries.
3. El manteniment dels haplotips **rars**.

4.1. Característiques de l'haplotip **I** versus haplotip **II**

4.1.1. Deriva genètica

Quan a partir de la segona part dels anys 80 es varen començar a realitzar anàlisis de llocs de restricció (RFLPs o RSA) al mtDNA, per a examinar l'estructura poblacional de *Drosophila subobscura* al Vell Món, els primers resultats ja indicaren que hi havia dos haplotips mitocondrials majoritaris, anomenats **I** i **II** (Latorre i col, 1986 i 1992; Afonso i col., 1990). Estudis posteriors confirmarien després que aquests dos haplotips no només són majoritaris sinó que són cosmopolites i que apareixen sempre

en proporcions gairebé equivalents, encara que el II sempre amb un lleuger avantatge (García-Martínez i col., 1998; Castro i col., 1999; Oliver i col., 2002). Estudis a poblacions que han colonitzat el Nou Món als darrers 30 anys, recolzen aquestes observacions, ja que mostren el mateix model de distribució (Ayala i col., 1989; Rozas i col., 1990). Més encara, González i col (1994) varen trobar que les freqüències dels dos haplotips no només eren homogènies geogràficament sinó que tampoc fluctuaven de forma significativa al llarg del temps.

A nivell nucleotídic, el grau de diferenciació entre ambdós haplotips és baix. Latorre i col. (1986 i 1992), mitjançant RSA, varen establir un nombre promig de diferències per lloc entre aquests dos haplotips de 0,0042. Opinaren, a més, que les diferències nucleotídiques serien probablement sinònimes. Seguint aquesta línia d'investigació, Moya i col. (1993) varen estudiar el grau de diferenciació nucleotídica entre els dos haplotips majoritaris. Seqüenciaren un total de 2.377 parells de bases, de sis regions funcionals del complex NADH del mtDNA; és a dir, un 15% del genoma mitocondrial de cada haplotip. Només es trobaren tres diferències, que provaren ser canvis silenciosos a nivell proteic, un dels quals corresponia al punt de restricció per a *HaeIII*, que distingeix ambdós haplotips. Així i tot, consideraren possible (i inclús probable), que la seqüenciació del 85% restant podria revelar diferències significatives. Posteriorment, Castro i col. (2010) confirmaren aquests resultats i, a més a més, demostraren l'estreta correspondència entre els haplotips mitocondrials i les seqüències nucleotídiques.

En base a la baixa diferenciació trobada, Latorre i col. (1992) i Moya i col. (1993) consideraren que els haplotips I i II eren fenotípicament equivalents i, per tant, molt similars pel que fa a la seva eficàcia biològica. En altres paraules, quedava descartada la *selecció* sobre el mtDNA, com la causa més important del manteniment del patró observat, quedant com a explicació més plausible, la *deriva genètica* d'aquests haplotips, a una població d'una certa grandària.

En aquest sentit, alguns resultats obtinguts en el present treball que es presenta, confirmen la deriva genètica com una de les forces determinants de la equifreqüència dels haplotips I i II a la natura. Això és patent principalment a l'estudi de la dinàmica de la variabilitat haplotípica. A una població natural de Calvià es va confirmar la equidistribució geogràfica i temporal d'aquests dos haplotips durant dos anys. Les freqüències dels dos haplotips varen ser similars a altres poblacions de l'espècie, i no fluctuaren significativament al llarg del temps. Encara més, el grau de diferenciació del

mtDNA dins i entre les mostres mensuals (V_w i V_b), així com el grau de subdivisió poblacional (N_{ST}), no donaren resultats significatius, indicant homogeneïtat poblacional. Aquest estudi té moltes similituds amb el de González i col. (1994), però presenta algunes millores significatives, com és la fina dissecció temporal de les mostres (amb un mostreig mensual), la grandària de la mostra (607 isolínies) i un coneixement molt més precís de les condicions climàtiques.

En l'estudi de les eficàcies biològiques dels haplotips I i II, amb un mateix genoma nuclear salvatge i variabilitat homogènia (tercer bloc d'experiments), no trobarem diferències significatives, és a dir, no detectarem un efecte de la selecció directa sobre el mtDNA. Per tant, es pogueren considerar com a variants neutrals. Encara que en aquest cas, la comparació d'eficàcies biològiques es va dur a terme entre isolínies femelles (línies procedents d'un únic mitocondrial), i no entre poblacions de laboratori d'un cert haplotip, o sigui, no formades per un conjunt de línies mitocondrials d'origen distint i classificades sota un mateix haplotip mitocondria; aquest estudi és vàlid, ja que Castro i col. (2010) demostraren l'estreta correspondència entre els haplotips mitocondrials i les seqüències nucleotídiques.

En el cas de considerar la deriva genètica com a la força evolutiva més important en la dinàmica poblacional, una possible explicació per a la distribució d'aquests dos haplotips, i que han defensat diversos autors (Afonso i col., 1990; Castro i col., 2010), és l'efecte de les glaciacions a Europa. Les últimes grans glaciacions, com el de Riss (fa 200.000 anys) i el de Würm (fa 25.000 anys), podrien haver obligat a les *Drosophila*, com a la majoria d'espècies existents, a refugiar-se al sud d'Europa i al Nord d'Àfrica. Posteriorment, amb el retrocés de la zona de gel, les mosques s'haurien expandit als nous territoris recolonitzant-los. Aquesta explicació també s'ha emprat per a explicar la diversificació interespecífica del grup *subobscura* (Latorre i col., 1988; Barrio i col., 1992). Però aquesta explicació sembla que és, al menys, incompleta, pel fet que l'espècie ha colonitzat recentment el continent americà, on no ha sofert els mateixos processos de retrocés i d'expansió, i presenta el mateix patró d'haplotips mitocondrials (Ayala i col., 1989; Rozas i col., 1990), indicant, així, que la deriva genètica no pareix ser l'única força implicada.

4.1.2. Selecció directa al mtDNA

En el present treball, no es va detectar cap diferència entre els haplotips I i II, que pogués atribuir-se del tot a la selecció directa al mtDNA. Altres estudis, en canvi, sí

l'han detectada i, per tant, l'hem de considerar. García-Martínez i col. (1998) i Oliver i col. (2005) posaren a competir aquests dos haplotips en poblacions experimentals, amb genomes nuclears heterogenis (que representaven la composició de les poblacions naturals). Els primers autors observaren una ràpida fixació de l'haplotip II, postulant la selecció com a la força responsable. Els segons, pel contrari, observaren que ambdós haplotips coexistien, encara després de 33 generacions. Les diferències en els resultats entre ambdós experiments, es varen atribuir a que, en el segon, es varen proporcionar unes condicions selectives menys severes com, per exemple, humitejaren els medis de cultiu de les larves. Encara així, i en ambdós casos, els resultats indicaren una tendència lineal significativa, que podria implicar un efecte de selecció directa al mtDNA, així com una desviació no lineal, també estadísticament significativa, que podia ser deguda a una component nuclear.

En principi, seria d'esperar que la diferència en els valors d'eficàcia biològica entre els haplotips I i II, per la selecció directa al mtDNA, d'existir, fos molt petita, degut a l'escassa diferenciació nucleotídica entre ambdós haplotips (Moya i col., 1993; Castro i col., 2010). Aquesta podria ser una raó per la qual, no s'han detectat diferències significatives entre ambdós haplotips en poblacions naturals.

4.1.3. Selecció epistàtica citonuclear

En el present treball, hem detectat indicis importants de que la selecció actua sobre la coadaptació entre nucli i mitocondri. En el primer bloc d'experiments d'aquest treball, s'estudiaren els components d'eficàcia biològica i del cicle vital dels dos haplotips majoritaris, en poblacions de laboratori. S'estudiaren aquells components més emprats a la literatura (Hedrick, 2000), però, hem de tenir en compte, que fer una predicció directa de la direcció de la selecció natural, en base a components separats d'eficàcia biològica, és un fet arriscat (Prout, 1971a i b). Així doncs, només es pot afirmar que s'observà la tendència general de que, en condicions de laboratori, l'haplotip II fou més eficient que l'haplotip I.

Les viabilitats, els temps de desenvolupament i l'estadístic E, mesurats en el procés d'ou a larva, no donaren diferències significatives. Pel contrari, el temps de desenvolupament de larva a adult, fou significativament més curt per a l'haplotip II i l'estadístic E, major. Aquests resultats indiquen un avantatge sobre l'haplotip I, perquè en capses de poblacions, amb generacions discretes, es pot seguir el principi d'optimitat en què el major nombre d'adults que emergeix en el menor temps possible

dóna la major eficàcia biològica. En aquestes condicions de laboratori, les mosques que emergeixen abans poden copular i posar ous més aviat. En conseqüència, les seves larves ocupen el millor lloc en el medi de cultiu i, per tant, s'alimenten millor. Però aquesta explicació no pot ser aplicada del tot a condicions naturals, perquè poden existir avantatges on desenvolupar-se menys ràpidament, pot ser millor en determinades condicions, degut a la major complexitat existent a la natura. En relació a l'estadístic E, aquesta és una bona aproximació a l'eficàcia biològica global de viabilitat i temps de desenvolupament; però s'ha de tenir en compte, que el temps de desenvolupament pot tenir un impacte exponencial sobre la reproducció, mentre que l'impacte de la viabilitat (i altres trets) pot ser només multiplicador.

Per a la longevitat, l'haplotip II mostrà una tendència de major longevitat a ambdós sexes, però només es trobaren diferències significatives dins el conjunt dels mascles. Aquest avantatge podria ser rellevant a les femelles, perquè el mtDNA és de transmissió materna, mentre que no és rellevant als mascles perquè no el transmeten als descendents (Ruiz-Pesini i col., 2000; Rand i col., 2001; Sackton i col., 2003). Però, hem de tenir present, que els mascles contribueixen amb gens nuclears, els quals generen la variabilitat necessària en el cas de les interaccions citonuclears.

En l'apartat que mesura la resistència a la dessecació, tant els mascles com les femelles de l'haplotip II foren superiors a l'haplotip I. Això suposaria una major supervivència durant els períodes més secs de l'any, i és de gran importància, si es té en compte que hem detectat colls d'ampolla poblacionals als estius. La causa d'una diferència entre haplotips, i no només entre els sexes, podria ser explicada per diferències a determinades proteïnes, que presentarien una funcionalitat distinta en condicions cada vegada de major osmolaritat cel·lular, durant l'etapa de dessecació de la mosca. Kennington i col. (2001) demostraren, per aquesta característica, la importància de la contribució materna a la diferenciació poblacional a *Drosophila melanogaster*.

En l'experiment de densitat òptima (paràmetre que té algunes similituds amb la capacitat de càrrega, en els estudis ecològics de dinàmica poblacional), la tendència general fou que l'haplotip II aprofita millor el medi de cultiu, ja que la supervivència d'aquest haplotip a la densitat òptima, fou major que la de l'haplotip I. Això suposa que l'haplotip II té una major eficàcia biològica, en quant a l'aprofitament del medi de cultiu emprat als experiments de laboratori i, és possible, que aquest avantatge pugui també persistir a la natura, quan les condicions són extremes. Però, a la bibliografia, podem

trobar casos de que la interpolació de les característiques competitives obtingudes a partir de monocultius, a dicultius, ha de ser tractada amb precaució, perquè el model de resposta d'ambdós haplotips competint junts (competició inter-haplotípica) no és, necessàriament, del tot predictable d'una manera lineal i additiva, a partir només dels resultats de monocultius (Castro i col., 1985).

