

Inversions cromosòmiques, clines i adaptació a *Drosophila suboscura*: aproximació mitjançant marcadors moleculars

Gemma Calabria Garcia

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESI DOCTORAL
UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA
PROGRAMA DE DOCTORAT EN GENÈTICA

INVERSIONS CROMOSÒMIQUES, CLINES I ADAPTACIÓ A *DROSOPHILA SUBOBSCURA*: APROXIMACIÓ MITJANÇANT MARCADORS MOLECULARS.

Memòria presentada per

Gemma Calabria Garcia,

per a accedir al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.

Gemma Calabria Garcia
Barcelona, Setembre de 2012

Vist-i-plau dels directors de tesi:

Dra. Marta Pascual Berniola
Professora titular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Dr. Joan Balanyà i Maymó
Professor lector
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Dr. Mauro Santos Maroño
Professor catedràtic
Facultat de Ciències
Universitat Aurònoma de Barcelona

A mi padre

AGRAÏMENTS

Sembla molt topic allò de començar dient “Aquesta tesi doctoral no hagués estat possible sense la participació/ajuda de tanta gent bla bla bla...”. Pot semblar-ho, però quan et pares a pensar tot el que ha passat en els darrers anys, te n’adones realment de que ni de broma tota la feina que hi ha darrere del treball és exclusivament cosa teva i dels teus directors de tesi. Et pares a pensar i veus que, a més, hi ha tot un seguit de gent que sempre ha estat al teu costat (físicament o no) i que és també gràcies a ells, al seu suport, al seu treball o als seus ànims i entusiasme, que la feina que has realitzat esdevingui la teva tesi doctoral. Aquestes línies van per a tots ells, pels cafès, les xerrades, els descansos, els intensius de feina, les captures, els sopars, els congressos, les estades, les discussions i per estar amb mi en algun moment d’aquests darrers anys. M’agradaria anar un per un, però com que no em deixen fer una dedicatòria d’onze pàgines, ho faré el més resumit possible.

En primer lloc, voldria agrair al Dr. Lluís Serra haver confiat en mi i haver-me brindat l’oportunitat de realitzar un doctorat tot donant-me una beca FPI sense gairebé conèixer-me. Per a mi ha estat un plaer ser la seva última becaria (com sempre em diu), així com ha estat un plaer realitzar la tesi en un grup de recerca on m’he sentit tant a gust des del primer moment i on he conegut a gent tant i tant maca.

Un paper clau en la realització de la tesi han estat els meus directors, la Marta, el Joan i el Mauro. Moltes gràcies per endinsar-me en el món de les Drosophiles i la genètica evolutiva, moltes gràcies per estar per mi aquests temps i ensenyar-me, guiar-me i de vegades aguantar-me.

També tota la gent del grup de Biologia Evolutiva de la UB, tant els que encara hi som com els que han passat pel lab en algun moment d’aquests anys, han posat el seu granet de sorra en la realització de la tesi. No només la Marta i el Joan (ui que ja em repeteixo), sinó també el Francesc i tots els compis de laboratori, tant els “mosqueteros” (la Cinta, el Pedrito, els portuguesos (Josiane, Pedro i Joao), la Isabelle, l’Albert i el Marc) com els “marins” (el Ferran, el Víctor, la Celia, l’Aymée, els meus colombians preferits (VH i Rosana) i el Marcel). I als que no són del grup però si són compis de lab (Freddy i Montse). Moltes gràcies a tots, pels cafés, els esmorzars, els vídeos de gats, els riures, els sopars, els viatges... per tot! I per descomptat a l’Ampar i la Neus, ja que sense elles se m’haguessin mort les soques de mosques més d’un cop!

Aquí es quan he de canviar de departament i passar un moment per Biologia Animal... És el que passa quan una és una trànfuga de departaments. Gràcies als integrants de "La nueva vieja guàrdia" (Eloy, Isa, Albert, Alberto, Olatz, Laura, Blanca l'altre tràsnfuga, Cotín,...), els ex-compis de despatx i a les noves adquisicions masteritzandes (Manolo, Debs, Mario,...). Vosaltres feu que els dinars diaris i les cervesetes dels divendres siguin un punt de desconnexió total de la feina, per no nombrar les festes a casa del Luigi i la sangria del Rubén... brutals!

