



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Título 1: Secuenciación parcial del genoma mitocondrial de *Drosophila buzzatii*

Título 2: Secuenciación parcial do xenoma mitocondrial de *Drosophila buzzatii*

Título 3: Partial sequencing of the mitochondrial genome of *Drosophila buzzatii*

Eduardo Rodríguez Carro

Curso: 2019 - 2020

Convocatoria: Septiembre

*Directores: Prof. Horacio Naveira Fachal
Prof. Antón Vila Sanjurjo*

ÍNDICE

Resumen

Palabras clave

1.- Introducción.....	1
2.- Objetivos.....	4
3.- Material y métodos.....	4
3.1.- Purificación del ADN.....	4
3.2.- Amplificación de los fragmentos del ADN mediante la PCR.....	4
3.3.- Electroforesis en gel de agarosa.....	7
3.4.- Análisis de las secuencias.....	7
4.- Resultados.....	8
4.1.- Geles de agarosa.....	8
4.2.- Alineamiento de las secuencias.....	10
5.- Discusión.....	16
6.- Conclusiones.....	19
7.- Bibliografía.....	20

RESUMEN

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares, y es el lugar donde tiene lugar la fosforilación oxidativa, a través de la cual se produce energía celular en forma de adenosina trifosfato (ATP). Estos orgánulos tienen su propio genoma constituido por genes que codifican para ARNs ribosomales (ARN_r), ARNs de transferencia (ARN_t), y proteínas de la cadena respiratoria y proteínas ribosomales. *Drosophila melanogaster* se ha utilizado como modelo animal para comprender la biología de distintas enfermedades mitocondriales relacionadas con el genoma mitocondrial, y, además, secuencias del ADN mitocondrial (ADN_{mt}) se han usado para establecer relaciones filogenéticas entre especies próximas de *Drosophila* y de otros muchos géneros del reino animal. En el presente trabajo hemos amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fragmentos del ADN_{mt} de *D. buzzatii* B6 (salvaje) y *D. buzzatii* white (mutante), y se secuenciaron 6 fragmentos de ADN_{mt}. Utilizando el software Ugene hemos realizado un alineamiento múltiple de secuencias con una secuencia de referencia consenso del genoma mitocondrial de *Drosophila buzzatii*. Los datos indican discrepancias entre las secuencias amplificadas y la secuencia de referencia, la mayor parte de los cambios son sustituciones, de las cuales, la mayoría son transiciones y también se observan transversiones y deficiencias. Hay estudios que muestran que alteraciones puntuales en el ADN_{mt} de *Drosophila* tienen un efecto en el fenotipo de los individuos y en la biología mitocondrial. Sería necesario realizar más investigaciones para saber si los cambios que hemos detectado entre los fragmentos de ADN_{mt} y la secuencia de referencia tienen algún efecto a nivel mitocondrial en *Drosophila buzzatii*.

RESUMO

As mitocondrias son orgánulos intracelulares e é o lugar onde ten lugar a fosforilación oxidativa, a través da cal prodúcese enerxía celular en forma de adenosin trifosfato (ATP). Estes orgánulos teñen un xenoma propio composto por xenes que codifican os ARN ribosómicos (ARN_r), os ARN de transferencia (ARN_t) e as proteínas da cadea respiratoria e as proteínas ribosómicas.

Drosophila melanogaster usouse como modelo animal para comprender a bioloxía de diferentes enfermidades mitocondriales relacionadas co xenoma mitocondrial e, ademais, usáronse secuencias de ADN_{mt} para establecer relacións filoxenéticas entre especies próximas de *Drosophila* e de outros moitos xéneros do reino animal. No presente traballo, amplificamos mediante a reacción en cadea da polimerasa (PCR) fragmentos de ADN_{mt} de *D. buzzatii* B6 (salvaje) y *D. buzzatii* white (mutante), e se secuenciaron 6 fragmentos de ADN_{mt}. Usando o software Ugene, realizamos unha aliñación de secuencias múltiples cunha secuencia de referencia do xenoma mitocondrial de *Drosophila buzzatii*. Os datos indican discrepancias entre as secuencias amplificadas e a secuencia de referencia, a maioría das modificacións son substitucións, e a maior parte delas son transicións, tamén se observan transversións e deficiencias. Outros estudos demostraron que os cambios puntuais no ADN_{mt} de *Drosophila* teñen un efecto sobre o fenotipo de individuos e na bioloxía mitocondrial. Será necesario máis investigación para ver se os cambios detectados entre os fragmentos de ADN_{mt} e a secuencia de referencia teñen algún efecto a nivel mitocondrial en *Drosophila buzzatii*.

ABSTRACT

Mitochondria are intracellular organelles, where oxidative phosphorylation takes place, through which cellular energy is produced in the form of adenosine triphosphate (ATP). These organelles have their own genome consisting of genes that code for ribosomal RNAs (rRNAs), transfer RNAs (tRNAs), and respiratory chain proteins and ribosomal proteins. *Drosophila melanogaster* has been used as an animal model to understand the biology of different mitochondrial diseases related to the mitochondrial genome. Additionally, mtDNA sequences have been used to establish phylogenetic relationships among closely related animal species. In the present work, we have amplified by PCR (polymerase chain reaction) several fragments of mtDNA of *D. buzzatii* B6 (wild type) and *D. buzzatii* white (mutant), and 6 fragments were sequenced. Using the Ugene software, we have performed a multiple sequence alignment with a reference sequence of the *Drosophila buzzatii* mitochondrial genome. The data indicates discrepancies between the amplified sequences and the

reference sequence, most of the changes are substitutions, and most of them are transitions, and transversions, and deletions are also observed. Other studies have shown that point changes in *Drosophila* mtDNA have an effect on the phenotype of individuals and on mitochondrial biology. More research would be required to see if the changes we have detected between the mtDNA fragments and the reference sequence could have any effect at the mitochondrial level in *Drosophila buzzatii*.

PALABRAS CLAVE

Polimorfismo, ADN_{mt}, PCR, Ugene, evolución, electroferograma, sustitución nucleotídica, alineamiento múltiple.

PALABRAS CLAVE.

Polimorfismo, ADN_{mt}, PCR, Ugene, evolución, electroferograma, sustitución de nucleótidos, alineamiento múltiple.

KEYWORDS.

Polymorphism, mtDNA, PCR, Ugene, evolution, electropherogram, nucleotide substitution, multiple alignment.

1.- INTRODUCCIÓN

Drosophila melanogaster ha sido ampliamente estudiada ya que presenta numerosas ventajas como organismo modelo, y ha contribuido al avance de diversas disciplinas de la biología, como la genética, biología del desarrollo, ecología y biología evolutiva, y también constituye un organismo modelo para el estudio de patologías mitocondriales (Markow & O'Grady 2007; Foriel *et al.*, 2015).

Desde un punto de vista ecológico el género *Drosophila* es altamente diverso. Hay especies que se reproducen en flores, hongos y savia de los árboles, y otras, como las incluidas en el grupo *repleta*, constituido por más de 100 especies, utilizan para su reproducción cactus, frutos y otros tejidos de la planta, y se alimentan de las levaduras asociadas con el proceso de descomposición (revisado en Markow & O'Grady 2008; Hasson *et al.*, 2019; Moreyra *et al.*, 2019).

Las especies de *Drosophila* cactófilas tienen diferentes distribuciones geográficas y plantas hospedadoras, y constituyen un modelo de gran utilidad para estudiar las interacciones genético-ambientales y la adaptación ecológica (Guillén *et al.*, 2014). Una especie cactófila que ha sido objeto de numerosas investigaciones es *Drosophila buzzatii*. Esta especie se incluye dentro del cluster *buzzatii* (grupo *repleta*, subgénero *Drosophila*). Las especies del cluster *buzzatii* son casi indistinguibles en la morfología externa, si bien diferencias en la morfología del edeago, los cromosomas politénicos e inversiones cromosómicas permitieron en el pasado la identificación de especies (Manfrin *et al.*, 2006; Hasson *et al.*, 2019). *Drosophila buzzatii* utiliza los cladodios y frutos de los cactus del género *Opuntia* como sustrato de puesta de huevos y alimentación, y se ha visto que la presencia de alcaloides tóxicos en estos cactus tienen un efecto en la viabilidad, morfología del ala, apareamiento, estabilidad en el desarrollo, y también ejercen un papel modulador de la expresión génica en *D. buzzatii* (Hasson *et al.*, 2019). Diversos estudios han evidenciado que diversos rasgos fenotípicos de *Drosophila buzzatii* se ven afectados por la temperatura, y esta también tiene un efecto en el desarrollo (Dahlgard & Loeschcke, 1997; Vollmer *et al.*, 2004). Aunque el clima parece no tener un efecto en rasgos fenotípicos relacionados con el stress en larvas y

adultos en poblaciones del sudeste de Australia, sí que otros parámetros, como la latitud y distancia a la costa, pueden afectar incluso al tamaño del tórax y de las alas (Loeschcke *et al.*, 2000; Sarup *et al.*, 2006).

González *et al.* (2005) construyeron una biblioteca genómica basada en clones BAC (cromosoma artificial bacteriano) de *Drosophila buzzatii* y, más recientemente, también se ha secuenciado utilizando librerías genómicas y el contenido de transposones se ha comparado con otras especies del género *Drosophila* (Rius *et al.*, 2016).