En aquest cas, les diferències trobades als components d'eficàcia biològica en aquesta sèrie d'experiments, determinen l'existència d'una selecció que actuà de forma distinta a ambdós haplotips. Amb el disseny experimental fet en aquest estudi, no es pot distingir clarament entre factors que són exclusivament del mtDNA, d'interaccions nuclears amb el mtDNA; però podem afirmar, que el mtDNA sempre hi estava implicat. Aquesta selecció va actuar possiblement sobre el mtDNA, però encara és més probable que ho fes a través d'un tipus de coadaptació selectiva entre els genomes nuclear i mitocondrial (*selecció epistàtica*). Aquest tipus de selecció ja ha estat observada a altres espècies de *Drosophila* (MacRae i Anderson, 1988; Hutter i Rand, 1995; Dowling i col., 2007). El nostre grup d'investigació ha realitzat experiments per a detectar associacions citonuclears epistàtiques a *Drosophila subobscura*. Així, Castro i col. (1999) varen estudiar l'associació entre al-loenzims i haplotips mitocondrials. De 13 al-loenzims estudiats, es va detectar un desequilibri citonuclear amb la fosfatasa àcida-2 (*Acph-2*). Oliver i col. (2002 i 2005) varen estudiar l'associació entre inversions cromosòmiques i haplotips mitocondrials, ja que els primers són bons candidats per a aquest propòsit pel seu caràcter adaptatiu. Així, es va detectar una associació significativa entre l'haplotip I i la inversió J_{ST} , i entre l'haplotip II i la inversió J_1 . Però en ambdós casos, els desequilibris citonuclears demostraren esser transitoris.

En el present treball, a pesar de la transitorietat de les interaccions citonuclears (Babcock i Asmussen, 1996), i encara que a nivell nuclear, ambdós haplotips tenien, presumiblement, la mateixa variabilitat en el moment de la fundació de les seves respectives caixes, és possible que després de nou generacions, alguns desequilibris es poguessin haver format i fossin diferents a les dues capsos.

En aquesta situació es pot dir que, en condicions de laboratori, mosques amb l'haplotip II tenen una major eficàcia biològica que mosques amb l'haplotip I. Llavors seria d'esperar que l'haplotip II desplaqués l'haplotip I a experiments de competència. Aquesta interacció epistàtica és la que podria explicar la superioritat de l'haplotip II sobre l'haplotip I, detectat per García-Martínez i col. (1998) a les seves caixes de poblacions experimentals.

Malauradament, aquestes diferències no es poden extrapolar directament a la natura. La vida a les poblacions de laboratori difereix de la natura: no hi ha microhàbitats, no hi ha diferències en l'accés a l'aliment, tenen una temperatura i humitat constants, la inexistència de rosada, l'absència de predadors, etc. Això es va posar de manifest a l'estudi de Castro i col. (2003), on les significacions de alguns paràmetres genètics, detectades a poblacions de laboratori, varen desaparèixer a poblacions naturals. A la natura, per tant, la situació és més complexa que a poblacions de laboratori; així, la superioritat d'un haplotip mitocondrial ha de ser contrarestada, necessàriament, per l'altre a diferents situacions. És a dir, per a poder explicar les freqüències trobades a la natura, les mosques amb l'haplotip I han de tenir qualche avantatge respecte a mosques amb l'haplotip II. Precisament, a l'estudi de Castro i col. (2003), es va detectar, en alguns casos, la superioritat de l'haplotip I: les femelles aparellades amb mascles de l'haplotip I tenien més descendència i es detectà un aparellament esbiaixat, a on les parelles del mateix haplotip mitocondrial eren les més freqüents, principalment aquelles de l'haplotip I. Per tant, ambdós haplotips podrien desenvolupar interaccions citonuclears, tanmateix transitories, que podrien tenir una importància selectiva a un ambient canviant.

Les característiques de demografia estructural a *Drosophila subobscura*, han mostrat diferències significatives entre estacions (Matos i Rocha Pité, 1989). En aquest sentit, cobra importància l'estudi de la dinàmica de la variabilitat haplotípica (segon bloc del present treball), per a comprovar si un haplotip és afavorit momentàniament en detriment d'un altre. Encara que no es va detectar una variació temporal significativa, l'haplotip II, més nombrós, va ser superat clarament per l'haplotip I a finals de primavera, en els dos anys estudiats. González i col. (1994) no varen detectar una variació temporal significativa, però encara que en el seu estudi l'haplotip I era sempre inferior en nombre a l'haplotip II, les diferències eren menors a les mostres de primavera. Encara que no siguin estadísticament significatius, aquests resultats podrien reflectir selecció deguda a heterogeneïtat ambiental. Per exemple, a la primavera, podria haver un factor que afavorís a l'haplotip I. S'ha de tenir en compte que, en aquests mesos, és quan hi ha una conjunció d'humitat i temperatures òptimes per a l'espècie.

En conclusió, la selecció epistàtica citonuclear sembla ser la primera força responsable del manteniment dels dos haplotips, encara que no es poden descartar altres forces evolutives, com la selecció directa sobre el mtDNA i la deriva genètica.

4.2. Dinàmica de l'haplotip VIII

Diversos estudis han demostrat que les poblacions de *Drosophila subobscura*, a les Illes Canàries, estan clarament diferenciades d'altres poblacions, indicant que constitueixen un conjunt de poblacions molt antigues, que han estat llargament aïllades de les poblacions continentals. Les inversions cromosòmiques observades (Prevosti, 1971 i 1974), suggereixen un llarg aïllament i un polimorfisme ancestral. Els al·loenzims indiquen grans distàncies genètiques amb les poblacions continentals (Cabrera i col., 1980; Larruga i col., 1983; Pinto i col., 1997). Estudis de seqüències genòmiques que inclouen el gen *rp49* (proteïna ribosòmica 49; Rozas i Aguadé, 1990 i 1991) i la regió A+T (Brehm i col., 2004), també suggereixen un aïllament prolongat.

A nivell de mtDNA, s'ha de destacar que el nombre d'haplotips endèmics (aquells haplotips propis i exclusius de determinades localitats o regions), a les Illes Canàries, és pràcticament el doble que a altres poblacions (Afonso i col., 1990; Latorre i col., 1992; Pinto i col., 1997). Per aquest motiu, la seva variabilitat intrapoblacional és molt major que a poblacions continentals. També és destacable la seva divergència nucleotídica respecte a altres poblacions, que arriba a nivells d'interespecificitat (Afonso i col., 1990). Aquestes dades suggereixen que el polimorfisme mitocondrial trobat a les Illes Canàries, és un polimorfisme antic que s'ha diversificat més que al continent.

El **VIII** és l'haplotip endèmic amb major freqüència a les Illes Canàries. Pinto i col. (1997) estudiaren la seva distribució a les diferents illes de l'arxipèlag. És destacable que aquest haplotip és el majoritari a les illes de Tenerife, La Gomera i a Gran Canària (illes més antigues). És en aquestes illes, a on es concentren altres endemismes derivats de l'haplotip **VIII**, i a on es concentra la major diversitat nucleotídica. En canvi, aquest haplotip és minoritari a El Hierro i inexistent a La Palma (illes més joves). En aquestes dues darreres illes, l'haplotip majoritari és el **II** i la diversitat nucleotídica és més baixa, amb uns valors similars a les poblacions continentals. *Drosophila subobscura* no apareix a les illes de Lanzarote i Fuerteventura, probablement degut al clima més sec d'aquestes illes i a l'absència de boscos (Cabrera i col., 1980). Aquestes diferències tan marcades entre illes "velles" i illes "joves", pareixen indicar un efecte fundador fort i recent a El Hierro i a La Palma. En canvi, l'efecte de la deriva genètica en forma de colls d'ampolla estacionals, no s'ha observat i es descarta, donat que les condicions climàtiques no varien notablement al llarg de l'any.

Fins a data d'avui, no s'ha seqüenciat el genoma mitocondrial de l'haplotip **VIII**. Al contrari que amb els haplotips **I** i **II**, és d'esperar que la seqüenciació d'aquest haplotip endèmic, demostrï nombroses diferències nucleotídiques, algunes no sinònimes a nivell proteic. Fins aleshores, el grau de diferenciació de l'haplotip **VIII** respecte als dos haplotips majoritaris i cosmopolites, només s'ha realitzat a nivell de RSA (Latorre i col., 1992) i és molt alt. Mentre que el nombre de diferències, per lloc, entre els haplotips **I** i **II** és de 0,0042; entre els haplotips **I** i **VIII** és de 0,0123, i entre els haplotips **II** i **VIII** de 0,0169. Basant-se en aquest elevat grau de diferenciació, però també en que ni l'haplotip **VIII** ni els seus derivats locals apareixen a poblacions continentals, i en que els dos haplotips majoritaris no han tingut èxit a les illes més antigues de les Canàries, Latorre i col. (1992) suggeriren la possibilitat de l'acció de selecció directa sobre el mtDNA per explicar la seva existència.

En el present treball, els resultats del tercer bloc de l'estudi indiquen que, aquest haplotip mitocondrial, podria aportar un avantatge en termes de l'eficàcia biològica dels individus que el porten, independentment del genoma nuclear considerat. Varem trobar que les isolínies amb aquest haplotip endèmic, independentment de si el seu genoma nuclear fos l'autòcton (de Tenerife) o l'al·lòcton (de Calvià), obtenien els millors resultats en quant a viabilitat larvària. A més a més, quan aquestes dues isolínies eren excloses de les anàlisis, les comparacions entre la resta d'isolínies deixaren de ser significativament diferents. Aquest resultat podria explicar, al menys en part, perquè l'haplotip **VIII** és el més freqüent a algunes de les Illes Canàries.

És de destacar que Fos i col (1990) varen observar l'efecte contrari. L'haplotip **VIII** va provar ser una variant desavantajosa pels seus hostes, amb comparació amb l'haplotip **I**. Aquest estudi també va posar de manifest la importància de la coadaptació citonuclear. Quan es posaren a competir els haplotips **I** i **VIII** sobre distints genomes nuclears a caixes de poblacions, l'haplotip seleccionat positivament (que aconseguia fixar-se), era aquell col·locat sobre el seu genoma nuclear autòcton. En canvi, la superioritat de l'haplotip **I** es va posar de manifest quan els genomes nuclears estaven mesclats, és a dir, quan la coadaptació citonuclear es va truncar.

En el present treball, també es va detectar un important efecte citonuclear entre l'haplotip mitocondrial **VIII** i el genoma nuclear. Això es va fer patent al tercer bloc de l'estudi, en comparar les eficàcies biològiques de dues isolínies amb l'haplotip **VIII** (i derivades d'una mateixa femella inicial), que es diferenciaven pel seu genoma nuclear. Mentre que la isolínia **VIII**, tenia el seu genoma nuclear autòcton (de Tenerife), la

isolínia **VIII_c** tenia un genoma nuclear al·lòcton (de Calvià). En contra del que s'esperava, la isolínia **VIII_c** no només va obtenir millors resultats que la isolínia **VIII_t**, sinó que també va demostrar tenir una major eficàcia biològica, que els haplotips locals de Calvià al seu propi genoma nuclear. La isolínia **VIII_c** va obtenir els millors resultats d'eficàcia biològica als experiments de longevitat (tant els mascles, com les femelles, varen ser els més longeus); de temps de desenvolupament larvari (tant els mascles, com les femelles, varen ser els més ràpids); de viabilitat larvària (només superat per la isolínia **VIII_t**) i a l'estadístic E.