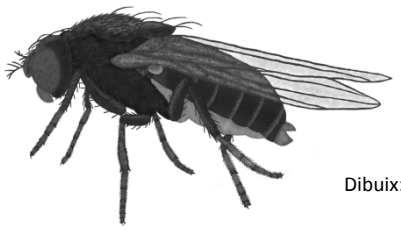
Però no tota la feina s'ha realitzat a la UB, sinó que també he hagut d'anar a l'altra banda de Collserola a treballar de tant en tant. En el Grup de Biologia Evolutiva (Lab. UAB) també he topat amb un munt de gent estupenda (Luz, Doris, Montse, Luis, Olga,...). Moltes gràcies a tots, de debò, per fer-me sentir una més del grup els contats dies que he anat a treballar o a buscar una firmeta del Mauro per a la burocràcia de la tesi.

I'm also very grateful to all the wonderful people I met during my stay in Aarhus. Thanks to Prof. Volker Loeschcke, who kindly accepted me in his group and all people from his lab (Vanessa, Janneke, Dot, Jesper, Neda,…). And special thanks to my home mates (Flora, Theo, Lalo and Rusco) for make me feel like at home even though I was thousands of km away and to my party girls Lena and Marija (you know why).

I fóra de l'àmbit científic, m'agradaria donar les gràcies als amics i la família, que tot i no acabar d'entendre el que faig m'han recolzat en tot moment. Y sobre todo, gracias Javi. Gracias por estar siempre ahí.

I encara podria anomenar a molta altra gent que d'una manera o altra ha estat allà. És una passada mirar cap a enrere i veure tota la gent que m'ha influït, ajudat, animat, distret, ensenyat,... Només espero que la interacció amb tots vosaltres hagi estat recíproca.

Moltes gràcies a tots, de debò.