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares presentes en las células eucariotas. En relación con su origen la teoría más aceptada es la de la endosimbiosis, la cual, propone que la mitocondria se originó a partir de un simbiote intracelular bacteriano (Margulis, 1975; Pittis & Gabaldón, 2016). La función principal de las mitocondrias es la síntesis de ATP, a través del proceso conocido con el nombre de fosforilación oxidativa. La fosforilación oxidativa constituye una de las rutas bioquímicas más conservadas en la mitocondria (Mentel & Martin, 2008). Las mitocondrias además también participan en la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos, y en otros procesos celulares como la apoptosis y en diversas cascadas de señalización (Logan, 2007). Las mitocondrias son orgánulos que contienen su propio genoma. Estos genomas muestran una gran diversidad en tamaño y organización. En plantas las reordenaciones del genoma mitocondrial son frecuentes; sin embargo, en animales son raras. El genoma mitocondrial animal contiene un número pequeño de genes, generalmente 37. Esta cantidad es muy baja en comparación con los más de 20.000 del núcleo, donde algunos de los genes también ayudan a la función mitocondrial. Los genes mitocondriales codifican ARNs ribosomales (ARN_r), ARNs de transferencia (ARN_t), proteínas de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria y proteínas ribosomales. Aunque el número de genes de la mitocondria es bajo, mutaciones en estos genes causan diversas patologías en humanos (Burger *et al.*, 2003; Salinas *et al.*, 2008; Hamers, 2016). El genoma mitocondrial de *Drosophila melanogaster* presenta 37 genes (2 ARN_r, 22 ARN_t, y 13 polipéptidos implicados en la fosforilación oxidativa). Tanto en su contenido genómico como en su estructura es similar al de otros genomas mitocondriales de otras especies del género

Drosophila, tanto en su contenido genómico como en su estructura (Garesse, 1998; Garesse & Kaguni, 2005; Kang *et al.*, 2016; Salminen & Vale, 2020).

El genoma mitocondrial difiere del genoma nuclear en varios aspectos, incluido su herencia uniparental, tamaño, y el poseer una alta tasa de mutación (Barr *et al.*, 2005). En un estudio se ha visto que las mutaciones en el ADN mitocondrial (ADN_{mt}) tienen un efecto en la fisiología y esperanza de vida de las moscas de la fruta (Kauppila *et al.*, 2018). Más recientemente, utilizando técnicas de ingeniería genética se ha visto que la presencia de mutaciones (sustituciones) en el ADN_{mt} afecta a la función mitocondrial, y también tiene un efecto en la longevidad de *Drosophila* (Andreazza *et al.*, 2019). La replicación del ADN mitocondrial (ADN_{mt}) ocurre independientemente del ciclo celular y de la replicación de genes nucleares. Una diferencia entre la cromatina nuclear y el genoma mitocondrial, es que el ADN_{mt} no está asociado a histonas formando nucleosomas. Pero el ADN_{mt} no está desnudo, sino que se encuentra empaquetado formando unos complejos proteínas-ADN_{mt}, denominados nucleoides; en cada mitocondria se encuentran miles de moléculas de ADN_{mt} que se disponen en numerosos nucleoides, y que funcionan como unidades de propagación para la replicación del ADN_{mt}, segregación y expresión de genes (Sun & Jin, 2017). Numerosos procesos metabólicos celulares están implicados en la regulación de los nucleoides mitocondriales controlando la estabilización, mantenimiento, distribución y herencia del genoma mitocondrial (Sun & Jin, 2017).

Las características del genoma mitocondrial hacen que sea de gran utilidad en estudios evolutivos y que se utilice para establecer las relaciones filogenéticas entre especies próximas y, sobre todo, entre poblaciones conoespecíficas, lo que aporta conocimiento a como han ido evolucionando los genomas. En concreto, las secuencias de genes mitocondriales han sido utilizadas para establecer las relaciones filogenéticas entre distintas especies de *Drosophila*, entre las que se incluyen fragmentos de genes que codifican por el ARN_r16S, citocromo C oxidasa II, citocromo C oxidasa I (COI) presentes en el genoma mitocondrial (Durando *et al.*, 2000; Manfrin *et al.*, 2001). Más recientemente, se realizó el análisis de cinco genomas mitocondriales de varias especies del cluster *buzzatii* cuyas conclusiones apoyan el origen monofilético del grupo de

Drosophila buzzatii. Aunque los resultados están de acuerdo con estudios previos basados en genes mitocondriales y genes nucleares, muestran discrepancias cuando se realiza un análisis del genoma nuclear a mayor escala, lo que hace que estos autores concluyan que los genomas mitocondriales y los genomas nucleares puedan reflejar diferentes historias evolutivas (Moreyra *et al.*, 2019).

2.- OBJETIVOS

En el presente trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Amplificación mediante la técnica de PCR de fragmentos de ADN mitocondrial de *D. buzzatii* white (cepa mutante de ojos blancos, obtenida hace 20 años en el laboratorio de Genética de la Universidad Autónoma de Barcelona) y *D. buzzatii* B6 (cepa silvestre, procedente de la localidad argentina de San Luis).
- Secuenciación de 6 fragmentos de ADN mitocondrial, y comparación de las secuencias obtenidas con una secuencia de referencia de *Drosophila buzzatii*.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Purificación del ADN.

En la purificación del ADN se utilizó un kit de extracción NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZY Tech), y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN se extrajo de dos ejemplares por cepa. Por último, se visualizó la concentración de ADN obtenida por un Nanodrop 1000 (Thermo scientific). Se obtuvieron dos concentraciones diferentes por cepa: 17,5 ng/μL y 27,5 ng/μL para *D. buzzatii* white (mutante), y 16,3 ng/μL y 15 ng/μL para *D. buzzatii* B6 (salvaje).

3.2.- Amplificación de los fragmentos de ADN mediante la PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica *in vitro* ampliamente utilizada en el campo de la biología molecular. Esta técnica amplifica el ADN y permite obtener millones de copias de un segmento específico de ADN a partir de una cantidad mínima. Su especificidad se basa en la hibridación de secuencias. En esta técnica se utilizan secuencias cortas de ADN llamados cebadores o *primers*, que nos permiten seleccionar las secuencias que

queremos amplificar. Durante el proceso la muestra es sometida a cambios repetidos de temperatura llamados ciclos. En cada uno de los ciclos se produce la desnaturalización del ADN, la hibridación de los *primers* y el alargamiento de estos por una ADN-polimerasa; por lo tanto, en cada ciclo se duplica el número de moléculas de ADN, lo que va produciendo una amplificación exponencial (Quan *et al.*, 2018).

La amplificación del ADN se realizó mediante PCR a partir de 27 ng/ μ L de ADN purificados en una reacción de volumen total de 15 μ L. Para la PCR se utilizaron los *primers* que se indican en la Tabla 1. Los *primers* se generaron basándose en las secuencias que utiliza el laboratorio de Bill Ballard (University of New South Wales, Sydney, Australia) para amplificar por PCR el ADN_{mt} de *D. melanogaster* (<http://billb.babs.unsw.edu.au/primers.htm>), tras la construcción de un alineamiento múltiple de las secuencias de *D. melanogaster*, *D. mojavensis* y el ensamblaje de *D. buzzatii*, y el mapeo de los sitios de unión de los *primers* de *D. melanogaster* en las otras dos secuencias de ADN_{mt} (información suministrada por el grupo de investigación). En base a los *primers* utilizados los genes que se van a amplificar son: citocromo oxidasa III, citocromo oxidasa I, subunidad F₀ de la ATP-sintasa, subunidad III de la NADH deshidrogenasa y un ARN_t-Ala.

<i>Primers</i>	Nombre del <i>Primer</i> en <i>buzzatii</i>	Secuencia 5'-3'
1(8)	F_1149-1173 R_2730-2760	F: cctcctgctttaacacttttgtag R: gtcaatatcatgctgctgcttcaaacc
2(14)	F_999-1023 R_2730-2760	F: gtaattgtaacagctcacgctttg R: gtcaatatcatgctgctgcttcaaacc
3(16)	F_1925-1953 R_3199-3227	F: gctcttttagtttagaatcagctgttgc R: ccttgatttcattcatggataatccacc

Tabla 1.- *Primers forward* (F) y *reverse* (R) utilizados para la amplificación del ADN_{mt} de *D. buzzatii* white y *D. buzzatii* B6. Entre paréntesis se indica el número con que se corresponde cada uno de los *primers* en el listado de *primers* que posee el grupo de investigación.

En la primera reacción utilizamos 12 tubos problema y 3 controles a 4 temperaturas diferentes y a 3 concentraciones de MgCl₂ diferentes. Para la realización de la PCR se siguió el programa indicado en la tabla 2.

Realizamos 3 reacciones de prueba y 1 control negativo (cada control se hizo sustituyendo la solución de ADN molde por H₂O milli-Q de tipo I) para comprobar la temperatura de anillado, para lo cual usamos los reactivos antes mencionados en las mismas concentraciones, excepto el MgCl₂, obteniendo 3 concentraciones finales llevadas a 3 tubos eppendorf:

1.- Control: 3,375 µL de *primer forward*, 3,375 µL de *primer reverse*, 33,75 µL de Master Mix, 29,675 µL de H₂O mili-Q de tipo I.

2.- Sin MgCl₂: 3,375 µL de *primer forward*, 3,375 µL de *primer reverse*, 33,75 µL de Master Mix, 5,675 ng/µL de ADN y 21,325 µL de H₂O.

3.- Concentración de MgCl₂ 1 mM: 3,375 µL de *primer forward*, 3,375 µL de *primer reverse*, 33,75 µL de Master Mix, 1,35 µL MgCl₂ 50 mM, 5,675 ng/µL de ADN y 19,975 µL de H₂O.

4.- Concentración de MgCl₂ 2,5 mM: 3,375 µL de *primer forward*, 3,375 µL de *primer reverse*, 33,75 µL de Master Mix, 3,375 µL MgCl₂, 5,675 ng/µL de ADN y 17,95 µL de H₂O.