Es pot afirmar que la isolínia **VIII_c** va gaudir de qualche tipus de vigor híbrid, la qual cosa indica una forta interacció epistàtica citonuclear. Aquesta *heterosi mitocondrial* és difícil d'explicar, perquè l'esperat és que la disrupció de la coadaptació citonuclear provoqui una baixada de l'eficàcia biològica (Fos i col., 1990), encara que s'ha observat anteriorment a *Drosophila*, a línies amb mtDNAs interespecífics (Rand i col., 2006). En canvi, considerem que els resultats amb baixos nivells d'eficàcia, de la isolínia **VIII_t**, varen ser deguts a l'adaptació d'aquesta espècie a les condicions particulars de les Illes Canàries, i no a una possible endogàmia a les caixes de poblacions. Es conegut que l'esperança de vida de mosques endogàmiques, a partir de l'eclosió de la pupa, és aproximadament la meitat de la de mosques no endogàmiques (Clarke i Maynard Smith, 1955). En el nostre cas, els resultats obtinguts en les estimes de fertilitat varen ser normals, i els resultats de viabilitat varen ser alts, indicant que aquestes mosques no presentaven efectes derivats de l'endogàmia (Hollingsworth i Maynard Smith, 1955).

En conclusió, podem destacar, de nou, l'efecte d'una interacció nucli-citoplasma, molt evident al estudiar l'haplotip **VIII** amb distints genomes nuclears.

4.3. El manteniment dels haplotips rars

Diversos estudis han constatat l'existència d'haplotips **rars**, o en baixa freqüència, generalment derivats dels haplotips majoritaris, a pràcticament totes les poblacions naturals de *Drosophila subobscura* (Pinto i col., 1997; Castro i col., 1999; Oliver i col., 2002). L'excepció són les poblacions de fundació recent al continent americà, a les quals només s'han detectat els haplotips **I** i **II** (Latorre i col., 1986; Rozas i col., 1990). En general, els resultats d'aquests estudis han indicat un excés d'haplotips **rars**, que s'ha atribuït, principalment, a les expansions poblacionals que es produeixen després de colls d'ampolla estacionals.

Altres estudis també han posat de relleu la importància de la deriva genètica, en la dinàmica d'aquests haplotips mitocondrials. A nivell molecular, la seqüenciació de la regió de *ND5* per Castro i col. (2010) dels haplotips **I**, **II** i alguns **rars** revelaren, principalment, substitucions sinònimes, per la qual cosa aquests haplotips mitocondrials es poden considerar, en general, fenotípicament neutrals. Aquests autors proposaren que els patrons de polimorfisme a *ND5*, eren coherents amb l'expansió poblacional després d'un coll d'ampolla, ocorregut des de l'última glaciació, o per colls d'ampolla estacionals, que ocorren després de l'estiu i de l'hivern. Fos i col. (1990) també demostraren que la deriva genètica té un efecte molt important en poblacions de laboratori, molt especialment en aquells casos a on les poblacions es veuen sotmeses a reduccions periòdiques en el nombre efectiu de femelles.

És un fet que moltes poblacions naturals de *D. subobscura*, sofreixen periòdicament colls d'ampolla estacionals, tant a l'hivern com a l'estiu, on redueixen el nombre efectiu de femelles (Afonso i col., 1990; González i col., 1994). En el present estudi es va detectar, com a mínim, un gran coll d'ampolla estacional a l'estiu de 2001. La nostra experiència suggereix que els estius secs, són la principal raó de la reducció del nombre d'individus, a les poblacions mediterrànies. Mentre que aquesta espècie es troba tan al nord com a Escandinàvia i, en els nostres experiments als mesos més freds, observàrem a les mosques damunt l'esquer (a 10-13°C podien caminar i botar, però no volar), quan el temps era sec i calorós, les mosques varen ser completament absents a l'àrea de mostreig.

En el present treball, uns dels principals resultats que trobarem a l'estudi de la dinàmica temporal dels haplotips mitocondrials, varen ser els valors negatius significatius per a la *D* de Tajima (Tajima, 1989); la qual cosa confirma l'excés de haplotips rars a la població. Aquests resultats confirmen els resultats d'estudis anteriors (González i col., 1994; Oliver i col., 2002), encara que, en general, aquests autors no trobaren significació. Aquest estadístic és utilitzat per a provar desviacions de la hipòtesi de neutralitat, en quant a la distribució d'haplotips mitocondrials. El fonament de la prova és que, en una població panmíctica, sota el model de mutació neutral, no s'espera cap diferència entre la mitjana del nombre de diferències nucleotídiques (heterozigositat nucleotídica) i el nombre de llocs de segregació. Aquest excés d'haplotips rars pot produir-se com a resultat d'un escombrat selectiu (*selective sweep*) recent; escombrat per part d'un al·lel, seguit de la recuperació de mutacions úniques. Però aquesta explicació pareix improbable, degut a la presència dels dos

haplotips majoritaris equifreqüents a la natura. Per altra banda, aquests resultats també es poden produir per expansions poblacionals, després de colls d'ampolla estacionals recurrents. Aquesta darrera explicació pareix esser, doncs, la més plausible per a poder explicar el patró d'haplotips mitocondrials en aquesta espècie.

Altres resultats en el present estudi, també posen de manifest la importància de la deriva genètica, sobre els haplotips minoritaris. Primer, perquè no es va detectar cap tipus d'heterogeneïtat temporal significatiu en la distribució d'aquests haplotips. Segon, perquè en els estudis d'eficàcia biològica d'aquests haplotips **rars**, molts d'ells obtingueren resultats similars als dels dos haplotips majoritaris, **I** i **II**; per la qual cosa, la majoria d'ells pogueren ser considerats com a variants neutres. Tercer, perquè generalment, els haplotips **rars** mostrejats, no es tornaren a trobar després d'un coll d'ampolla estacional. Addicionalment, es compararen els haplotips rars descrits en aquest estudi amb aquells descrits per Oliver i col. (2002), estudi realitzat a la mateixa localització a l'any 1997. No va haver cap coincidència, encara que el present estudi és el més extens fins avui dia, i està basat en el major nombre d'isolínies de *D. subobscura* analitzades fins ara. Encara així, s'ha d'admetre que el remostreig infructuós d'aquells haplotips rars, descrits per Oliver i col. (2002), podria haver estat degut a les seves baixíssimes freqüències.

Per altra banda, la possibilitat de selecció sobre el mtDNA, es posaria de manifest quan existissin substitucions no sinònimes. En aquest sentit, es sap que una proporció substancial de la diversitat intraespecífica del mtDNA, resulta de mutacions semineutres que es fixen, només rarament, dins d'una espècie (Rand i Kann, 1996; Nachman, 1998; Ballard, 2000). Els resultats al tercer bloc d'experiments d'aquesta tesi, demostren que el mtDNA, en alguns casos, pot comprometre l'eficàcia biològica dels seus hostes, és a dir, alguns dels haplotips mitocondrials **rars** de *Drosophila subobscura*, es poden considerar com a variants no neutrals. Es detectaren diferències significatives en la longevitat dels adults, en la viabilitat de les larves, en les fertilitats, i a l'estadístic E. Encara que, en general, els haplotips **rars** nadius de Calvià compartiren resultats similars amb els haplotips majoritaris **I** i **II**, com a mínim dos haplotips mitocondrials, semblaren provocar un efecte negatiu a l'eficàcia biològica dels seus hostes; els haplotips **XI** i **XIII** obtingueren els pitjors resultats, en diversos experiments. Encara que l'estudi de paràmetres per separat, no poden emprar-se directament per a estimar l'eficàcia biològica total, per la possibilitat de *pleiotropia antagonista* (Prout,

1971a i b), podem afirmar que, com a tendència general, alguns haplotips foren menys eficients que altres.

Aquests haplotips poc eficients tendrien, segurament, a desaparèixer de la població, llevat que només afectessin als mascles, mentre que les femelles es veiessin poc o gens afectades (Ruiz-Pesini i col., 2000; Rand i col., 2001; Sackton i col., 2003). Habitualment, s'espera que les mutacions al mtDNA afectin principalment als mascles, amb un paper important en la funció espermàtica, fertilitat masculina i eficàcia biològica masculina (Gemmell i col., 2004). Els resultats presentats en aquesta tesi recolzen aquests fets, ja que les diferències entre haplotips, foren sempre majors entre mascles que entre femelles. Encara que, en alguns experiments, no hem pogut distingir entre les eficàcies biològiques de mascles i de femelles, hem observat que aquests mtDNAs sí poden afectar clarament a l'eficàcia biològica de les femelles, com hem vist en l'experiment de longevitat.

Aquestes diferències significatives en l'eficàcia biològica, podrien indicar la implicació de mutacions no sinònimes en el mtDNA, amb efectes nocius o quasi neutres, i ser la conseqüència d'una acumulació gradual de mutacions puntuals en el mtDNA, més que per una única mutació puntual específica (Holyoake i col., 2001; St. John i col., 2001; Castro i col., 2010). Conseqüentment, l'eficàcia biològica mitjana de cada isolínia, podria reflectir el nombre total de mutacions nocives en aquella línia mitocondrial (Bergstrom i Pritchard, 1998), encara que els efectes, evidentment selectius, de les mutacions variaran, amb algunes sent efectivament neutres i altres fortament nocives. L'acumulació d'aquestes mutacions no beneficioses al mtDNA seria causada, principalment, pels colls d'ampolla mitocondrials ocorreguts a les línees germinals, durant la seva transmissió entre generacions (Bergstrom i Pritchard, 1998; Neiman i Taylor, 2009).

L'acumulació de mutacions nocives i la disminució irreversible en l'eficàcia biològica, en llinatges asexuals obligats, conegut com el "trinquet de Muller", s'ha descrit a genomes d'orgànuls no recombinants, com els mitocondris (Lynch, 1996). Aquest procés, dins de cada llinatge particular de mtDNA, continuaria presumiblement indetectable per RSAs, fins que una mutació casual determinaria un haplotip nou. Però, una acumulació més gran de mutacions, implicaria necessàriament una major probabilitat de ser detectat com a un haplotip nou, i de tenir també una eficàcia biològica menor. Com a resultat, és d'esperar que la selecció negativa depuri de les poblacions aquests haplotips nous o rars, reduint la seva freqüència i el seu nombre, en

comptes de que aquests vagin acumulant-se gradualment, com seria d'esperar si fossin tots variants selectivament neutrals. Per tant, la selecció negativa pot ser considerada com a un dels mecanismes que contribueixen al patró haplotídic mitocondrial d'aquesta espècie a la natura. Encara que hi ha evidència recent de recombinació al mtDNA i de què pot passar amb una certa freqüència (Pigneau i col., 2004; Tsaousis i col., 2005), la reparació de mutacions deletèries al mtDNA d'un hoste per recombinació, no és possible si aquest mtDNA no és heteroplàsmic per fuita paternal. Els casos d'heteroplàsmia descrits a *D. subobscura* són escassos (Afonso i col., 1990; Volz-Lingenhöhl i col., 1992; Morel i col., 2006). És més, en el segon bloc d'experiments, no es va detectar heteroplàsmia a cap de les 607 línies caracteritzades. Conseqüentment, seria raonable suposar, que el rol de la recombinació a la supervivència haplotídica mitocondrial, no seria relevant a *Drosophila*, per infreqüent. De tota manera, la seva importància no ha de ser subestimada, en el cas de què, una reduïda recombinació, sigui capaç de contrarestar l'acumulació de mutacions (Neiman i Taylor, 2009).