Dibuix: Blanca Figuerola

CONTINGUTS

1. INTRODUCCIÓ 1

1.1. Inversions cromosòmiques 3

1.1.1. Què són? 3

1.1.2. Com es formen? 3

1.1.3. Visualització citològica: els cromosomes politènics. 5

1.1.4. Efecte genètic de les inversions 6

1.2. Polimorfisme per inversions 8

1.2.1. Variacions del polimorfisme: latitudinal, altitudinal i estacional. 8

1.2.2. Manteniment de les inversions a les poblacions: hipòtesis 11

1.3. Adaptació a l'ambient 12

1.3.1. Adaptació tèrmica 14

1.3.2. Marcadors moleculars per a l'estudi de l'adaptació 17

1.4. Drosophila subobscura com a organisme model. 21

1.4.1 Nombre de cromosomes i inversions 21

1.4.2. Ecologia i distribució 23

1.4.3. Colonització i adaptació 24

1.4.4. Variacions del polimorfisme per inversions a D. subobscura: 26

1.4.5. Manteniment de les inversions 29

1.4.6. Marcadors moleculars disponibles 32

1.4.7. La hipòtesi de la coadaptació tèrmica a Drosophila subobscura 34

2. OBJECTIUS 37

3. MATERIALS I MÈTODES 41

3.1. Poblacions analitzades 43

3.1.1. Recol·lecció de les mostres 45

3.1.2. Identificació del polimorfisme cromosòmic i obtenció de les línies isocromosòmiques 46

3.1.3 Anàlisi de dades 49

3.1.3.1. Anàlisi de la diversitat d'espècies de les poblacions capturades 49

3.1.3.2. Anàlisi del polimorfisme cromosòmic 50

3.2. Extracció de DNA 50

3.3. Loci microsatèl·lits del cromosoma O 51

3.3.1. Amplificació dels microsatèl·lits 52

3.3.2. Anàlisi de les dades 54

3.4. Gens candidats a l'adaptació tèrmica. 57

3.4.1. Gens escollits 57

3.4.2. Seqüenciació 58

3.4.3. Anàlisi de les dades 60

3.5. Aclimatació Tèrmica 62

3.5.1. Obtenció del material d'estudi 62

3.5.2. Inducció de la resposta tèrmica 63

3.5.3. Termotolerància 64

3.5.4. Quantificació de proteïnes 67

3.5.5. Anàlisi de les dades 69

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ 71

4.1. Composició de Drosofílids a les localitats mostrejades 73

4.2. Polimorfisme cromosòmic a *Drosophila subobscura* 76

4.2.1. Polimorfisme per inversions poblacional 76

4.2.2. Clines latitudinals d'inversions 80

4.3. Detecció de mutants estructurals 83

4.4. Anàlisi genòmic de les inversions del cromosoma O utilitzant *loci* microsatèl·lits. 84

4.5. Gens candidats a l'adaptació tèrmica 107

4.5.1. Gens Fst, Sqd, Yrt i Atpα 107

4.5.2. Gen Hsp70 126

4.6. Aclimatació tèrmica 130

4.6.1. Quantificació de HSP70 després d'un xoc tèrmic. 130

4.6.2. Termotoleràncía basal i induïda 133

5. CONCLUSIONS 139

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS 143

7. BIBLIOGRAFIA 157

8. ANNEXOS 175

8.1. Material suplementari: Haplotips dels gens seqüenciats 177

8.2. Publicacions 193

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Inversions cromosòmiques

1.1.1. Què són?

Les inversions cromosòmiques són un tipus de canvis estructurals del genoma en el qual un segment cromosòmic canvia d'orientació dins del cromosoma. Es denominen pericèntriques o paracèntriques segons incloguin o no, respectivament, el centròmer dins de la regió invertida. A més, la seva incidència a les poblacions naturals és molt diferent ja que les inversions pericèntriques són molt poc freqüents, mentre que el polimorfisme per inversions paracèntriques és el canvi cromosòmic més freqüent a *Drosophila*, on de totes les espècies estudiades, més de la meitat són polimòrfiques (Powell, 1997).

Donada la seva facilitat de visualització a dípters, el polimorfisme d'inversions és un dels exemples més ben estudiats d'alteracions cromosòmiques a la natura. Moltes de les espècies dels gèneres *Drosophila*, *Anopheles*, *Chironomus* i *Sciara* son polimòrfiques per a inversions paracèntriques i els seus cromosomes presenten diferents ordenaments a les poblacions naturals (Sperlich and Pfriem, 1986; Krimbas and Powell, 1992; Powell, 1997).

1.1.2. Com es formen?

Des del punt de vista clàssic, les inversions es formen degut a l'aparició de dos trencaments aleatoris i simultanis en un mateix cromosoma, seguit d'un procés incorrecte de reparació dels trencaments que provoca que el fragment generat s'uneixi en orientació invertida (Krimbas and Powell 1992). En aquest procés, el replegament del DNA en el nucli cel·lular podria facilitar l'aparició dels dos trencaments a la vegada i que es reparin incorrectament. El cromosoma es pot trencar simplement de manera espontània, per causes de tensions físiques, o per l'acció de diferents agents mutagènics que indueixen lesions a nivell de DNA, com per exemple algunes substàncies químiques o radiacions ionitzants.

Segons aquesta visió, l'aleatorietat dels punts de trencament implica que les inversions tenen un origen únic i són monofilètiques (Krimbas and Powell, 1992). Això és degut a que la generació d'una inversió a la natura és un fenomen molt rar i la probabilitat que passi a la següent generació i sobrevisqui en la població encara ho és més. Així, el fet que diferents espècies comparteixin la mateixa inversió es considera una evidència del seu origen comú i les inversions cromosòmiques s'han utilitzat com a caràcter filogenètic en diferents grups.

Més recentment, existeix la teoria que proposa que les inversions es formen mitjançant la recombinació ectòpica, és a dir, entre segments de DNA similars situats en diferents llocs del cromosoma. Una de les variants de la recombinació ectòpica és la deguda als elements transposables. Els elements transposables (*ET*) són petits segments de DNA que poden replicar-se i propagar-se pel genoma, insertant-se aleatòriament pel genoma de molts organismes. Així doncs, una inversió cromosòmica es podria originar mitjançant recombinació ectòpica entre seqüències homòlogues de 2 còpies d'un element transposable (Cáceres, 2000). De fet, els punts de trencament de les inversions són punts calents d'inserció d'elements transposables (Krimbas and Powell, 1992). Sembla ser que a la natura, els ETs poden tenir un paper significatiu en la creació dels reordenaments cromosòmics ja que qualsevol alteració del genoma (degut a hibridacions o a estrès ambiental) activa la mobilització dels transposons (Powell, 1997).