La reacción final ya optimizada estaría constituida por: 7,5 µL de Master Mix, 0,75 µL de *primer forward*, 0,75 µL de *primer reverse*, 1,5 µL de H₂O (tipo I) y 0,75 µL de MgCl₂ y 2 µL de ADN molde.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	30-60	25-35
Anillamiento	45	30-60	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	5-10 min	1

Tabla 2. Ciclos utilizados en la PCR con las temperaturas y tiempos de cada una de las fases.

3.3.- Electroforesis en gel de agarosa.

Las muestras amplificadas mediante la PCR se hicieron migrar en un gel de agarosa al 2% en una cubeta de electroforesis durante dos horas (Voltaje: 90 V). Los geles se pusieron en una cubeta y se cubrieron con RedSafe, se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se fotografiaron con cámara digital.

3.4.- Análisis de las secuencias.

Para el alineamiento de las secuencias obtenidas (las cuales se obtuvieron de la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) utilizando el método Sanger) con la secuencia de referencia (GenBank: MN551232.1; Moreyra et al., 2019) hemos utilizado el programa bioinformático Ugene (<http://ugene.net/>), que permite visualizar secuencias genómicas, datos de ensamblaje de secuenciación de próxima generación (NGS), alineamientos de secuencias múltiples, árboles filogenéticos y estructuras 3D. Para el proceso de secuenciación se utilizaron los mismos *primers* que para la PCR.

Las secuencias en formato fasta se trasladaron al *Notebook*. Luego se abrieron con Ugene y se realizó el alineamiento, eligiendo la opción Herramientas, Alineamiento múltiple de secuencias y alinear con ClustalO. A continuación, se obtuvo el reverso complementario de las tres secuencias que mostraron más diferencias con respecto a la secuencia de referencia, que fueron las secuencias E03, F05 y G05. Para ello, seleccionamos estas secuencias, clicamos con el botón derecho del ratón, elegimos la opción *revcompl* y repetimos el procedimiento anterior para alinearlas (Alinear y luego Alinear con ClustalO).

Este alineamiento se guardó como un documento de texto haciendo clic sobre el botón derecho y eligiendo la opción exportar y guardar subalineamiento. En nuestro caso había dos zonas de alineamiento bien diferenciadas, así que en la opción “De” y “a”, delimitamos dos intervalos de principio y fin para cada una de dichas zonas, ya que en el medio de estas zonas hay una región muy grande en la que no hay alineamiento alguno. Después de definir estos intervalos, elegimos el formato ClustalW, hicimos clic en extraer y finalmente abrimos el subalineamiento con *Notebook*.

Para analizar las discrepancias entre nuestras secuencias y la de referencia utilizaremos la información contenida en los electroferogramas de cada una de las secuencias

Para comprobar si una discrepancia está apoyada o no, nos fijamos en los picos del electroferograma. Si el pico está bien marcado, la discrepancia estará apoyada, si el pico es pequeño o se suaviza en la discrepancia, ésta no lo estará.

4.- RESULTADOS

4.1.- Geles de agarosa.

Para la realización de la primera reacción se utilizó ADN_{mt} de *D. buzzatii* white y la pareja de *primers* 1(8), se aplicaron distintas temperaturas y diferentes concentraciones de MgCl₂. Los fragmentos obtenidos se muestran en la Fig. 1. Se realizó una amplificación a 55 °C (carriles 4, 5 y 6), 51,9 °C (carriles 7, 8 y 9), 45,5 °C (carriles 10, 11 y 12) y 40 °C (carriles 13, 14 y 15), y se aplicaron tres concentraciones de MgCl₂ en cada temperatura, a saber, 2,5 mM (carriles 4, 7, 10 y 13), 1 mM (carriles 5, 8, 11 y 14), y 0,5 mM (carriles 6, 9, 12 y 15). Como se puede ver en la Fig. 1, en cada uno de los carriles se observaron numerosas bandas, cuando lo que queremos obtener es una única banda de 3800 pb. La localización de esta banda se indica en la figura (flecha blanca). Además, como se puede ver en la imagen del gel de agarosa, en contra de lo esperado se obtuvo una banda en uno de los controles negativos (carril 2). Se repitió la reacción y se obtuvo un patrón de bandas similar, y como era de esperar en los controles negativos no se observó ninguna banda.

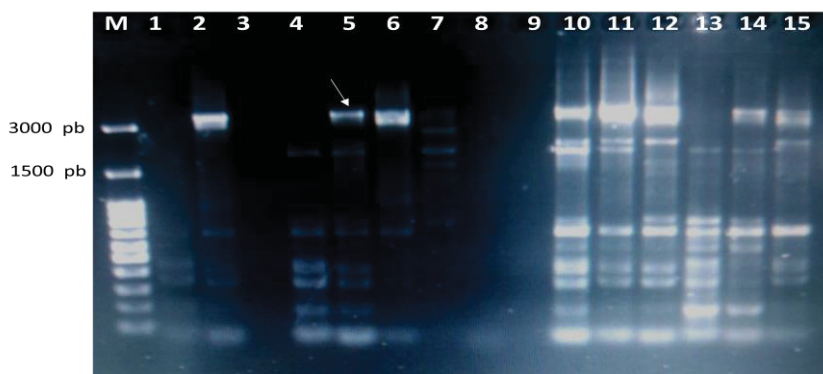


Fig. 1.- Imagen de un gel de agarosa mostrando el patrón de bandas de los productos amplificados a partir de ADN_{mt} de *D. buzzatii* white utilizando la pareja de *primers* 1(8) a diferentes temperaturas y concentraciones de MgCl₂. Controles negativos: carriles 1, 2 y 3. La flecha blanca indica una banda de un tamaño de 3800 pb. M, marcador de peso molecular.

Los fragmentos amplificados a partir de ADN_{mt} de *D. buzzatii* white (carriles 2 y 5 en la Fig. 2) y *D. buzzatii* B6 (carriles 3 y 6 en la Fig. 2) con los *primers* 1(8) y 2(14), a 2,5 mM de MgCl₂, se visualizaron como una única banda de 3800 pb (flechas blancas en la Fig. 2).

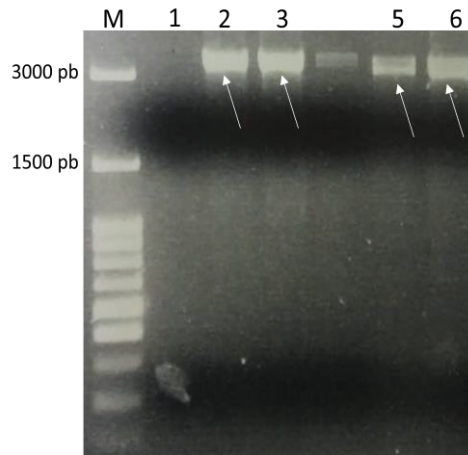


Fig. 2.- Imagen de un gel de agarosa, donde se observan los fragmentos amplificados (flechas blancas) de *D. buzzatii* w. (carriles 2 y 5) y *D. buzzatii* B6 (carriles 3 y 6) con las parejas de *primers* 1(8) (carriles 5 y 6) y 2(14) (carriles 2 y 3), estos fragmentos tienen un tamaño de 3800 pb. Carril 1, control negativo. M, marcador molecular.

Por último, se evaluaron los fragmentos amplificados utilizando la pareja de *primers* 3(16). En este caso, tanto con el ADN_{mt} de *D. buzzatii* B6 (Fig. 3A) como con el ADN_{mt} de *D. buzzatii* white (Fig. 3B), se obtuvo una única banda de 1300 pb (flechas blancas en la Fig. 3). En el caso de *D. buzzatii* B6 se utilizaron 3 concentraciones de MgCl₂ (3 mM, 2,5 mM, 1,5 mM, carriles 1, 2 y 3, respectivamente en la Fig. 3A), e independientemente de la concentración se obtuvo la misma banda de 1300 pb (Fig. 3A). En el caso del mutante la concentración de MgCl₂ fue 2,5 mM.

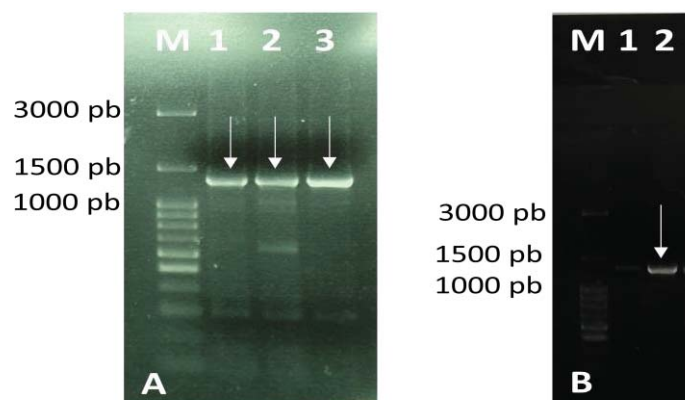


Fig. 3.- Imágenes de geles de agarosa de los fragmentos amplificados con la pareja de *primers* 3(16) en *D. buzzatii* B6 (A) y *D. buzzatii* white (B) donde se aprecia una única banda de 1300 pb (flechas blancas). El carril 1 en la imagen B corresponde a un control negativo. M, marcador molecular.

4.2.- Alineamiento de las secuencias.

Se realizó la secuenciación de 6 fragmentos utilizando los mismos *primers* que se utilizaron en la amplificación mediante PCR, y se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia (GenBank: MN551232.1; Moreyra *et al.*, 2019).

El alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia muestra dos regiones bien alineadas, tal y como se puede apreciar en la Fig. 4; en base a esto, hemos subdividido el alineamiento en dos bloques: bloque de alineamiento 1 (Fig. 5) y bloque de alineamiento 2 (Fig. 6).