Considerem, doncs, que la selecció negativa directa al mtDNA, és un dels mecanismes, que contribueixen al patró d'haplotips mitocondrials d'aquesta espècie en la natura; però, és necessari tenir en compte el poder de la deriva genètica i la interrelació entre ambdues forces. Hedrick (1970) sostenia que els canvis en les freqüències d'haplotips, estarien determinats, principalment, per deriva genètica més que per selecció biològica, quan el producte de la mida de població eficaç i el coeficient de selecció fos menys d'un ($N_e \cdot s < 1$), ja que els efectes de la casualitat superarien als de la selecció. En aquest cas, considerem que l'extinció d'haplotips **rars** seria, principalment, a causa de la deriva genètica, com el resultat de colls d'ampolla estacionals, tenint la selecció (d'estar implicada) un paper més secundari.

La conseqüència directa d'una eficàcia biològica menor, és una reducció en el nombre de descendents. Seria d'esperar que, durant les expansions estacionals de la població, els mtDNAs desfavorables reduïrien relativament la producció de descendents dels seus amfitrions, en comparació a altres mtDNAs. Aquest fenomen augmentaria la probabilitat d'extinció d'aquells llinatges de mtDNA (de per si ja a baixes freqüències, per ser nous), davant l'esdeveniment dels colls d'ampolla poblacionals anuals. És més, s'ha demostrat que l'esdeveniment d'un coll d'ampolla realça el poder de la selecció entre llinatges de mtDNA (Bergstrom i Pritchard, 1998). Aquests autors determinaren que els colls d'ampolla poblacionals entre generacions d'amfitrions, augmenten el rendiment de la selecció entre llinatges de mtDNA, en

contra de mutacions nocives, augmentant la variància en l'eficàcia biològica, entre els seus amfitrions eucariòtics.

Addicionalment, l'estudi de la variabilitat temporal, també va proporcionar indicis de selecció directa al mtDNA dels haplotips **rars**. Encara que els resultats estadístics de variabilitat temporal no varen ser significatius, va cridar l'atenció que a les dues primaveres, és a dir, en moments d'expansió poblacional (mesos en que les mosques eren molt abundants), el nombre d'haplotips rars era molt baix, i de vegades inexistent. Això es va reflectir en valors positius per a la D de Tajima, encara que no significatius quan, en general, els valors obtinguts varen ser negatius. Aquestes dades indiquen que els haplotips **I** i **II** tenien, possiblement, una eficàcia biològica neta superior que la dels haplotips **rars** en aquests mesos, reduint temporalment les seves freqüències. Castro i col., (2010) també trobaren indicis de selecció negativa al mtDNA dels haplotips rars. Mentre que a la major part de les poblacions estudiades, la variabilitat d'haplotips mitocondrials era atribuïble a les expansions poblacionals, la població de Menorca (amb una sèrie d'haplotips rars ancestrals), va apuntar cap a la selecció direccional, com a la causa més plausible de la seva presència.

Per altra banda, en el present treball no es va detectar selecció epistàtica citonuclear als haplotips mitocondrials **rars**. Encara així, aquests efectes no es poden descartar. Castro i col. (2010) varen trobar que la major part dels haplotips **rars**, només es diferenciaven en canvis sinònims i, per tant, podien ser considerats majoritàriament com a variants neutres. Com que la major part dels haplotips rars, són derivats neutres dels dos haplotips majoritaris **I** i **II**, la selecció epistàtica citonuclear en els haplotips **rars** actuaria de la mateixa manera que als haplotips principals dels quals derivaren (aspecte ja discutit anteriorment).

En conclusió, tant el DNA nuclear com el mitocondrial poden afectar a l'eficàcia biològica de *Drosophila subobscura*. La selecció negativa pot ser considerada un dels mecanismes que contribueixen al patró d'haplotips del mtDNA d'aquesta espècie en la naturalesa. La importància de la deriva genètica, en forma de colls d'ampolla de poblacional estacional, també s'ha de considerar.

4.4. Altres forces evolutives

En el manteniment de la equidistribució dels haplotips **I** i **II**, es poden considerar altres forces evolutives, com ara la mutació i la migració. En el present estudi, no s'estudiaren directament aquestes possibilitats, perquè Moya i col. (1993) ja discutiren

l'aportació d'aquests dos mecanismes a la dinàmica poblacional dels haplotips. La *mutació*, ni sola, ni en conjunció amb la selecció, pot justificar freqüències en equilibri properes a 0,5. A més a més, en el transcurs d'aquest treball, no detectarem cap mutació al mtDNA a les poblacions de laboratori. Abans dels experiments, es comprovaven els haplotips mitocondrials de les isolínies i de les caixes de poblacions amb haplotip pur, encara que l'objectiu principal era el de poder descartar una contaminació mitocondrial.

Per altra banda, la *migració* entre poblacions, podria explicar aquesta distribució, però hauria de donar-se en unes taxes molt elevades. De ser així, no explicaria les diferències observades en freqüències d'al·loenzims (Cabrera i col., 1980) i d'inversions cromosòmiques (Krimbas i Loukas, 1980) a les mateixes poblacions. Latorre i col. (1992) determinaren que les poblacions de *Drosophila subobscura* estan més subestructurades respecte al mtDNA, que respecte a marcadors nuclears, com els al·loenzims. Mentre que els estudis d'al·loenzims mostren, generalment, una distribució geogràfica uniforme d'al·lels, la diferència del mtDNA entre poblacions, és d'un ordre de magnitud més gran que dins de les poblacions. En conjunt, això indica valors de flux genètic molt majors per als al·loenzims que per al mtDNA, i es podria explicar per les distintes taxes de migració entre sexes. En estudis de capacitat de dispersió, s'ha demostrat que els mascles tenen una major mobilitat que les femelles (Serra i col., 1987).

En quant als haplotips **rars**, s'ha trobat que els haplotips menys freqüents d'una població no apareixen generalment a altres poblacions. Això pot indicar una baixa taxa de migració, encara que no és descartable un biaix de mostreig, al trobar-se aquests haplotips a molt baixes freqüències. Per altra banda, la mutació podria explicar aquesta observació en part. Com la taxa d'evolució del mtDNA és de 5 a 10 vegades major que la del DNA nuclear, l'aparició de morfes nous a la natura ha de ser constant (Latorre i col., 1986), i la seva aparició només local. El fet que a les poblacions del Nou Món (que només tenen uns 30 anys) només s'hagin detectat els dos haplotips majoritaris (Rozas i col., 1990) recolza aquesta hipòtesi.

A més, és interessant ressaltar el fet del gran nombre d'haplotips descrits en aquest estudi, enfront al més reduït nombre de punts polimòrfics. Mentre els cinc enzims de restricció produïen 17 llocs polimòrfics, es varen obtenir un total de 21 haplotips (10 derivats de l'haplotip I i 11 derivats de l'haplotip II). Això és perquè alguns dels haplotips, compartien els mateixos punts polimòrfics per a un enzim de restricció

(per exemple, *HindIII* o *HpaII*), però diferien en el lloc polimòrfic per a *HaeIII* que distingeix l'haplotip **I** del **II**. Això no és una observació nova, perquè mentre en aquest estudi es detectaren cinc casos, d'altres estan documentats a la bibliografia. Hi ha, com a mínim, un cas així a Afonso i col. (1990), un a González i col. (1994), un altre a García-Martínez i col. (1998), i cinc en el de Castro i col. (1999), quatre dels quals es detectaren dins poblacions veïnes.

Encara que hem d'admetre que aquests haplotips són només electromorfs i no fragments seqüenciats de mtDNA, en els gels d'agarosa semblaven indistingibles quan es corrien junts. Òbviament, no hi ha cap certesa, que els mateixos punts de restricció exactes estiguin implicats quan es corresponen a talls nous (llevat que es seqüenciï), però no quan corresponen a una pèrdua de llocs de restricció (4 ó 6 bp estan implicades). Tal és el cas en els nostres haplotips **VI** i **VII**, i haplotips **XI** i **XII**. Això també s'observa una vegada a Afonso i col. (1990) i dues vegades a Castro i col. (1999), a on els seus haplotips **XXI** i **XXII** no només compartien la pèrdua d'un lloc de restricció, sinó que també compartien un lloc de restricció nou. Aquestes coincidències dins de poblacions són difícils d'explicar, llevat de que es considerin les possibilitats de *hotspots* mutacionals (Galtier i col., 2006) o de recombinació amb el mtDNA patern (Rokas i col., 2003). Un requisit per l'últim supòsit és l'heteroplàsmia, i aquesta es va detectar en una isolínia de *D. subobscura* a Afonso i col. (1990). Òbviament la seqüenciació d'aquests mtDNAs seria l'única manera de resoldre aquest punt.

5. CONCLUSIONS

La **principal conclusió** d'aquest treball és que, a les poblacions naturals de *Drosophila subobscura*, hi intervenen tres forces evolutives: deriva genètica, selecció directa sobre el DNA mitocondrial i selecció epistàtica citonuclear, en el manteniment en l'espai i en el temps del patró d'haplotips mitocondrials

A continuació es presenten **conclusions concretes**:

1. S'han detectat diferències en el temps de desenvolupament, on l'haplotip **II** el presenta més curt. L'estadístic **E**, combinació lineal que optimitza la viabilitat i el temps de desenvolupament, va mostrar la mateixa tendència. Sempre va ser superior en l'haplotip **II**, encara que només va ser significatiu en l'etapa larva-adult.
2. En les corbes de longevitat, s'observà una clara diferència entre mascles i femelles, essent sempre aquestes les més longeves. Entre els dos haplotips, el **II** sempre va ser superior a l'**I**, encara que només de forma significativa en els mascles. En la resistència a la dessecació, sempre l'haplotip **II** va ser superior a l'**I**, en mascles i femelles.
3. En els experiments de densitat òptima, l'haplotip **II** mostrà superioritat sobre l'haplotip **I** en l'aprofitament del medi de cultiu i en la supervivència. A l'estadístic **E** (combinació eficient de la viabilitat i el temps de desenvolupament), la supervivència del **II** també va ser superior a la de l'**I**.
4. D'una manera general podem afirmar, per tant, que l'haplotip **II** va presentar un avantatge sobre l'haplotip **I**, al menys en els components d'eficàcia biològica i dels caràcters del cicle vital considerats en aquest estudi.
5. En l'avantatge selectiu es va detectar una implicació del mtDNA, encara que no varem poder discernir entre una selecció directa sobre el mtDNA i una coadaptació epistàtica citonuclear.
6. L'estadístic **V** va permetre descartar l'existència de variació temporal en la freqüència d'haplotips, i la **D** de Tajima va indicar que hi havia un excés d'haplotips de baixa freqüència a la població. A més, es va constatar que els colls d'ampolla estacionals, tenen efectes molt importants a les poblacions naturals de *Drosophila subobscura*.
7. El patró haplotípic observat a la natura és degut, principalment, a la deriva genètica, en la forma d'expansions poblacionals després de colls d'ampolla estacionals,

com ho confirmaren les anàlisis estadístiques realitzades, encara que no podem descartar la possibilitat d'una selecció epistàtica per heterogeneïtat ambiental, on els haplotips mitocondrials estarien, possiblement, coadaptats amb certes inversions cromosòmiques.