Però en intentar corroborar si els elements transposables tenen algun paper en la formació d'inversions a la natura, els resultats no han estat concloents. A *D. subobscura*, Cirera *et al.* (1995) no van poder localitzar amb precisió ni els punts de trencament de la inversió estudiada ni tan sols trobar cap rastre d'elements transposables. En canvi, (Casals *et al.*, 2003) si que van trobar elements transposables en els punts de trencament d'una inversió a *D. buzzatii*, però no estan relacionats amb l'origen de la inversió. Un resultat semblant van obtenir (Ranz *et al.*, 2007) on de les 29 inversions que separen *D. melanogaster* de *D. yakuba*, la majoria estaven relacionades amb repeticions de seqüència, però localitzades únicament a banda i banda de la inversió i no enlloc més del genoma. Així doncs, sembla que els resultats no recolzen la implicació generalitzada dels elements en la generació d'inversions (Powell, 1997)

També hi ha casos en els que no s'han trobat restes d'elements repetits en els punt de trencament, cosa que ha portat a descriure un nou mecanisme de formació de les inversions, el *staggered breaks model* (Casals and Navarro, 2007) que proposa que el primer pas és la formació de talls escalonats a les cadenes d'ADN. La inversió es produirà perquè els mecanismes reparadors lligaran els extrems 5' amb els extrems 3' del punt de trencament contrari. Per últim, els espais resultants són reomplerts, amb la conseqüent formació de duplicacions invertides a cada extrem de la inversió. D'aquesta manera, les regions repetides serien una conseqüència de la formació de la inversió i no pas la causa.

1.1.3. Visualització citològica: els cromosomes politènics.

El descobriment dels cromosomes politènics a *Drosophila* va permetre poder estudiar a nivell citològic el polimorfisme d'inversions cromosòmiques. Els cromosomes politènics (Figura 1.1) són un tipus particular de cromosomes que es troben a les glàndules salivals (i altres teixits amb alta taxa metabòlica) de les larves dels dípters, on les cèl·lules presenten nuclis en interfase permanent. Es generen per sinapsi dels cromosomes homòlegs i la duplicació múltiple dels cromosomes sense que hi hagi divisió cel·lular, en un procés anomenat endomitosi. L'alineament dels cromòmers a causa de la sinapsi produeix la visualització de bandes i interbandes en els cromosomes. També es poden observar zones laxes, els *puffs*, on el material genètic és transcripcionalment actiu i, per tant, no està empaquetat. El patró de bandes i *puffs* és reproduïble de nucli a nucli, permetent identificar els cromosomes i mapejar-los. L'alta resolució que ofereix els patrons de bandes obtinguts en els cromosomes politènics els fa molt útils per estudiar els ordenaments cromosòmics i determinar homologies entre espècies. Així, serveixen de referència per a localitzar citològicament els gens, els microsatèl·lits, els punt de trencament de les inversions i altres marcadors que ens interessin, essent molt utilitzats en estudis genètics i evolutius (Powell 1997).