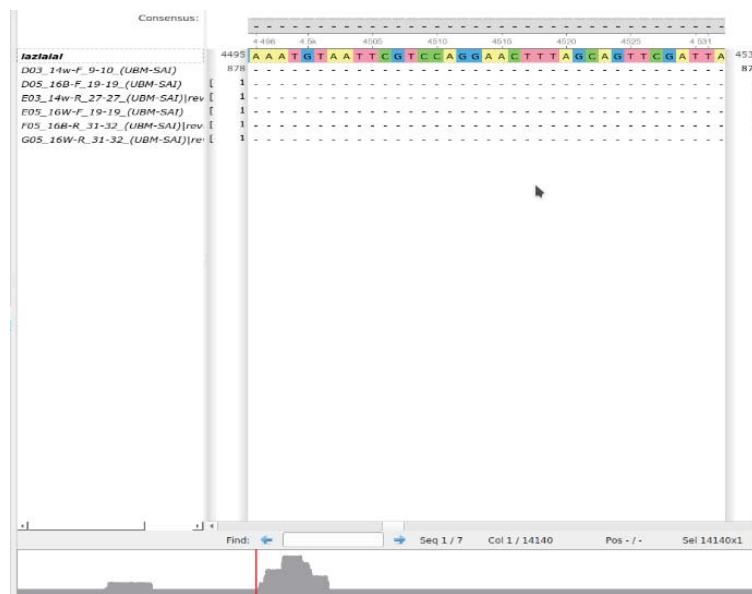


Fig. 4.- Imagen obtenida del software Ugene donde se observan los dos picos que indican los bloques bien alineados.

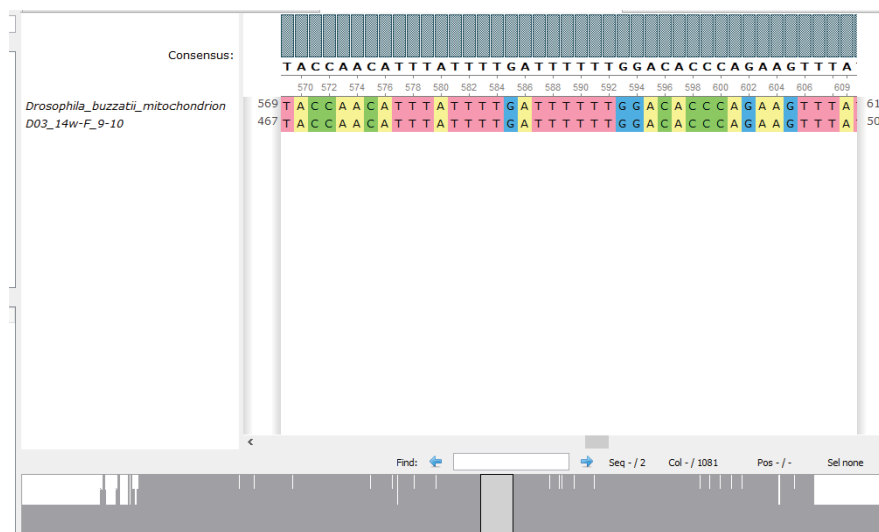


Fig. 5.- Imagen obtenida del software Ugene correspondiente al bloque de alineamiento 1.

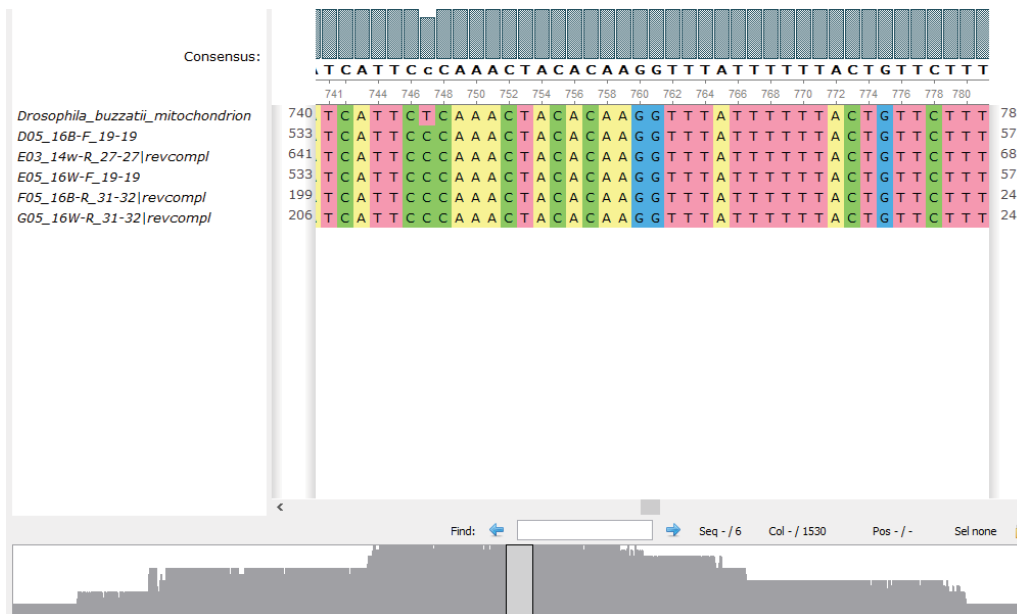


Fig. 6.- Imagen obtenida del software Ugene correspondiente al bloque de alineamiento 2.

En los bloques de alineamiento encontramos varias discrepancias (bases que no coinciden con la secuencia de referencia) en determinadas regiones de las secuencias obtenidas, y las hemos marcado tal y como se observa en las figuras 7 y 8.

En cuanto al bloque 1, la secuencia D03_14w-F_9-10 (cepa mutante) se alinea con la secuencia de referencia a partir de la posición 99. Esta posición se corresponde en la secuencia de referencia con la posición 1673 (a continuación, las posiciones en la secuencia de referencia se incluirán entre paréntesis junto a las posiciones relativas de nuestras secuencias) y terminando en la 878 (2555), ya que ni antes de la primera posición ni después de la segunda hay alineamiento. El tamaño de la secuencia D03_14w_F_9_10 es de 882 pb. Por otro lado, se pueden ver numerosas discrepancias entre ambas secuencias (Fig. 7, marcadas en rojo).

Por ejemplo, en las posiciones 358 (1932), 373 (1947) y 415 (1989) del bloque de alineamiento 1, hay tres transiciones, ya que en la primera posición la G se cambia por A; en la segunda, la T se cambia por C; y en la tercera, otra T se vuelve a cambiar por otra C. En la posición 625 (2199) de la misma zona de alineamiento, la sustitución en este caso es una transversión, ya que la C se

cambia por A. En total se observan 79 sustituciones (49 transiciones y 30 transversiones), de las cuales 20 están apoyadas por el electroferograma. (Fig. 7).

Alineamiento múltiple de secuencias con CLUSTAL W 2.0

```

Drosophila_buzzatii_mitochondrion AGGTCATCCTGGAGCTTTAATTGGTAACGACCAAAATTTATAATGTAATTTGTAACAGCTCAGCCTTTTGT 70
D03_14w-F_9-10 ----- 70

Drosophila_buzzatii_mitochondrion ATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTACCATTAAATATTAG 140
D03_14w-F_9-10 -----T TTTTG-----SGAAACTTCA TATGTTCCCTTTGACAAATAG 140

Drosophila_buzzatii_mitochondrion GAGTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATATAAGTTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACT 210
D03_14w-F_9-10 AGCTTCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAA AATATAAGTTTTTGACTATTACCTCCTGCTTTAACACT 210

Drosophila_buzzatii_mitochondrion TTTGTTAGTAAGTAGTATAGTGGAAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACCTGTTACCCCTCCCTATCTTCT 280
D03_14w-F_9-10 -----T TTTTG-----SGAAACTTCA TATGTTCCCTTTGACAAATAG 280

Drosophila_buzzatii_mitochondrion GGTATTGCGCATGGTGGTCTCAGTTGATTAGCTATTTTCTCTTTACACTTAGCCGGAATTTCTTCAA 350
D03_14w-F_9-10 GGTATTGC CATGGTGGTCTCAGTTGATTAGCTATTTTCTCTTTACACTTAGCCGGAATTTCTTCAA 350

Drosophila_buzzatii_mitochondrion TTTTAGGGCAGTAAATTTTACACAACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGACCGAAT 420
D03_14w-F_9-10 TTTTAGCCAGTAAATTTTATACACAAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTAGACCGAAT 420

Drosophila_buzzatii_mitochondrion ACCTTTATTTGTTGATCAGTAGTAATTACTGCTTTATTGCTTCTCCTATCTTTACCAGTTTATAGCCGA 490
D03_14w-F_9-10 ACCTTTATTTGTTGATCAGTAGTAATTACTGCTTTATTGCTTCTCCTATCTTTACCAGTTTATAGCCGA 490

Drosophila_buzzatii_mitochondrion GCAATTAATACTTTTAACTGACCGAAATTTAAATACTTCTTTTTTCGACCCGGCAGGAGGAGATC 560
D03_14w-F_9-10 GCATTACTATACTTTTAACTGACCGAAATTTAAATACTTCTTTTTTCGACCCGGCAGGAGGAGATC 560

Drosophila_buzzatii_mitochondrion CAATTCCTTACCAACATTTATTTTATTTTGGACCCAGAGTTTATATTTTAAATTTTACCAGGATT 630
D03_14w-F_9-10 CAATTCCTTACCAACATTTATTTTATTTTGGACCCAGAGTTTATATTTTAAATTTTACCAGGATT 630

Drosophila_buzzatii_mitochondrion TGGAATGATTTCTCATATTATCAGCAAGAAATCAGGAAAAAAGAAACATTTGGGCTTTTAGGAATAAT 700
D03_14w-F_9-10 TGGAATATTTCTCATATTATCAGCAAGAAATCAGGAAAAAAGAAACATTTGGGCTTTTAGGAATAAT 700

Drosophila_buzzatii_mitochondrion TACGCAATAATAGCAATTGGATTACTTGGATTTCATTGTTTGGACCCATCATATATTACAGTTGGTATAG 770
D03_14w-F_9-10 TACGCAATAATAGCAATTGGATTACTTGGATTTCATTGTTTGGACCCATCATATATTACAGTTGGTATAG 770

Drosophila_buzzatii_mitochondrion ACGTAGATACACGAGCTTATTTTACATCAGCAACAATGATTATTGCGAGTCCCAACAGGAATTTAAATTT 840
D03_14w-F_9-10 ACGTAGATACACGAGCTTATTTTACATCAGCAACAATGATTATTGCGAGTCCCAACAGGAATTTAAATTT 840

Drosophila_buzzatii_mitochondrion TAGATGACTTGCCACTTTACACGGAACTCAACTTCTTACTCAGCAGCTATTCTATGAGCTTTAGGATTT 910
D03_14w-F_9-10 TAGATGACTTGC ACTTACA GGACTCAACTTCTTACTCAGCAGCTATTCTATGAGCTTTAGGATTT 910

Drosophila_buzzatii_mitochondrion GTATTTTTTATTCACAGTTGGAGGTTTATGGTAGTCTTGC AAAATCATCAATTGATATTATTTTAC 980
D03_14w-F_9-10 GTATTTTTTATTCACAGTTGGAGGTTTATGGTAGTCTTGC AAAATCATCAATTGATATTATTTTAC 980

Drosophila_buzzatii_mitochondrion ATGATACATATATAGTAGTACTCCTTTTATTGTTCTTTCAATAGGAGCAGTATTGCTATTATAGC 1050
D03_14w-F_9-10 A----- 1050

Drosophila_buzzatii_mitochondrion AGGATTCATTCATTGATACCCCTTTATTCACA 1081
D03_14w-F_9-10 ----- 1081