8. Els valors de l'eficàcia biològica de la majoria dels haplotips **rars** varen ser similars als dels haplotips **I** i **II**, indicant que podien ésser considerats com a variants neutres. En aquests casos, la seva presència a la natura estaria determinada per la deriva genètica.
9. Alguns haplotips (**XI** i **XIII**) varen obtenir valors d'eficàcia biològica baixos. Aquestes variants es podrien considerar com a no neutrals i, a la natura, estarien sotmeses a l'acció d'una selecció negativa que podria determinar, en part, el patró haplotípic de *Drosophila subobscura*, tendint a reduir el nombre i freqüència dels haplotips **rars**.
10. S'ha de tenir en compte la importància de la deriva genètica per dos motius: 1. Perquè determinaria l'extinció dels haplotips rars mitjançant els colls d'ampolla poblacionals, i 2. Perquè els mateixos colls d'ampolla poden potenciar la selecció negativa contra les variants deletèries.
11. L'haplotip **VIII** sembla proveir als seus hostes d'una avantatge selectiva, independentment del genoma nuclear, ja que els individus amb aquest haplotip, tenen una viabilitat larva-adult significativament major. Aquest factor, podria explicar la prevalença d'aquest haplotip endèmic a algunes de les illes Canàries.
12. El genoma nuclear va demostrar tenir, també, un efecte important sobre l'eficàcia biològica. La disrupció citonuclear, produïda en el cas de la isolínia on l'haplotip **VIII** (endèmic de Canàries), es va trobar sobre un genoma al·lòcton (Balear), va produir una heterosi mitocondrial inesperada, que indicava una forta interacció epistàtica entre el DNA mitocondrial i nuclear.

6. BIBLIOGRAFIA

- AFONSO, J. M.; VOLZ, A.; HERNÁNDEZ, M.; RUTTKAY, H.; GONZÁLEZ, A. M.; LARRUGA, J. M. (1990). Mitochondrial DNA variation and genetic structure in Old-World populations of *Drosophila subobscura*. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 123-142.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, G. T.; DEBRUIJN, M. H. L.; COULSON, A. L.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, B. A.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J. H.; STADEN, R.; YOUNG, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465.
- ANDERSON, S.; DE BRUIJN M. H. L.; COULSON, A. R.; EPERON, I. C.; SANGER, F.; YOUNG I. G. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA: conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol* **156**: 683-717.
- ARNOLD, J.; ASMUSSEN, M. A.; AVISE, J. C. (1988). An epistatic mating system model can produce permanent cytonuclear disequilibria in a hybrid zone. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **85**: 1893-1896.
- ASHBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON, J. N., JR. (1982). *The genetics and biology of Drosophila*. Academic Press Inc. (London) Ltd. Vol. 2.
- ASHBURNER, M. (1989). *Drosophila, a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ASMUSSEN, M. A.; ARNOLD, J.; AVISE, J. C. (1989). The effects of assortative mating and migration on cytonuclear association in hybrid zones. *Genetics* **122**: 923-934.
- ASMUSSEN, M. A.; ARNOLD, J. (1991). The effects of admixture and population subdivision on cytonuclear disequilibria. *Theor. Pop. Biol.* **39**: 273-300.
- ATTARDI, G.; SCHATZ, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**: 289-333.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T., NEIGEL, J.E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.
- AVISE, J. C.; NELSON, W. S.; ARNOLD, J.; KOEHN, R. K.; WILLIAMS, G. C.; THORSTEINSSON, V. (1990). The evolutionary genetic status of Icelandic eels. *Evolution* **44**: 1254-1262.
- AYALA, F. J. (1972). Frequency-dependent mating advantage in *Drosophila*. *Behav. Genet.* **2**: 85-91.
- BABCOCK, C. S.; ASMUSSEN, M. (1996). Effects of differential selection in the sexes on cytonuclear polymorphism and disequilibria. *Genetics* **144**: 839-853.
- BALANYÀ, J.; HUEY, R. B.; GILCHRIST, G. W.; SERRA, L. (2009). The chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura*: a microevolutionary weapon to monitor global change. *Heredity* **103**: 364-367.

- BALLARD, J. W. O. (2000). Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *J. Mol. Evol.* **51**: 48-63.
- BARRIO, E.; LATORRE, A.; MOYA, A. (1994). Phylogeny of the *Drosophila obscura* species group deduced from mitochondrial DNA sequences. *J. Mol. Evol.* **39**: 478-488.
- BARRIO, E.; AYALA, F. J. (1997). Evolution of the *Drosophila obscura* species group inferred from the *Gpdh* and *Sod* genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**: 79-93.
- BASDEN, E. B. (1954a). The distribution and biology of Drosophilidae (Diptera) in Scotland, including a new species of *Drosophila*. *T. Roy.Soc. Edinburgh* **62**: 602-654.
- BASDEN, E. B. (1954b). Diapause in *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Proc. R. Ent. Soc. Lond.*, (A) **29**: 114-118.
- BECKENBACK, A. T.; PREVOSTI, A. (1986). Colonization of North America by the European species *Drosophila subobscura* and *Drosophila ambigua*. *Am. Midl. Nat.* **115**: 10-18.
- BEGON, M.; SHORROCKS, B. (1978). The feeding and breeding sites of *Drosophila obscura* Fallen and *Drosophila subobscura* Collin. *J. Nat. Hist.* **12**: 137-151.
- BERGSTROM, C. T.; PRITCHARD, J. (1998). Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes. *Genetics.* **149**: 2135-2146.
- BIBB, M. J.; VAN ETEN R. A.; WRIGHT, C. T.; WALBERG, M. W.; CLAYTON, D. A. (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* **26**: 167-180.
- BREEUWER, J. A. J.; STOUTHAMER, R.; BARNS, S. M.; PELLETIER, W. G.; WEISBURG, W. G.; WERREN, J. H. (1992). Phylogeny of cytoplasmic incompatibility micro-organisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol. Biol.* **1**: 25-36.
- BREHM, A.; HARRIS, D. J.; HERNÁNDEZ, M.; CABRERA, V. M.; LARRUGA, J. M.; PINTO, F.M.; GONZÁLEZ, A. M. (2001). Structure and evolution of the mitochondrial DNA complete control region in the *Drosophila subobscura* subgroup. *Insect Mol. Biol.* **10**: 573-578.
- BREHM, A.; HARRIS, D.; HERNÁNDEZ, M.; PEREZ, J. A.; LARRUGA, J. M.; PINTO, F. M.; GONZÁLEZ, A. M. (2004). Phylogeography of *Drosophila subobscura* from north Atlantic islands inferred from mtDNA A+T rich region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **30**: 829-834.
- BRNCIC, D.; PREVOSTI, A.; BUDNIK, M.; MONCLUS, M.; OCAÑA, J. (1981). Colonization of *Drosophila subobscura* in Chile. First population and cytogenetic

- studies. *Genetica* **56**: 3-9.
- BROWN, W. M. (1985). The mitochondrial genome of animals. In: RJ McIntyre (ed) *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum, New York, pp. 95-139.
- BUNDGAARD, J.; CHRISTIANSEN, F. B. (1972). Dynamics of polymorphisms: I. Selection components in a experimental population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **71**: 439-460.
- BURLA, H.; JUNGEN, H.; BÄCHLI, G. (1986). Population structure of *Drosophila subobscura*: nonrandom microdispersion of inversion polymorphism on a mountain slope. *Genetica* **70**: 9-15.
- CABRERA, V. M.; GONZALEZ, A. M.; GULLON, A. (1980). Enzymatic polymorphism in *Drosophila subobscura* populations from the Canary Islands. *Evolution* **34**: 875-887.
- CABRERA, V. M.; GONZALEZ, A. M.; HERNANDEZ, M.; LARRUGA, J. M.; MARTELL, M. (1985). Microgeographic and temporal genetic differentiation in natural populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **110**: 247-256.
- CARSON, H. L.; STALKER, H.D. (1948). Reproductive diapause in *Drosophila robusta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **34**: 124-129.
- CASTRO, J. A.; MOYA, A.; MENSUA, J. L. (1985). Competitive selection in mono-, di- and tri-genotype cultures of *Drosophila melanogaster*. *Z. Zool. Syst. Evolut. –forsch.* **23**: 214-228.
- CASTRO, J. A.; RAMON, M.; PICORNELL, A.; MOYA, A. (1999). The genetic structure of *Drosophila subobscura* populations from the islands of Majorca and Minorca (Balearic Islands, Spain) based on allozymes and mitochondrial DNA. *Heredity* **83**: 271-279.
- CASTRO, J. A.; OLIVER, P.; CHRISTIE, J. S.; PICORNELL, A.; RAMON, M.; MOYA, A. (2003). Assortative mating and fertility in two *Drosophila subobscura* strains with different mitochondrial DNA haplotypes. *Genetica* **119**: 295-301.
- CASTRO, J. A.; BARRIO, E.; GONZÁLEZ, A.; PICORNELL, A.; RAMON, M. M.; MOYA, A. (2010). Nucleotide diversity of a *ND5* fragment confirms that population expansion is the most suitable explanation for the mtDNA haplotype polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetica* **138**: 819-829.
- CÉSPEDES, W. J. (2006) *Evolución termal del polimorfismo cromosómico y la morfometría del ala de una población experimental de Drosophila subobscura*. Tesis doctoral. UAB. B-33212-2006 / 84-689-9991-1.
- CLARKE, J. M.; MAYNARD SMITH, J. (1955). The genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. XI. Hybrid vigour and longevity. *J. Genetics* **53**: 172.

- CLARY, D. O.; WOLSTENHOLME, D. R. (1985). The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* **22**: 252-271.
- CLARY, D. O.; WOLSTENHOLME, D. R. (1987). *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequences in the A+T rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small RNA. *J. Mol. Evol.* **25**: 116-125.
- DARWIN, C. (1871). *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*. London: John Murray.
- DE CRESPIGNY, F. E.; PITT, T. D.; WEDELL, N. (2006). Increased male mating rate in *Drosophila* is associated with *Wolbachia* infection. *J. Evol. Biol.* **19**: 1964-1972.
- DE FRUTOS, R.; PREVOSTI, A. (1984). Temporal changes of chromosomal polymorphism in natural populations of *D. subobscura*. *Genetica* **63**: 181-187.
- DEAN, M. D.; BALLARD, K. J.; GLASS, A.; BALLARD, J. W. O. (2003). Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of east african *Drosophila simulans*. *Genetics* **165**: 1959-1969.
- DOBZHANSKY, T. (1955). A review of some fundamental concepts and problems of population genetics. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **20**: 1-15.
- DOBZHANSKY, T. (1970). *Genetics of the evolutionary process*. New York: Columbia Univ. Press.
- DOBZHANSKY, T.; COOPER, D. M.; PHAFF, H. J.; KNAPP, E. P.; CARSON, H. L. (1956). Studies on the ecology of *Drosophila* in the Yosemite region of California: IV Differential attraction of species of *Drosophila* to different species of yeasts. *Ecology* **37**: 544-550.
- DOWLING, D. K.; FRIBERG, U.; HAILER, F.; ARNQVIST, G. (2007). Intergenomic epistasis for fitness: within-population interactions between cytoplasmic and nuclear genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **175**: 235-244.
- FAURON, C. M. R.; WOLSTENHOLME, D. R. (1980). Extensive diversity among *Drosophila* species with respect to nucleotide sequences within adenine + thymine-rich region of mitochondrial DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **8**: 741-757.
- FERNÁNDEZ IRIARTE, P. J.; BALANYÀ, J.; PASCUAL, M.; MESTRES, F.; HASSON, E. R.; FONTDEVILA, A.; SERRA, L. (2009). Tracking the origin of an invasive species: *Drosophila subobscura* in Argentina. *J. Evol. Biol.* **22**: 650-658.
- FOS, M.; DOMÍNGUEZ, M. A.; LATORRE, A.; MOYA, A. (1990). Mitochondrial DNA evolution in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4198-4201.
- FU, Y. X.; ARNOLD, J. (1991). On the association of restriction fragment length polymorphisms across species boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3967-

3971.