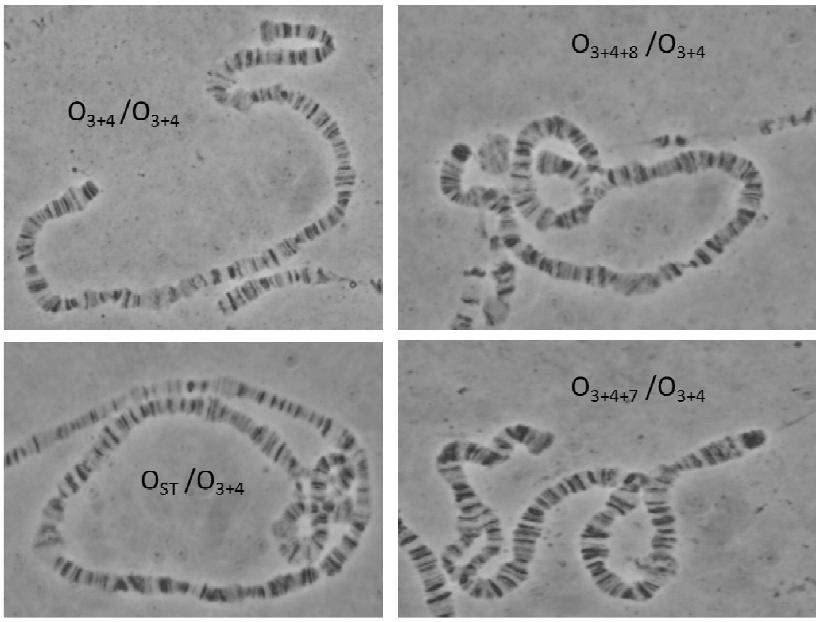


Figura 1.1: Preparacions de cromosomes politènics on s'observen els 4 ordenaments cromosòmics utilitzats en aquest treball. Per obtenir-los s'ha utilitzat la soca *chcu,* que és homocariotípica per l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$. Així, el cromosoma del camp es pot identificar segons les nanses d'inversió que apareguin a la preparació.

1.1.4. Efecte genètic de les inversions

Les inversions cromosòmiques redueixen la recombinació en el fragment invertit entre les cromàtides germanes dels individus heterozigots. El nivell de reducció depèn de la mida de les inversions. En inversions petites, es troba totalment inhibida degut bàsicament a problemes mecànics en el moment d'aparellar-se els cromosomes homòlegs. En canvi, si el fragment invertit és prou gran, es pot donar un entrecreuament, donant com a resultat cromosomes dicèntrics i acèntrics. Per tant, com que la meitat dels gàmetes presentaran una duplicació o deleció de gens, no seran viables i, per tant, l'eficàcia biològica general quedarà reduïda.

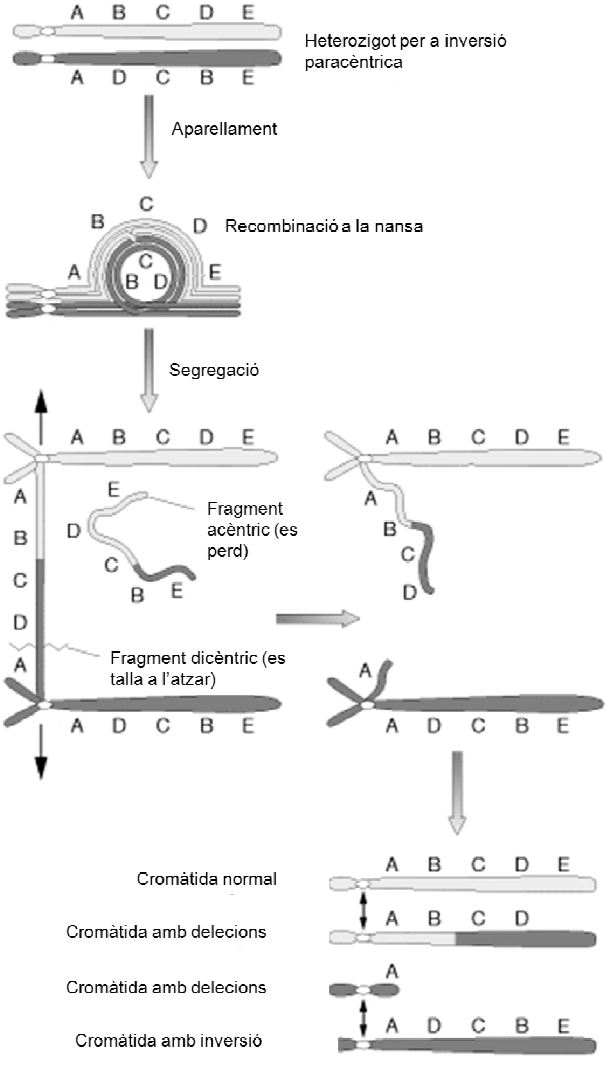


Figura 1.2: Esquema on es mostra com les inversions cromosòmiques inhibeixen la recombinació (modificat de Griffiths *et al.*, (2000)).