```

Figura 7: Alineamiento múltiple de secuencias con Clustal W. Color rojo: la discrepancia sólo ocurre entre la secuencia de referencia y una de las hebras secuenciadas. Color gris: deficiencias. En letra negrita: la discrepancia está muy apoyada por el electroferograma. En letra normal: la discrepancia está más o menos apoyada por el electroferograma. En letra cursiva: la discrepancia no está apoyada por el electroferograma.

En el bloque de alineamiento 2 se puede observar el alineamiento de 5 secuencias: D05_16B-F_19-19 (cepa salvaje), E03_14w-R_27-27/revcompl (cepa mutante), E05_16W-F_19-19 (cepa mutante), F05_16B-R_31-32/revcompl (cepa salvaje) y G05_16W-R_31-32/revcompl (cepa mutante) con la secuencia de referencia (Fig. 8). Este bloque de alineamiento va desde las posiciones 4567 a la 5897 en la secuencia de referencia (1330 pb).

Las secuencias están alineadas con la secuencia de referencia en las siguientes posiciones: D05 (4674-5569, 895 pb); E03 (4567-5413, 846 pb); E05 (4673-5532, 859 pb); F05 (5009-5889,880 pb); G05 (5002-5897,895 pb). Como se puede apreciar en la Figura 8, las discrepancias se marcan con varios

colores (rojo, rosa, verde, amarillo y azul), dependiendo de cuántas secuencias coinciden entre ellas, al mismo tiempo que no coinciden con la secuencia de referencia.

El número de sustituciones que tiene cada secuencia, así como cuántas de ellas están apoyadas por el electroferograma, se recogen en la siguiente tabla.

Secuencia y cebador utilizado para su secuenciación	Sustituciones	Transiciones	Transversiones	Apoyadas por el electroferograma
D05 (F:1925-1953)	39	32	7	2
E03 (R:2730-2760)	61	37	24	10
E05 (F:1925-1953)	44	32	12	3
F05 (R:3199-3227)	50	29	21	9
G05 (R:3199-3227)	36	29	7	6

Tabla 3. Número de sustituciones observadas en cada secuencia.

Como se aprecia en la Fig. 8, las discrepancias entre la secuencia de referencia y una de las hebras (marcadas en rojo) tienden a localizarse mayoritariamente en los extremos de los fragmentos de la PCR secuenciados, en concreto 2 en la secuencia D05, 28 en la secuencia E03, 7 en la secuencia E05, 17 en la secuencia F05 y 3 en la secuencia G05. Como se aprecia en la Tabla 3, el número de transiciones es superior al número de transversiones en cada uno de los fragmentos secuenciados.

Tanto en el bloque de alineamiento 1 como en el bloque de alineamiento 2, las discrepancias implican sustituciones (cambio de una base por otra), las cuales pueden ser de dos tipos: transiciones (cambio de una base por otra del mismo tipo, es decir, una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina; siendo las purinas A y G y las pirimidinas C y T), o transversiones (cambio de una base por otra de diferente tipo, es decir, una base purina por otra pirimidina o a la inversa).