- FU, Y. X.; ARNOLD, J. (1992). Dynamics of cytonuclear disequilibria in finite populations and comparison with a two-locus nuclear system. *Theor. Pop. Biol.* **41**: 1-25.
- GALTIER, N.; ENARD, D.; RADONDY, Y.; BAZIN, E.; BELKHIR, K. (2006). Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. *Genome Res.* **16**: 215-222.
- GAO, J-J; WATABE, H.; AOTSUKA, T.; PANG, J.; ZHANG, Y. (2007). Molecular phylogeny of the *Drosophila obscura* species group, with emphasis on the Old World species. *BMC Evol. Biol.* **7**: 87-98.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; CASTRO, J. A.; RAMÓN, M.; LATORRE, A.; MOYA, A. (1998). Mitochondrial DNA haplotype frequencies in natural and experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **149**: 1377-1382.
- GEMMELL, N. J.; METCALF, V. J.; ALLENDORF, F. W. (2004). Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends Ecol. Evol.* **19**: 238-244.
- GIBS, A. G. (2002). Water balance in desert *Drosophila*: lessons from non-charismatic microfauna. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **133**: 781-789.
- GILCHRIST, G. W.; HUEY, R. B.; SERRA, L. (2001). Rapid evolution of wing size clines in *Drosophila subobscura*. *Genetica* **112-113**: 273-286.
- GILCHRIST, G. W.; HUEY, R. B.; BALANYA, J.; PASCUAL, M.; SERRA, L. (2004). A time series of evolution in action: a latitudinal cline in wing size in South American *Drosophila subobscura*. *Evolution* **58**: 768-780.
- GOLDRING, E. S.; PEACOCK, W.J. (1977). Intramolecular heterogeneity of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biol.* **73**: 279-286.
- GONZÁLEZ, A.; CARRIÓ, R.; FERNÁNDEZ-PEDROSA, V.; MOYA, A. (1994). Lack of seasonal changes in mitochondrial DNA variability of a *Drosophila subobscura* population. *J. Evol. Biol.* **7**: 29-38.
- GORDON, C. (1942). Natural breeding sites of *Drosophila obscura*. *Nature* **149**: 499.
- GRAY, M. W. (1989) Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell Biol.* **5**: 25-50.
- HAUSWIRTH, W.; LAIPIS, P. (1985). *Achievements and perspectives of mitochondrial research* (E. Quagliariello, editor). Elsevier, Amsterdam. pp. 49-59.
- HEDRICK, P. W. (1970). Selection in finite populations. I. The probability of fixation and rate of response using transition matrix iteration. *Genetics* **65**: 157-173.

- HEDRICK, P. W. (2000). *Genetics of Populations*. 2nd edn. Jones and Barlett Publishers International: London.
- HEDRICK, P. W.; MURRAY, E. (1983). Selection and measures of fitness. Ashburner, M. i col. *Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 3. New York: Academic Press. pàg. 61-104.
- HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. (1924). Studies on *Rickettsia*-like microorganisms in insects. *J. Med. Res.* **44**: 329-374.
- HOLLINGSWORTH, M. J.; MAYNARD SMITH, J. (1955). The effects of inbreeding on rate of development and on fertility in *Drosophila subobscura*. *J. Genet.* **53**: 295-314.
- HOLYOAKE, A. J.; MCHUGH, P.; WU, M.; O'CARROLL, S.; BENNY, P.; SIN, I. L.; SIN, F. Y. (2001). High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *Int. J. Androl.* **24**: 175-182.
- HUEY, R. B. L.; PARTRIDGE, L.; FOWLER, K. (1991). Thermal sensitivity of *Drosophila melanogaster* responds rapidly to laboratory natural selection. *Evolution* **45**: 751-756.
- HUEY, R. B.; GILCHRIST, G. W.; CARLSON, M. L.; BERRIGAN, D.; SERRA, L. (2000). Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. *Science* **287**: 207-209.
- HUGHES, K. A.; REYNOLDS, R. M. (2005). Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu. Rev. Entomol.* **50**: 421-445.
- HUTTER, C. M.; RAND, D. M. (1995). Competition between mitochondrial haplotypes in distinct nuclear genetic environments: *Drosophila pseudoobscura* vs *D. persimilis*. *Genetics* **140**: 537-548.
- KARI, J. S.; HUEY, R. B. (2000). Size and seasonal temperature in free-ranging *Drosophila subobscura*. *J. Therm. Biol.* **25**: 267-272.
- KENNINGTON, W. J.; GILCHRIST, A. S.; GOLDSTEIN, D. B.; PARTRIDGE, L. (2001). The genetic bases of divergence in desiccation and starvation resistance among tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **87**: 363-372.
- KONDO, R.; SATTA, Y.; MATSUURA, E. T.; ISHIWA, H.; TAKAHATAT, N.; CHIGUSA, S. I. (1990). Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* **126**: 657-663.
- KOUKOU, K.; PAVLIKAKI, H.; KILIAS, G.; WERREN, J. H.; BOURTZIS, K.; ALAHOTIS, S. N. (2006). Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. *Evol. Biol.* **60**: 87-96.

- KRIMBAS, C. B.; ALEVIZOS, V. (1973). The genetics of *Drosophila subobscura* populations. IV. Further data on inversion polymorphism in Greece. Evidence for microdifferentiation. *Egypt. J. Genet. Cytol.* **2**: 121-132.
- KRIMBAS, C. B.; LOUKAS, M. (1980). The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Evol. Biol.* **12**: 163-234.
- KRIMBAS, C. B. (1992). The inversion polymorphism of *D. subobscura*. In: Krimbas C. B. and Powell J. R. (eds). *Inversion polymorphism in Drosophila*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- KRIMBAS, C.B.; POWELL, J. L. (1992). *Drosophila inversion polymorphism*. CRC. Press. Boca Raton. FL.
- KRIMBAS, C. B. (1993). *Drosophila subobscura. Biology, Genetics and Inversion Polymorphism*. Verlag Dr. Kovač: Hamburg.
- KVIST, L.; MARTENS, J.; NAZARENKO, A. A.; ORELL, M. (2003). Paternal leakage of mitochondrial DNA in the Great Tit (*Parus major*). *Mol. Biol. Evol.* **20**: 243-247.
- LAMB, T.; AVISE, J. C. (1986). Directional introgression of mitochondrial DNA in a hybrid population of treefrogs: the influence of mating behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 2525-2530.
- LARRUGA, J. M.; CABRERA, V. M.; GONZÁLEZ, A. M.; GULLÓN, A. (1983). Molecular and chromosomal polymorphism in continental and insular populations from the south-western range of *D. subobscura*. *Genetica* **60**: 191-205.
- LATORRE, A.; MOYA, A.; AYALA F. J. (1986). Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8649-8653.
- LATORRE, A.; BARRIO, E.; MOYA, A.; AYALA, F. J. (1988). Mitochondrial DNA evolution in the *Drosophila obscura* group. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 717-728.
- LATORRE, A.; HERNANDEZ, C.; MARTINEZ, D.; CASTRO, J. A.; RAMON, M.; MOYA, A. (1992). Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of *Drosophila subobscura*. *Heredity* **58**: 15-24.
- LEWONTIN, R. C. (1985). Population genetics. *Annu. Rev. Genet.* **19**: 81-102.
- LOUKAS, M.; KRIMBAS, C. B. (1975). The genetics of *Drosophila subobscura* populations. V. A study of linkage disequilibrium in natural populations between genes and inversions of the E chromosome. *Genetics* **80**: 331-347.
- LYNCH, M. (1996). Mutation accumulation in transfer RNAs: Molecular evidence for Muller's ratchet in mitochondrial genomes. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 209-220.
- MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. (1967). *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton.

- MACRAE, A. F.; ANDERSON, W. W. (1988). Evidence for non-neutrality of mitochondrial DNA haplotypes in *Drosophila pseudobscura*. *Genetics* **120**: 485-494.
- MATOS, M.; ROCHA PITÉ, M. T. (1989). Egg viability in *Drosophila subobscura* throughout one year under semi-natural conditions. *Evol. Biol.* **3**: 369-382.
- MATOS, M.; AVELAR, T.; ROCHA PITÉ, M. T. (1990). The genetic basis of life-histories. *Cienc. Biol. Ecol. Syst. (Portugal)* **10**: 1-29.
- MATOS, M.; ROSE, M. R.; ROCHA PITÉ, M. T.; REGO, C.; AVELAR, T. (2000). Adaptation to the laboratory environment in *Drosophila subobscura*. *J. Evol. Biol.* **13**: 9-19.
- MAYNARD-SMITH, J. (1989). *Evolutionary Genetics*. Oxford University Press.
- MÉNSUA, J. L.; MOYA, A (1983). Stopped development in overcrowded cultures of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **51**: 347-352.
- MESTRES, F.; BALANYÀ, J.; PREVOSTI, A.; SERRA, L. (1993). Genética evolutiva de la especie colonizadora *Drosophila subobscura*. *Mundo Científico* **13**: 408-416.
- MONCLUS, M.; PREVOSTI, A. (1971). The relationship between mating speed and wing length in *Drosophila subobscura*. *Evolution* **25**: 214-217.
- MONFORTE, A.; BARRIO, E.; LATORRE, A. (1993). Characterization of the length polymorphism in the A+T- rich region of the *Drosophila obscura* group species. *J. Mol. Evol.* **36**: 214-223.
- MOREL, F.; RENOUX, M.; ALZIARI, S. (2006) Mitochondrial biochemical activities and heteroplasmy evolution in established *D. subobscura* cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **42**: 201-207.
- MORETEAU, B.; GIBERT, P.; PÉTAVY, G.; MORTEAU, J.-C.; HUEY, R. B.; DAVID, J. R. (2003). Morphometrical evolution in a *Drosophila* clade: the *Drosophila obscura* group. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **41**: 64-71.
- MOYA, A.; BARRIO, E.; MARTÍNEZ, D.; LATORRE, A.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; RAMÓN, M.; CASTRO, J. A. (1993). Molecular characterization and cytonuclear disequilibria of two *Drosophila subobscura* mitochondrial haplotypes. *Genome* **36**: 890-898.
- MUELLER, L. D.; GRAVES, J. L.; ROSE, M. R. (1993). Interactions between density-dependent and age-specific selection in *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* **7**: 469-479.
- NACHMAN, M. W. (1998). Deleterious mutations in animal mitochondrial DNA. *Genetica* **103**: 61-69.
- NEI, M.; TAJIMA, F. (1981). DNA Polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**: 145-163.