Alineamiento múltiple de secuencias con CLUSTAL W 2.0

```

Drosophila_buzzatii_mitochondrion CTTTATAGTATGTATCGAAACGATTAGAAATGTAATTCGTCAGGAACCTTAGCAGTTCGATTAACAGC 70
D05_16B-F_19-19 ----- 70
E03_14w-R_27-27|revcompl ----- 70
E05_16W-F_19-19 ----- 70
F05_16B-R_31-32|revcompl ----- 70
G05_16W-R_31-32|revcompl ----- 70

Drosophila_buzzatii_mitochondrion TAATAATAATGTCAGGTCATCTATTATTAACCTTACTGGGAAATACAGGCCCTTCTATATCATATATTTTA 140
D05_16B-F_19-19 ----- 140
E03_14w-R_27-27|revcompl -----CTTACTGGAAACACSGCCTTCTATATCATATATTTTA 140
E05_16W-F_19-19 ----- 140
F05_16B-R_31-32|revcompl ----- 140
G05_16W-R_31-32|revcompl ----- 140

Drosophila_buzzatii_mitochondrion GTTACATTTTATTAAATGGGCAAAATGCCCTTTAGTTTTAGAATCAGCTGTTGCAATAATCAATCTT 210
D05_16B-F_19-19 -----TCTT 210
E03_14w-R_27-27|revcompl GTTACATTTTATTAAATGGGCAAAATGCCCTTTAGTTTTAGAATCAGCTGTTGCAATAATCAATCTT 210
E05_16W-F_19-19 -----ATCTT 210
F05_16B-R_31-32|revcompl ----- 210
G05_16W-R_31-32|revcompl ----- 210

Drosophila_buzzatii_mitochondrion ATGTATTGCGAGTTTAAAGAACCTTTACTCTAGAGAAGTTAATTAACAAATTAATCAATAAATGTCTA 280
D05_16B-F_19-19 ATGTATTGCGAGTTTAAAGAACCTTTACTCTAGAGAAGTTAATTAACAAATTAATCAATAAATGTCTA 280
E03_14w-R_27-27|revcompl ATGTATTGCGAGTTTAAAGAACCTTTACTCTAGAGAAGTTAATTAACAAATTAATCAATAAATGTCTA 280
E05_16W-F_19-19 ATGTATTGCGAGTTTAAAGAACCTTTACTCTAGAGAAGTTAATTAACAAATTAATCAATAAATGTCTA 280
F05_16B-R_31-32|revcompl ----- 280
G05_16W-R_31-32|revcompl ----- 280

Drosophila_buzzatii_mitochondrion CACATTCAAATCACCATTTCATCTTGTGATTACAGACCATGACCTCTAACAGGAGCAATGGGCAAT 350
D05_16B-F_19-19 CACATTCAAATCACCATTTCATCTTGTGATTACAGACCATGACCTCTAACAGGAGCAATGGGCAAT 350
E03_14w-R_27-27|revcompl CACATTCAAATCACCATTTCATCTTGTGATTACAGACCATGACCTCTAACAGGAGCAATGGGCAAT 350
E05_16W-F_19-19 CACATTCAAATCACCATTTCATCTTGTGATTACAGACCATGACCTCTAACAGGAGCAATGGGCAAT 350
F05_16B-R_31-32|revcompl ----- 350
G05_16W-R_31-32|revcompl ----- 350

Drosophila_buzzatii_mitochondrion AACAACTGTTTCAGGTATAGTTAAATGATTCATCAATATGACACATCCTTATTTTATAGGTAATATT 420
D05_16B-F_19-19 AACAACTGTTTCAGGTATAGTTAAATGATTCATCAATATGACACATCCTTATTTTATAGGTAATATT 420
E03_14w-R_27-27|revcompl AACAACTGTTTCAGGTATAGTTAAATGATTCATCAATATGACACATCCTTATTTTATAGGTAATATT 420
E05_16W-F_19-19 AACAACTGTTTCAGGTATAGTTAAATGATTCATCAATATGACACATCCTTATTTTATAGGTAATATT 420
F05_16B-R_31-32|revcompl ----- 420
G05_16W-R_31-32|revcompl ----- 420

Drosophila_buzzatii_mitochondrion ATTACAATCTTACTGTATATCAATGATGACGAGATGTATCTCGAGAAGGTACTTATCAAGGTTTACATA 490
D05_16B-F_19-19 ATTACAATCTTACTGTATATCAATGATGACGAGATGTATCTCGAGAAGGTACTTATCAAGGTTTACATA 490
E03_14w-R_27-27|revcompl ATTACAATCTTACTGTATATCAATGATGACGAGATGTATCTCGAGAAGGTACTTATCAAGGTTTACATA 490
E05_16W-F_19-19 ATTACAATCTTACTGTATATCAATGATGACGAGATGTATCTCGAGAAGGTACTTATCAAGGTTTACATA 490
F05_16B-R_31-32|revcompl ----- 490
G05_16W-R_31-32|revcompl ----- 490

Drosophila_buzzatii_mitochondrion CTTACGCAGTTACTACTCGGTTTACGATGAGGAATAATTTTATTTTATCAGAAATTTATTTTTCGT 560
D05_16B-F_19-19 CTTACGCAGTTACTACTCGGTTTACGATGAGGAATAATTTTATTTTATCAGAAATTTATTTTTCGT 560
E03_14w-R_27-27|revcompl CTTACGCAGTTACTACTCGGTTTACGATGAGGAATAATTTTATTTTATCAGAAATTTATTTTTCGT 560
E05_16W-F_19-19 CTTACGCAGTTACTACTCGGTTTACGATGAGGAATAATTTTATTTTATCAGAAATTTATTTTTCGT 560
F05_16B-R_31-32|revcompl -----CAGAAATTTATTTTTCGT 560
G05_16W-R_31-32|revcompl -----ATTTTATCAGAAATTTATTTTTCGT 560

Drosophila_buzzatii_mitochondrion AAGTTTTTTTTGAGCATTTTTTTACAGAAGATTTATCCAGCTATTGAATTAGGAGCATCATGACCCCT 630
D05_16B-F_19-19 AAGTTTTTTTTGAGCATTTTTTTACAGAAGATTTATCCAGCTATTGAATTAGGAGCATCATGACCCCT 630
E03_14w-R_27-27|revcompl AAGTTTTTTTTGAGCATTTTTTTACAGAAGATTTATCCAGCTATTGAATTAGGAGCATCATGACCCCT 630
E05_16W-F_19-19 AAGTTTTTTTTGAGCATTTTTTTACAGAAGATTTATCCAGCTATTGAATTAGGAGCATCATGACCCCT 630
F05_16B-R_31-32|revcompl AAGTTTTTTTTGAGCATTTTTTTACAGAAGATTTATCCAGCTATTGAATTAGGAGCATCATGACCCCT 630
G05_16W-R_31-32|revcompl AAGTTTTTTTTGAGCATTTTTTTACAGAAGATTTATCCAGCTATTGAATTAGGAGCATCATGACCCCT 630

Drosophila_buzzatii_mitochondrion TTGGGAATGTTTCATTTAATCCCTTTTCAAATTCCTTTATTAACACTGCTATTTTATTAACATCAGGAG 700
D05_16B-F_19-19 TTGGGAATGTTTCATTTAATCCCTTTTCAAATTCCTTTATTAACACTGCTATTTTATTAACATCAGGAG 700
E03_14w-R_27-27|revcompl TTGGGAATGTTTCATTTAATCCCTTTTCAAATTCCTTTATTAACACTGCTATTTTATTAACATCAGGAG 700
E05_16W-F_19-19 TTGGGAATGTTTCATTTAATCCCTTTTCAAATTCCTTTATTAACACTGCTATTTTATTAACATCAGGAG 700
F05_16B-R_31-32|revcompl TTGGGAATGTTTCATTTAATCCCTTTTCAAATTCCTTTATTAACACTGCTATTTTATTAACATCAGGAG 700
G05_16W-R_31-32|revcompl TTGGGAATGTTTCATTTAATCCCTTTTCAAATTCCTTTATTAACACTGCTATTTTATTAACATCAGGAG 700

Drosophila_buzzatii_mitochondrion TAACTGTAACATGAGCCATCATAGTTTAAATGGAAGGAAATCATTCCAAACTACACAAGGTTTATTTTT 770
D05_16B-F_19-19 TAACTGTAACATGAGCCATCATAGTTTAAATGGAAGGAAATCATTCCAAACTACACAAGGTTTATTTTT 770
E03_14w-R_27-27|revcompl TAACTGTAACATGAGCCATCATAGTTTAAATGGAAGGAAATCATTCCAAACTACACAAGGTTTATTTTT 770
E05_16W-F_19-19 TAACTGTAACATGAGCCATCATAGTTTAAATGGAAGGAAATCATTCCAAACTACACAAGGTTTATTTTT 770
F05_16B-R_31-32|revcompl TAACTGTAACATGAGCCATCATAGTTTAAATGGAAGGAAATCATTCCAAACTACACAAGGTTTATTTTT 770
G05_16W-R_31-32|revcompl TAACTGTAACATGAGCCATCATAGTTTAAATGGAAGGAAATCATTCCAAACTACACAAGGTTTATTTTT 770

Drosophila_buzzatii_mitochondrion TACTGTTCTTTTAGGAATTTATTTTACTATTTTACAAGCATATGAATATATTGAAGCTCCTTTTACAAT 840
D05_16B-F_19-19 TACTGTTCTTTTAGGAATTTATTTTACTATTTTACAAGCATATGAATATATTGAAGCTCCTTTTACAAT 840
E03_14w-R_27-27|revcompl TACTGTTCTTTTAGGAATTTATTTTACTATTTTACAAGCATATGAATATATTGAAGCTCCTTTTACAAT 840
E05_16W-F_19-19 TACTGTTCTTTTAGGAATTTATTTTACTATTTTACAAGCATATGAATATATTGAAGCTCCTTTTACAAT 840
F05_16B-R_31-32|revcompl TACTGTTCTTTTAGGAATTTATTTTACTATTTTACAAGCATATGAATATATTGAAGCTCCTTTTACAAT 840
G05_16W-R_31-32|revcompl TACTGTTCTTTTAGGAATTTATTTTACTATTTTACAAGCATATGAATATATTGAAGCTCCTTTTACAAT 840

Drosophila_buzzatii_mitochondrion GCAGATTCGTTTATGGTCAACTTTTTTATAGCAACAGGATTTTATGGAATTCATGTTTAAATGGAA 910
D05_16B-F_19-19 GCAGATTCGTTTATGGTCAACTTTTTTATAGCAACAGGATTTTATGGAATTCATGTTTAAATGGAA 910
E03_14w-R_27-27|revcompl GCAGATTCGTTTATGGTCAACTTTTTTATAGCAACAGGATTTTATGGAATTCATGTTTAAATGGAA 910
E05_16W-F_19-19 GCAGATTCGTTTATGGTCAACTTTTTTATAGCAACAGGATTTTATGGAATTCATGTTTAAATGGAA 910
F05_16B-R_31-32|revcompl GCAGATTCGTTTATGGTCAACTTTTTTATAGCAACAGGATTTTATGGAATTCATGTTTAAATGGAA 910
G05_16W-R_31-32|revcompl GCAGATTCGTTTATGGTCAACTTTTTTATAGCAACAGGATTTTATGGAATTCATGTTTAAATGGAA 910