- NEIMAN, M.; TAYLOR, D. R. (2009). The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes. *Proc. R. Soc. B.* **276**: 1201-1209.
- NYLIN, S.; GOTTHARD, K. (1998). Plasticity in life-history traits. *Annu. Rev. Entomol.* **43**: 63-83.
- O'GRADY, P. M.; KIDWELL, G. (2002). Phylogeny of the subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) based on combined analysis of nuclear and mitochondrial sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **22**: 442-453.
- OLIVER, P.; CASTRO, J. A.; PICORNELL, A.; RAMON, M. M.; SOLÉ, E.; BALANYÀ, J.; SERRA, L.; LATORRE, A.; MOYA, A. (2002). Linkage disequilibria between mtDNA haplotypes and chromosomal arrangements in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Heredity* **89**: 133-138.
- OLIVER, P.; BALANYA, J.; RAMON, M. M.; PICORNELL, A.; SERRA, L.; MOYA, A.; CASTRO, J. A. (2005). Population dynamics of the 2 major mitochondrial DNA haplotypes in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genome.* **48**: 1010-1018.
- O'NEILL, S. L.; GIORDANO, R.; COLBERT, A. M. E.; KARR, T. L.; ROBERTSON, H. M. (1992). 16SrRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2699-2702.
- ORENGO, D. J.; PREVOSTI, A. (2002). Relationship between chromosomal polymorphism and wing size in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Genetica* **115**: 311-318.
- PEACOCK, W. J.; BRUTLAG, D.; GOLDRING, E.; APPELS, R.; HINTON, C. W.; LINDSLEY, D. L. (1974). The organization of highly repeated DNA sequences in *Drosophila melanogaster* chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 405-416.
- PIGNEAU, G.; GARDNER, M.; EYRE-WALKER, A. (2004). A broad survey of recombination in animal mitochondria. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 2319-2325.
- PIPKIN, S. B. (1952). Seasonal fluctuations in *Drosophila* populations at different altitudes in the Lebanon mountains. *Mol. Gen. Genet.* **84**: 270-305.
- PINTO, F. M.; BREHM, A.; HERNANDEZ, M.; LARRUGA, J. M.; GONZÁLEZ, A. M.; CABRERA, V. M. (1997). Population genetic structure and colonization sequence of *Drosophila subobscura* in the Canaries and Madeira Atlantic islands as inferred by autosomal, sex-linked and mtDNA traits. *J. Hered.* **88**: 108-114.
- PREVOSTI, A. (1971). Chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura* Collins populations from the Canary Islands. *Genet. Iber.* **23**:1-16.
- PREVOSTI, A. (1974). Chromosomal inversion polymorphism in the south-western

range of *Drosophila subobscura* distribution area. *Genetica* **45**: 111-124.

- PREVOSTI, A.; GARCIA, M. P.; SERRA, L.; AGUADE, M.; RIBO, G.; SAGARRA, E. (1983). Association between allelic isozyme alleles and chromosomal arrangements in European populations and Chilean colonizers of *Drosophila subobscura*. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* **10**: 171-191.
- PREVOSTI, A.; RIBO, G.; SERRA, L.; AGUADÉ, M.; BALAÑA, J.; MONCLUS, M.; MESTRES, F. (1988). Colonization of America by *Drosophila subobscura*: experiment in natural populations that supports the adaptive role of chromosomal-inversion polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 5597-5600.
- PREVOSTI, A.; SERRA, LI. (2000). La evolución biológica, su ritmo y predicción. *Investigación y Ciencia* **291**: 4-12.
- PROUT, T. (1971a). The relation between fitness components and population prediction in *Drosophila*. I: the estimation of fitness components. *Genetics* **68**: 127-149.
- PROUT, T. (1971b). The relation between fitness components and population prediction in *Drosophila*. II: population prediction. *Genetics* **68**: 151-167.
- RAND, D. M.; HARRISON, R. G. (1989). Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. *Genetics* **121**: 551-569.
- RAND, D. M.; KANN, L. M. (1996). Excess amino acid polymorphism in mitochondrial DNA: contrasts among genes from *Drosophila*, mice, and humans. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 737-748.
- RAND, D. M.; CLARK, A. G.; KANN, L. M. (2001). Sexually antagonistic cytonuclear fitness interaction in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **159**: 173-187.
- RAND, D. M.; FRY, A.; SHELDAHL, L. (2006). Nuclear-mitochondrial epistasis and *Drosophila* aging: Introgression of *Drosophila simulans* mtDNA modifies longevity in *D. melanogaster* nuclear backgrounds. *Genetics* **172**: 329-341.
- RIGAUD, T.; SOUTY-GROSSET, C.; RAIMOND, R.; MOCQUARD, J. P.; JUCHAULT, P. (1991). Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latv. (Isopoda): recent acquisitions. *Endocytobiosis Cell Res.* **7**: 259-273.
- RIGAUD, T.; JUCHAULT, P. (1993). Conflict between feminizing sex ratio disorders and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *Genetics* **133**: 247-252.
- RIPA, J.; OLOFSSON, H.; JONZÉN, N. (2010). What is bet-hedging, really? *Proc. R. Soc. B* **277**: 1153-1154
- ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecol. Evol.* **18**: 411-417.

- ROSE, M. R.; CHARLESWORTH, B. (1981). Genetics of life history in *Drosophila melanogaster*. II. Exploratory selection experiments. *Genetics* **97**: 187-196.
- ROSE, M. R. (1984). Laboratory evolution of postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **38**: 1004-1010.
- ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M. (1992). *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. London B.* **250**: 91-98.
- ROZAS, J. M.; HERNANDEZ, M.; CABRERA, V. M.; PREVOSTI, A. (1990). Colonization of America by *Drosophila subobscura*: effect of the founder event on the mitochondrial DNA polymorphism. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 103-109.
- ROZAS, J.; AGUADE, M. (1990). Evidence of extensive genetic exchange in the *rp49* region among polymorphic chromosome inversions in *Drosophila subobscura*. *Genetics* **126**: 417-426.
- ROZAS, J.; AGUADE, M. (1991). Study of an isolated population at the nucleotide level: *rp49* region of a Canarian population of *Drosophila subobscura*. *Mol. Biol. Evol.* **8**: 202-211.
- RUIZ-PESINI, E.; LAPENA, A. C.; DIEZ-SANCHEZ, C.; PEREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; DIAZ, M.; URRIES, A.; MONTORO, L.; LOPEZ-PEREZ, M. J.; ENRIQUEZ, J. A. (2000). Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 682-696.
- SACKTON, T. B.; HANEY, R. A.; RAND, D. M. (2003). Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: disruption of cytochrome c oxidase activity in backcross genotypes. *Evolution* **57**: 2315-2325.
- SANTOS, M.; FOWLER, K.; PARTRIDGE, L. (1992). On the use of tester stocks to predict the competitive ability of genotypes. *Heredity* **69**: 489-495.
- SANTOS, M. (2009). Recombination load in a chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **181**: 803-809.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; ZHANG, Q.; NEALE, D. B.; ALLARD, R. W. (1992). Associations between nuclear loci and chloroplast DNA genotypes in wild barley. *Genetics* **131**: 225-231.
- SERRA, L.; PEGUEROLES, G.; MESTRES, F. (1987). Capacity of dispersal of a colonizing species: *Drosophila subobscura*. *Genetica* **73**: 223-235.
- SHAH, D. M.; LANGLEY, C. H. (1979). Inter- and intraspecific variation in restriction maps of *Drosophila* mitochondrial DNAs. *Nature* **281**: 696-699.
- SHORROCKS, B. (1972). *Invertebrate types. Drosophila*. Pergamon Press Ltd.
- SHORROCKS, B. (1982). The breeding sites of temperate woodland *Drosophila*. Pp.

- 385-428. In: M. Ashburner; H. L. Carson; J. N. Thompson (Eds). The genetics and biology of *Drosophila*. Vol. 3b. Academy Press London.
- SOKOLOV, N. N.; DUBININ, N. P. (1941). Permanent heterozygosity in *Drosophila*. *Dros. Inform. Serv.* **15**: 39-40.
- SOLIGNAC, M.; MONNEROT, M.; MOUNOLOU, J. C. (1986). Concerted evolution of sequence repeats in *Drosophila* mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **23**: 53-60.
- ST JOHN, J. C.; JOKHI, R. P.; BARRATT, C. L. R. (2001). Men with oligoasthenoteratozoospermia harbour higher numbers of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Mol. Hum. Reprod.* **7**: 103-111.
- STOUTHAMER, R.; BREUWER, A. J.; LUCK, R. F.; WERREN, J. H. (1993). Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* **361**: 247-252.
- STRACHAN, T.; READ, A. P. (1996). *Human Molecular Genetics*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- SUTOVSKY, P.; MORENO, R. D.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; SIMERLY, C.; SCHATTEN, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **402**: 371-372.
- TAJIMA, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595.
- TAYLOR, C. E.; KEKIC, V. (1988). Sexual selection in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **42**: 197-199.
- TOWNSEND, J. P.; RAND, D. M. (2004). Mitochondrial genome size variation in New World and Old World population of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **93**: 98-103.
- TSAOUSIS, A. D.; MARTIN, D. P.; LADOUKAKIS, E. D.; POSADA, D.; ZOUROS, E. (2005). Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **22**: 925-933.
- UPHOLT, W.; DAWID, B. (1977). Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the *D loop* region. *Cell* **11**: 571-583.
- VOLZ-LINGENHÖHL, A.; SOLIGNAC, M.; SPERLICH, D. (1992). Stable heteroplasmy for a large-scale deletion in the coding region of *Drosophila subobscura* mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:11528-11532.
- WILKINSON, G. S.; PRESGRAVES, D. C.; CRYMES, L. (1998). Male eye span in male stalk-eyed flies indicates genetic quality by meiotic drive suppression. *Nature* **391**: 276-279.

- WILSON A. C.; CANN R. L., CARR, S. M.; GEORGE M., GYLLENSTEN, U. B.; HELMBYCHOWSKI, K. M.; HIGUCHI, R. G.; PALUMBI, S. R.; PRAGER, E. M.; SAGE, R. D.; STONEKING, M. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* **26**: 375-400.
- YEN, J. H.; BARR, A. R. (1971). New hypotheses of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature* **232**: 657-658.
- ZAPATA, C.; ALVAREZ, G.; RODRIGUEZ-TRELLES, F.; MASIDE, X. (2000). A long-term study on seasonal changes of gametic disequilibrium between allozymes and inversions in *Drosophila subobscura*. *Evolution* **54**: 1673-1679.
- ZCHORI-FEIN, E.; FAKTOR, O.; ZEIDAN, M.; GOTTLIEB, Y.; CZOSSNER, H.; ROSEN, D. (1995). Parthenogenesis-inducing microorganisms in *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Mol. Biol.* **4**: 173-178.

7. ANNEX

7.1. Bibliografía personal relacionada amb el tema

7.1.1. Resum de les Comunicacions a Congressos

Christie, J. S.; Oliver, P.; Castro, J. A.; Ramon, M. M.; Picornell, A.; Moya, A. Study of some fitness components in two mtDNA haplotypes of *Drosophila subobscura*. *VII ESEB Congress*. Barcelona. 23-28 d'agost de 1999.