```

Figura 8: Alineamiento múltiple de secuencias con Clustal W. Color rojo: la discrepancia ocurre entre la secuencia de referencia y una de las hebras secuenciadas. Color rosa: la discrepancia ocurre entre la secuencia de referencia y dos de las hebras secuenciadas. Color verde: la discrepancia ocurre entre la secuencia de referencia y tres de las hebras secuenciadas. Color amarillo: la discrepancia ocurre entre la secuencia de referencia y cuatro de las hebras secuenciadas. Color azul: la discrepancia ocurre entre la secuencia de referencia y las cinco hebras secuenciadas. Esta figura continúa en la página siguiente.

```

Drosophila buzzatii_mitochondrion CAACTTTTCTTTAATCTGTTTACTACGACACTTAAATAATCATTCTTCTAAAAATCATCTTTTGGATT 980
D05_16B-F_19-19 CAACTTTTCTCTTAATCTGTTTATTACGACACTTAAATAATCATTCTTCTAAAGATCAACATTTTGGATT 980
E03_14w-R_27-27|revcompl CAATTTCTTTCTGTAACAACTGGATTAAATCTGTA----- 980
E05_16W-F_19-19 CAACTTTTCTCTTAATCTGTTTATTACGACACTTAAATAATCATTCTTCTAAAGATCAACATTTTGGATT 980
F05_16B-R_31-32|revcompl CAACTTTTCTCTTAATCTGTTTATTACGACACTTAAATAATCATTCTTCTAAAGATCAACATTTTGGATT 980
G05_16W-R_31-32|revcompl CAACTTTTCTCTTAATCTGTTTATTACGACACTTAAATAATCATTCTTCTAAAGATCAACATTTTGGATT 980

Drosophila buzzatii_mitochondrion TGAAAGCAGCAGCATGATATTGACATTTTGTGTGATGTTGTTGATTATTTTATACGTAACAATTTATTGA 1050
D05_16B-F_19-19 TGAAAGCAGCAGCATGATATTGACATTTTGTGTGATGTTGTTGATTATTTTATATGTAACAATTTATTGA 1050
E03_14w-R_27-27|revcompl ----- 1050
E05_16W-F_19-19 TGAAAGCAGCAGCATGATATTGACATTTTGTGTGATGTTGTTGATTATTTTATATGTAACAATTTATTGA 1050
F05_16B-R_31-32|revcompl TGAAAGCAGCAGCATGATATTGACATTTTGTGTGATGTTGTTGATTATTTTATATGTAACAATTTATTGA 1050
G05_16W-R_31-32|revcompl TGAAAGCAGCAGCATGATATTGACATTTTGTGTGATGTTGTTGATTATTTTATATGTAACAATTTATTGA 1050

Drosophila buzzatii_mitochondrion TGAGGAGGTTAAAAAATTTAATATCTATATAGTATAAAAAGTATATTTGACTTCCAATCATAGGTCTA 1120
D05_16B-F_19-19 TGAGGAGGTTAAAAAATTTAATATCTATATAGTATAAAAAGTATATTTG----- 1120
E03_14w-R_27-27|revcompl ----- 1120
E05_16W-F_19-19 TGAGGAGGTTAAAAA----- 1120
F05_16B-R_31-32|revcompl TGAGGAGGTTAAAAAATTTAATATCTATATAGTATAAAAAGTATATTTGACTTCCAATCATAGGTCTA 1120
G05_16W-R_31-32|revcompl TGAGGAGGTTAAAAAATTTAATATCTATATAGTATAAAAAGTATATTTGACTTCCAATCATAGGTCTA 1120

Drosophila buzzatii_mitochondrion TTAATAATAGTGTAGATAATTTTTTCAATTACTTTAATCGCATTAAATATTATAACAATTTCAATTTATTG 1190
D05_16B-F_19-19 ----- 1190
E03_14w-R_27-27|revcompl ----- 1190
E05_16W-F_19-19 ----- 1190
F05_16B-R_31-32|revcompl TTAATAATAGTGTAGATAATTTTTTCAATTACTTTAATCGCATTAAATATTATAACAATTTCAATTTATTG 1190
G05_16W-R_31-32|revcompl TTAATAATAGTGTAGATAATTTTTTCAATTACTTTAATCGCATTAAATATTATAACAATTTCAATTTATTG 1190

Drosophila buzzatii_mitochondrion TTATAATTTAGCTTCAATTTTATCAAAAAAACTTTAGTTGACCGAGAAAAAGTTCACCTTTTGAATG 1260
D05_16B-F_19-19 ----- 1260
E03_14w-R_27-27|revcompl ----- 1260
E05_16W-F_19-19 ----- 1260
F05_16B-R_31-32|revcompl TTATAATTTAGCTTCAATTTTATCAAAAAAACTTTAGTTGACCGGAAAAAAGTTCACCTTTTGAATG 1260
G05_16W-R_31-32|revcompl TTATAATTTAGCTTCAATTTTATCAAAAAAACTTTAGTTGACCGGAAAAAAGTTCACCTTTTGAATG 1260

Drosophila buzzatii_mitochondrion TGGATTTGATCCTAAATCTTCATCAGCCTTACCTTTTCTTTGCGATTTTTTTAATTGCTATTATTTTT 1330
D05_16B-F_19-19 ----- 1330
E03_14w-R_27-27|revcompl ----- 1330
E05_16W-F_19-19 ----- 1330
F05_16B-R_31-32|revcompl TGGATTTGATCCTAAATCTTCATCAGCCTTACCTTTTCTTTGCGATTTTTTTAATTTCTATTATTTTT 1330
G05_16W-R_31-32|revcompl TGGATTTGATCCTAAATCTTCATCAGCCTTACCTTTTCTTTGCGATTTTTTTAATTTCTATTATTTTT 1330

Drosophila buzzatii_mitochondrion TTAATTTTTGATGTAGAAATGCGCTTAATTTTCCCAATAATATTATTTTTAAATTTCCAAATATATATA 1400
D05_16B-F_19-19 ----- 1400
E03_14w-R_27-27|revcompl ----- 1400
E05_16W-F_19-19 ----- 1400
F05_16B-R_31-32|revcompl TTAATTTTTGATGTAGAAATGCGCTTAATTTTCCCAATAATATTATTTTTAAATTTCCAAATATATATA 1400
G05_16W-R_31-32|revcompl TTAATTTTTGATGTAGAAATGCGCTTAATTTTCCCAATAATATTATTTTTAAATTTCCAAATATATATA 1400

Drosophila buzzatii_mitochondrion TTTGAAACATTAACATCAATTATTTTTATTATAATTTATTAGGTGGATTATACCATGAATGAATCAAGG 1470
D05_16B-F_19-19 ----- 1470
E03_14w-R_27-27|revcompl ----- 1470
E05_16W-F_19-19 ----- 1470
F05_16B-R_31-32|revcompl TTTGAAACATTAACATCAATTATTTTTATTATAATTTATTAGGTGGATTATACCATGAATGAATCAAGG 1470
G05_16W-R_31-32|revcompl TTTGAAACATTAACATCAATTATTTTTATTATAATTTATTAGGTGGATTATACCATGAATGAATCAAGG 1470

Drosophila buzzatii_mitochondrion TATATTAATAATGATCAAATTAATAAATAGGGTTGTAGTTAAATATAACATTTGATTGCA 1530
D05_16B-F_19-19 ----- 1530
E03_14w-R_27-27|revcompl ----- 1530
E05_16W-F_19-19 ----- 1530
F05_16B-R_31-32|revcompl ----- 1530
G05_16W-R_31-32|revcompl ----- 1530

```

Fig. 8. Continuación.

5.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo a partir de ADN_{mt} de *D. buzzatii* B6 (salvaje) y *D. buzzatii* white (mutante) y utilizando 3 parejas de *primers*, se realizó una amplificación de fragmentos de ADN_{mt} mediante la PCR. Inicialmente se visualizaron los productos amplificados por la pareja de *primers* 1 a distintas temperaturas, y se observó que a temperaturas de 40 °C y 45,5 °C se observan numerosas bandas. Sin embargo, cuando se incrementa la temperatura de anillamiento (55 °C) las bandas inespecíficas desaparecen, y se produce una mayor especificidad en la amplificación del fragmento esperado. Tanto en el salvaje como en el mutante con dos de las parejas de *primers* (*primers* 1 y 2, ver Tabla 1) se visualizó mediante la electroforesis en gel de agarosa una banda única de

3800 pb, mientras que con la tercera pareja de *primers* (ver Tabla 1) se visualizó una única banda de 1300 pb en ambos. Esto indica que no hay diferencias en el tamaño de las bandas de interés entre el salvaje y el mutante. Se secuenciaron 6 fragmentos de ADN_{mt} de *Drosophila buzzatii*, y se realizó un alineamiento de estas secuencias con una secuencia de referencia del genoma mitocondrial completo de *Drosophila buzzatii* mediante el software Ugene. Las parejas de *primers* utilizadas en el presente trabajo permitieron amplificar fragmentos de ADN_{mt} que codifican para los genes citocromo oxidasa III, citocromo oxidasa I, subunidad F₀ de la ATP-sintasa, subunidad III de la NADH deshidrogenasa y un ARN_t, siendo el fragmento de la citocromo oxidasa I (secuencia D03), el que muestra un mayor número de sustituciones, seguido de la citocromo oxidasa III (secuencia E03) y subunidad III de la NADH (secuencia F05).

El alineamiento múltiple de secuencias indica numerosas discrepancias entre la secuencia de referencia y los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR. En la secuencia D03, que corresponde a la cepa mutante, hemos observado un mayor número de sustituciones (79). En relación con el resto de secuencias analizadas, el número de sustituciones que hemos observado entre los fragmentos secuenciados y la secuencia de referencia es variable, gran parte de las discrepancias se observan en los extremos de los fragmentos de PCR secuenciados. Es probable que puedan obedecer a errores de secuenciación, y, por lo tanto, para obtener una estima real de las diferencias nucleotídicas entre los fragmentos secuenciados, deberían descontarse. Por ejemplo, en la secuencia G05 hemos observado 36 sustituciones; sin embargo, si descontamos el número de discrepancias que observamos en los extremos de la secuencia, el número de sustituciones sería 33, y el número de transiciones seguiría siendo superior al de transversiones. Las transiciones son cambios entre bases de la misma naturaleza química, y es fácil que ocurran al azar, sin embargo, las transversiones ocurren con menos frecuencia, y por lo general son ocasionadas por mutágenos. Esto está de acuerdo con nuestros datos, los cuales indican que en todas las secuencias el número de transiciones es superior al de transversiones.

Las tasas de mutación de los genomas mitocondriales son mucho más altas que las del ADN nuclear. La tasa de mutación en el genoma mitocondrial de las líneas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es aproximadamente diez veces mayor que la tasa de mutación del ADN nuclear, y la tasa de mutación estimada para el ADN_{mt} de *Drosophila melanogaster* es de $6,2 \times 10^{-07}$ por año (Haag-Liautard *et al.*, 2008; Moreyra *et al.*, 2019). La magnitud de las discrepancias observadas entre las secuencias de las dos cepas analizadas en este estudio no podría ser calificado de un polimorfismo intraespecífico, sino que más bien se encuadrarían en un rango similar al esperado para la divergencia entre especies.

La mayoría de los fragmentos secuenciados forman parte de proteínas implicadas en la cadena de transporte electrónico. Estudios previos han mostrado cómo cambios puntuales en el genoma mitocondrial de *Drosophila* pueden afectar a distintos niveles de la función mitocondrial (número de copias del genoma mitocondrial, modificación del patrón de expresión de proteína clave en la función mitocondrial) (Camus *et al.*, 2015). Por otra parte, podría ser que los cambios que observamos entre las secuencias pudieran provocar variaciones fenotípicas en *Drosophila buzzatii*, o no tener ningún efecto, de ser así, serían cambios neutros. Para saber si los cambios que hemos observado entre la secuencia de referencia y los fragmentos de ADN_{mt} de *Drosophila buzzatii* tienen algún efecto a nivel mitocondrial, en concreto, en el proceso de fosforilación oxidativa, así como en el fenotipo de la mosca, sería necesario realizar más investigaciones.

6.- CONCLUSIONES

- Los fragmentos amplificados de ADN_{mt} de *D. buzzatii* B6 (salvaje) y *D. buzzatii* white (mutante) utilizando la misma pareja de *primers* no muestran diferencias en su tamaño, visualizándose como bandas de 3800 pb y 1600 pb.
- Atendiendo al alineamiento con la secuencia de referencia, los fragmentos obtenidos por PCR corresponden a la región mitocondrial que se proponía

analizar, comprendida entre las posiciones 1673-2555 y 4567-5897 del genoma mitocondrial de *Drosophila buzzatii*.

- Los fragmentos de ADN_{mt} secuenciados de *Drosophila buzzatii* muestran discrepancias con la secuencia de referencia utilizada. El alineamiento múltiple de las secuencias indica que la mayor parte de los cambios son sustituciones nucleotídicas, con un predominio de transiciones sobre transversiones.

- La magnitud de las diferencias observadas entre las secuencias de las dos cepas excede en mucho a la esperada para un polimorfismo intraespecífico, y son más bien de un rango similar al que se esperaría para la divergencia entre dos especies.

CONCLUSIONES

- Os fragmentos de ADN_{mt} amplificados de *D. buzzatii* B6 (salvaxe) e *D. buzzatii* white (mutante) que usan o mesmo par de *primers* non mostran diferenzas no seu tamaño, concretamente, visualizáronse como bandas de 3800 pb e 1600 pb.

- Considerando o aliñamento coa secuencia de referencia, os fragmentos obtidos por PCR corresponden á rexión mitocondrial que se propuxo analizar, comprendida entre as posicións 1673-2555 e 4567-5897 do xenoma mitocondrial de *Drosophila buzzatii*.

- Os fragmentos secuenciados de ADN_{mt} de *Drosophila buzzatii* amosan discrepancias coa secuencia de referencia empregada. O aliñamento múltiple das secuencias indica que a maioría dos cambios son substitucións nucleotídicas, con predominio das transicións sobre as transversións.

- A magnitude das diferenzas observadas entre as secuencias das dúas cepas supera con creces a esperada para un polimorfismo intraespecífico e son máis ben dun rango similar ao que se esperaría para a diverxencia entre dúas especies.

CONCLUSIONS

- The amplified mtDNA fragments of *D. buzzatii* B6 (wild) and *D. buzzatii* white (mutant) using the same pair of primers do not show differences in their size, specifically, they were visualized as 3800 bp and 1600 bp bands.
- Considering the alignment with the reference sequence, the fragments obtained by PCR correspond to the mitochondrial region that was proposed to be analyzed, comprised between positions 1673-2555 and 4567-5897 of the *Drosophila buzzatii* mitochondrial genome.
- The sequenced mtDNA fragments of *Drosophila buzzatii* show discrepancies with the reference sequence used. The multiple alignment of the sequences indicates that most of the changes are nucleotide substitutions, with a predominance of transitions over transversions.
- The magnitude of the differences observed between the sequences of the two strains far exceeds that expected for an intraspecific polymorphism, and are rather of a similar range to that which would be expected for the divergence between two species.

7.- BIBLIOGRAFIA

Andreazza S., Samstag C., Sanchez-Martinez A., Fernandez-Vizarra E., Gomez-Duran A., Lee J., Tufi R., Hipp M., Schmidt E., Nicholls T., Gammage P., Chinnery P., Minczuk M., Pallanck L., Kennedy S. & Whitworth A. (2019). Mitochondrially-targeted APOBEC1 is a potent mtDNA mutator affecting mitochondrial function and organismal fitness in *Drosophila*. *Nat. Commun.*, 10(1): 3280. doi: 10.1038/s41467-019-10857-y.

Barr C., Neiman M. & Taylor D. (2005). Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytol.*, 168(1): 39-50.

Brandt T., Mourier A., Tain L., Partridge L., Larsson N. & Kuhlbrandt W. (2017). Changes of mitochondrial ultrastructure and function during ageing in mice and *Drosophila*. *Elife*, 12(6): e24662. doi: 10.7554/eLife.24662.

- Burger G., Gray M. & Lang B. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.*,19(12): 709-16. doi: 10.1016/j.tig.2003.10.012.
- Camus M., Wolf J., Morrow E. & Dowling D. (2015). Single Nucleotides in the mtDNA Sequence Modify Mitochondrial Molecular Function and Are Associated with Sex-Specific Effects on Fertility and Aging. *Curr. Biol.*,19;25(20): 2717-22. doi: 10.1016/j.cub.2015.09.012.
- Dahlgard J. & Loescheke V. (1997). Effects of inbreeding in three life stages of *Drosophila buzzati* after embryos were exposed to a high temperature stress. *Heredity*, 78: 410-416.
- Durando C., Baker R., Etges W., Heed W., Wasserman M. & DeSalle M. (2000). Phylogenetic Analysis of the Repleta Species Group of the Genus *Drosophila* Using Multiple Sources of Characters. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 16(2): 296-307.
- Foriel S., Willems P., Smeitink J., Schenck A. & Beyrath J. (2015). Mitochondrial Diseases: *Drosophila Melanogaster* as a Model to Evaluate Potential Therapeutics. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 63: 60-5. doi: 10.1016/j.biocel.2015.01.024.
- Garesse R. (1988). *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics*, 118: 649-665.
- Garesse R. & Kaguni L.S. (2005). A *Drosophila* model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation. *IUBMB Life*, 57: 555 – 561.
- González J., Nefedov M., Bosdet I., Casals F., Calvete O., Delprat A., Shin H., Chiu R., Mathewson C., Wye N., Hoskins R., Schein J., de Jong P. & Ruiz A. (2005). A BAC-based Physical Map of the *Drosophila buzzatii*. *Genome Res.*, 15(6): 885-92. doi: 10.1101/gr.3263105.
- Guillén Y., Rius N., Delprat A., Wilford A., Muyas F., Puig M., Casillas S., Ramia M., Egea R., Negre B., Mir G., Campos J., Moncunill V., Ruiz-Ruano F., Cabrero J., de Lima G., Dias L., Ruiz G., Kapusta A. & Ruiz A. (2014). Genomics of Ecological Adaptation in Cactophilic *Drosophila*. *GBE.*, 7(1): 349-366.

- Haag-Liautard C., Coffey N., Houle D., Lynch M., Charlesworth B. & Keightley P. (2008). Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.*, 6(8): 1706-1714.
- Hamers L. (2016). Why do cells' power plants hang on to their own genomes? *Science*, 351(6276): 903. doi: 10.1126/science.351.6276.903.
- Hasson E., De Panis D., Hurtado J. & Mensch J. (2019). Host plant adaptation in cactophilic species of the *Drosophila buzzatii* cluster: fitness and transcriptomics. *Journal of Heredity*, 110(1): 46-57. <https://doi.org/10.1093/jhered/esy043>.
- Kang X., Luo X., Zhang Z., Zhang Z., Yang J. & Bi G. (2016). Complete Mitochondrial Genome of *Drosophila Albomicans*. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp. Seq. Anal.*, 27(5): 3638-9.
- Kauppila T., Bratic A., Jensen M., Baggio F., Partridge L., Jasper H., Grönke S. & Larssona N. (2018). Mutations of mitochondrial DNA are not major contributors to aging of fruit flies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 115(41): E9620-E9629.
- Loeschecke V., Bundgaard J. & Barker J. (1999). Variation in body size and life history traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii* from a latitudinal cline in eastern Australia. *Heredity*, 85: 423-433.
- Logan, D. (2007). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 58(1): 1225-1243.
- Manfrin M., De Brito R. & Sene F. (2001). Systematics and Evolution of the *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) Cluster Using mtDNA. *Systematics*, 94(3): 333-346.
- Manfrin M. & Sene F. (2006). Cactophilic *Drosophila* in South America: A model for evolutionary studies. *Genetica*, 126: 57-75. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-1432-5>.
- Margulis L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, (29): 21-38.

- Markow T. & O'Grady P. (2007). *Drosophila* biology in the genomic age. *Genetics*, 177: 1269-1276.
- Markow T. & O'Grady P. (2008). Reproductive ecology of *Drosophila*. *Funct. Ecol.*, 22: 747-759.
- Mentel M. & Martin W. (2008). Energy metabolism among eukaryotic anaerobes in light of Proterozoic ocean chemistry. *Philos Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 363.
- Moreyra N., Mensch J., Hurtado J., Almeida F., Laprida C. & Hasson E. (2019). What does mitogenomics tell us about the evolutionary history of the *Drosophila buzzatii* cluster (*repleta* group)? *PLoS ONE*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220676>.
- Pittis A. & Gabaldon, T. (2016). Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature*, 531: 101-104.
- Quan P., Sauzade M. & Brouzes E. (2018). dPCR: A Technology review. *Sensors.*, 18, 1271. doi: 10.3390/s18041271.
- Rius N., Guillén Y., Delprat A., Kapusta A., Feschotte C. & Ruiz A. (2016). Exploration of the *Drosophila buzzatii* transposable element content suggests underestimation of repeats in *Drosophila* genomes. *BMC Genomics.*, 17: 344.
- Salinas T., Duchêne A. & Maréchal-Drouard L. (2008). Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem. Sci.*, 33: 320-329.
- Salminen T. & Vale P. (2020) *Drosophila* as a Model System to Investigate the Effects of Mitochondrial Variation on Innate Immunity. *Front. Immunol.*, 11: 521. doi: 10.3389/fimmu.2020.00521.
- Sarup P., Sørensen J., Dimitrov K., Barker J. & Loeschcke V. (2006). Climatic adaptation of *Drosophila buzzatii* populations in southeast Australia. *Heredity*, 96: 479-486.
- Sen A. & Cox R. (2017). Fly Models of Human Diseases: *Drosophila* as a Model for Understanding Human Mitochondrial Mutations and Disease. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 121:1-27. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.07.00.

Sung R. & Jin H. (2017). Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi: 10.1155/2017/8609490.

Vollmer J., Sarup P., Kærsgaard C., Dahlgaard J. & Loeschcke V. (2000). Heat and cold-induced male sterility in *Drosophila buzzatii*: genetic variation among populations for the duration of sterility. *Heredity*, 85: 423-433.