Castro, J. A.; Ramon, M. M.; Picornell, A.; Oliver, P.; **Christie, J. S.**; Terrasa, B.; Latorre, A.; Moya, A. Aspectos genético-poblacionales de los haplotipos mitocondriales de *Drosophila subobscura* en las Islas Baleares. *XIII Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución*. Baiona. 8-11 de noviembre de 2000.

Castro, J. A.; Oliver, P.; **Christie, J. S.**; Picornell, A.; Ramon, M. M.; Moya, A. Apareamiento y fertilidad en los haplotipos mitocondriales I y II de *Drosophila subobscura*. *Congreso de la Sociedad Española de Genética*. Sevilla. 19-21 de setembre de 2001.

Castro, J. A.; **Christie, J. S.**; Oliver, P.; Picornell, A.; Ramon, M. M.; Moya, A. Estudio de componentes de eficacia y dinámica poblacional de haplotipos mitocondriales de *Drosophila subobscura*. *XIV Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución*. Gandía. 13-16 de noviembre de 2002.

Study of some fitness components in two mtDNA haplotypes of *Drosophila subobscura*

J.S. Christie, P. Oliver, J.A. Castro, M.M. Ramon, A. Picornell and A. Moya*

Laboratori de Genètica, Departament de Biologia. Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca (Balears), Spain.

* *Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva i Departament de Genètica, Bujassot (València), Spain.*

Previous studies on the distribution of mtDNA haplotypes in the Old World populations of *Drosophila subobscura* have shown the presence of two widespread and almost equally frequent haplotypes (I and II), as well as a set of less common haplotypes present at low frequency in the populations, with the exception of the Canary Islands, where an endemic haplotype is the most frequent. The same distribution pattern has been detected in the New World colonizing populations of *D. subobscura*. It is still an unresolved question which evolutionary processes account for this distribution. The difference between haplotype I and II is a synonymous change in the cutting site of *HaeIII* in the NADH5 gene of the mitochondrial genome. We have studied some fitness components of these two haplotypes in order to detect some differences between them. The larva to adult viability and development time in non-competition conditions, the survival optimal density, the adult longevity, the egg to larva viability and emerging time or the differences in weight and the resistance to dryness are some of these fitness components. As a general rule, we have detected small differences between the two haplotypes, in some cases significant, and favouring the haplotype II. For example, the viability of haplotype I is 63.23 ± 2.40 and that of haplotype II 68.92 ± 2.25 . It is possible that the addition of these small differences could help to explain the dynamics of this species in nature with respect to the mtDNA.

Aspectos genético-poblacionales de los haplotipos mitocondriales de *Drosophila subobscura* en las Islas Baleares

J. A. Castro¹, M. M. Ramon¹, A. Picornell¹, P. Oliver¹, J. Christie¹, B. Terrasa¹, A. Latorre² y A. Moya²

¹ *Laboratori de Genètica, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de les Illes Balears*

² *Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva i Departament de Genètica, Universitat de València*

En la mayoría de poblaciones naturales de *Drosophila subobscura* estudiadas se han encontrado dos haplotipos mayoritarios del DNA mitocondrial, el I y el II, que se diferencian por un cambio sinónimo en una diana de restricción de la enzima *HaeIII*, así como una serie de haplotipos menos frecuentes (inferiores al 5%) que suelen ser diferentes en el tiempo y en el espacio entre las poblaciones. Los resultados obtenidos hasta el momento no han resuelto la dinámica poblacional de estos haplotipos en la naturaleza, pues si bien en unas primeras experiencias en cajas de poblaciones el haplotipo II se imponía al I, experiencias similares recientes no confirman tales resultados. Por otro lado, los análisis de desequilibrio citonuclear de los haplotipos con marcadores nucleares enzimáticos tampoco arrojan resultados significativos, pero sí las inversiones cromosómicas. En efecto, hemos detectado una asociación diferencial, concretamente del haplotipo I con la inversión J_{ST} y el II con la J_I . De confirmarse tal asociación con nuevos datos, estaríamos muy posiblemente frente a un caso de arrastre selectivo transitorio, dado el probado valor adaptativo de las inversiones.

El estudio de los componentes de eficacia biológica, tales como viabilidad, tiempo de desarrollo, longevidad o resistencia a la desecación, parecen dar una ligera superioridad al haplotipo II sobre el I. Actualmente estamos llevando a cabo experimentos de apareamiento y de selección dependiente de las frecuencias.

Finalmente indicar que para poder tener una explicación adecuada de la distribución típica del DNA mitocondrial de esta especie en forma de dos haplotipos mayoritarios y múltiples haplotipos de baja frecuencia se necesitan aproximaciones integradas de tipo genético-poblacional, ecológica y molecular. Por tal motivo, los resultados indicados anteriormente se complementan con las investigación en curso de estos otros: 1.- Dinámica anual de los haplotipos mitocondriales de una población natural de *Drosophila subobscura*. 2.- Impacto del ambiente sobre la distribución de haplotipos. 3.- Estudio de las componentes de eficacia de los haplotipos menos comunes. 4.- Norma de reacción de las cajas de poblaciones con la temperatura. 5.- Nuevo estudio de la asociación de haplotipos mitocondriales a inversiones. 6.- Asociación de los haplotipos mitocondriales con marcadores nucleares tipo STRs. 7.- Análisis de la secuencia nucleotídica de una región de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa.

APAREAMIENTO Y FERTILIDAD EN LOS HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES I Y II DE *DROSOPHILA SUBOBSCURA*

Castro, J.A.; Oliver, P; Christie, J.S.; Picornell, A.; Ramon, M.M.; Moya, A.*

Laboratori de Genètica. Departament de Biologia. Universitat de les Illes Balears. *Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva i Departament de Genètica. Universitat de València.

Estudios previos de poblaciones europeas y americanas de *Drosophila subobscura* han constatado la existencia de dos haplotipos mayoritarios y casi equifrecuentes (I y II), que se diferencian por un cambio sinónimo en la subunidad NADH5 del gen NADH mitocondrial, así como una serie de haplotipos menos frecuentes, derivados de los dos anteriores, que no sobrepasan el 5%. Con la excepción de las Islas Canarias, donde un haplotipo endémico es el más frecuente en algunas islas. En el presente trabajo hemos analizado las posibles diferencias de apareamiento y de fertilidad para los haplotipos I y II de una muestra de la Isla de Mallorca, como una aportación más en la comprensión de la dinámica poblacional de estos haplotipos. Los apareamientos formados se analizaron aplicando los índices de selección y aislamiento sexuales clásicos, así como los estadísticos descritos por Rolán-Alvarez y Caballero (*Evolution*, 54: 30-36 (2000)). Los índices de selección sexual no fueron significativos, pero todos los índices de aislamiento sexual mostraron la existencia de un apareamiento diferencial entre los dos haplotipos, con preferencia a formar parejas entre individuos del mismo haplotipo. El índice total de apareamiento (PTI) fue altamente significativo entre los individuos del haplotipo I. Sin embargo, estos estadísticos no proporcionan información de las posibles causas biológicas que están actuando. Por otra parte, analizando la descendencia de cada pareja, considerando que los componentes de la fertilidad son, principalmente, la fecundidad de las hembras y el éxito de apareamiento de los machos, no se detectaron diferencias de fertilidad entre las diferentes parejas formadas. Estos resultados, junto con otros experimentos que estamos actualmente llevando a cabo, hacen pensar en un fenómeno complejo de selección que equilibraría las frecuencias de los dos haplotipos, sin descartar fenómenos más complejos de interacción citonuclear, también selectiva y de arrastre genético; es decir, se podría tratar de un caso complejo de evolución de caracteres.

Estudio de componentes de eficacia y dinámica poblacional de haplotipos mitocondriales de *Drosophila subobscura*.

Castro, J. A., Christie, J. S., Oliver, P., Picornell, A., Ramon, M. M., Moya, A.*

Laboratori de Genètica, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca (Balears); *Institut "Cavanilles" de Biodiversitat i Biologia Evolutiva i Departament de Genètica, Universitat de València, Burjassot (València).

Los estudios llevados a cabo durante los últimos años sobre la dinámica poblacional de los haplotipos mitocondriales en poblaciones naturales de *Drosophila subobscura* han permitido encontrar dos haplotipos mayoritarios del DNA mitocondrial, el I y el II, que se diferencian por un cambio sinónimo en una diana de restricción de la enzima *HaeIII*, así como una serie de haplotipos menos frecuentes (inferiores al 5%) que suelen ser diferentes en las poblaciones en el tiempo y en el espacio. Tales estudios se han llevado a cabo tanto con poblaciones naturales como de laboratorio. Ambos aportan datos complementarios.

Los resultados obtenidos hasta el momento, sobre desequilibrios citonucleares con enzimas de restricción e inversiones, apuntan hacia la acción de la selección, principalmente epistática o de algún tipo de arrastre genético, que podría explicar la frecuencia de equilibrio de los dos haplotipos en la naturaleza, pero también la superioridad del haplotipo II sobre el I en cajas de laboratorio.

Para determinar el alcance de la selección, hemos llevado a cabo estudios de componentes de eficacia (viabilidad, tiempo de desarrollo, longevidad, resistencia a la desecación) en poblaciones de laboratorio, las cuales apuntan hacia una superioridad del haplotipo II sobre el I, lo que contrasta con lo encontrado en la naturaleza. En experimentos de apareamiento, los índices de selección sexual no fueron significativos, pero todos los índices de aislamiento sexual mostraron la existencia de un apareamiento diferencial entre los dos haplotipos, con preferencia a formar parejas los individuos del mismo haplotipo. Estos resultados no se confirmaron en poblaciones de la naturaleza.

Los resultados obtenidos, abundan en la idea de la existencia de relaciones citonucleares en condiciones de laboratorio diferentes de la naturaleza. Actualmente, estamos llevado a cabo un estudio genético-ecológico, siguiendo mensualmente a lo largo de dos años las frecuencias de los diferentes haplotipos. Se ha confirmado la prevalencia del haplotipo II sobre el I en situaciones idóneas (primavera), y la existencia de cuellos de botella, con una disminución del número de individuos. Por otro lado, estamos determinando la secuencia nucleotídica de una región de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa.

7.1.2. Publicacions en revistes

- Castro, J. A.; Oliver, P.; **Christie, J. S.**; Picornell, A.; Ramon, M.; Moya, A. (2003). Assortative mating and fertility in two *Drosophila subobscura* strains with different mitochondrial DNA haplotypes. *Genetica* **119**: 295-301.
- Christie, J. S.**; Castro, J. A.; Oliver, P.; Picornell, A.; Ramon, M. M.; Moya, A. (2004). Fitness and life-history traits of the two major mitochondrial DNA haplotypes of *Drosophila subobscura*. *Heredity* **93**: 371-378.
- Christie, J. S.**; Picornell, A.; Moya, A.; Ramon, M. M.; Castro, J. A. (2010). Dynamics of the mtDNA Haplotype Variability in a *Drosophila subobscura* Population Over a Two-Year Period. *The Open Evolution Journal* **4**: 23-30.
- Christie, J. S.**; Picornell, A.; Moya, A.; Ramon, M.M.; Castro, J.A. (2011). Mitochondrial DNA effects on fitness in *Drosophila subobscura*. *Heredity*, online.