A *Drosophila* la reducció de l'eficàcia biològica en els heterozigots per a inversions paracèntriques s'evita mitjançant dos mecanismes. Per una banda, els mascles no presenten recombinació. Per l'altre banda, a les femelles, els productes de la meiosi es disposen de manera lineal i només un dels gàmetes dels extrems és el que dóna lloc a l'òvul. D'aquesta manera, si es dóna un entrecreuament en la segona divisió meiòtica, el pont dicèntric condiciona que les cromàtides no recombinants vagin a parar sempre als extrems i que les cromàtides aberrants formin part dels corpuscles polars i mai de l'oòcit (Figura 1.2).

El que si que pot ocórrer, tot i que són molt menys freqüents, són els dobles entrecreuaments entre el fragment invertit i la cromàtida homòloga. Al ser un doble entrecreuament, no es produeixen cromosomes aberrants i es facilita l'intercanvi genètic entre el segment invertit i el seu homòleg no invertit. La probabilitat que es donin dobles entrecreuaments està relacionada amb la llargada de la inversió. On sí que s'ha demostrat que la recombinació està totalment inhibida és en el cas de les inversions imbricades degut de nou als problemes físics en l'aparellament de les cromàtides durant la sinapsi (Powell, 1997).

Per tant, la inhibició de la recombinació en les inversions fa que aquestes s'heretin com a unitats simples mendelianes, de manera que els diferents ordenaments d'un mateix cromosoma es poden equiparar als diferents al·lels que presenta un gen. A més, la supressió de la recombinació pot fer que els diferents ordenaments presentin diferències adaptatives pels individus que els porten.

Però, a més, els canvis en l'estructura del genoma (i entre ells, les inversions) poden contribuir a l'especiació. Per això existeixen diferents models que proposen que els reordenaments cromosòmics acceleren l'especiació (Ayala and Coluzzi, 2005). Entre ells, ens centrarem en dos, el model de la **disfunció dels híbrids,** que diu que al estar inhibida la recombinació en els individus heterozigots per a la inversió, aquesta produeix una baixada de la *fitness*. Sota aquestes condicions, la selecció natural afavorirà l'aparició de mutants que redueixin la probabilitat d'intercanvi i així, a la llarga, es completarà l'aïllament reproductiu entre les dues espècies. Existeixen exemples que corroboren aquest model en els saltamartins australians estudiats per White (1968).

L'altre model que consideren és l'anomenat model de la **supressió de la recombinació**, proposat per Coluzzi (1982). Sota aquest model d'especiació s'espera que les diferències moleculars entre les espècies es concentrin només en els segments invertits que les diferencien. S'han trobat evidències per a aquest model d'especiació a *D. pseudoobscura* i *D.*

persimilis (Noor *et al.*, 2001) que són dues espècies simpàtrides que es diferencien només per dues grans inversions paracèntriques fixades en el cromosoma X i en el cromosoma 2. A més, els gens associats amb els mecanismes d'aïllament entre les dues espècies se situen només dins de les inversions, mentre que els altres cromosomes no s'ha trobat que el flux gènic estigui suprimit.

1.2. Polimorfisme per inversions

Una espècie presenta polimorfisme per inversions quan les inversions no es troben fixades a l'espècie. És a dir, quan un o diferents cromosomes estan presents en dues o més formes alternatives. L'estudi exhaustiu del polimorfisme cromosòmic per inversions paracèntriques ha permès veure que en moltes espècies aquest polimorfisme pot presentar variacions tant geogràfiques com temporals.

Segons Dobzhansky (1962), el polimorfisme cromosòmic es pot classificar com a rígid o bé flexible depenent de la capacitat de resposta de les espècies als canvis ambientals. El polimorfisme flexible ajudaria a les espècies a respondre davant dels canvis ambientals . En canvi, el polimorfisme rígid seria un mecanisme mitjançant el qual es mantindria la constitució genètica ja que conferiria major plasticitat fenotípica, però la reacció als canvis ambientals es donaria per adaptació individual mes que no pas per especialització genètica.

1.2.1. Variacions del polimorfisme: latitudinal, altitudinal i estacional.

a. Canvis geogràfics:

L'exhaustiu estudi de les inversions cromosòmiques, ha permès detectar en moltes espècies uns interessants i reveladors patrons de distribució geogràfica (Powell, 1997). La interpretació d'aquests patrons no ha estat exempt de polèmica. S'han donat interpretacions de selecció basades en l'heterogeneïtat ambiental, interpretacions neutralistes basades en la deriva i també consideracions històriques.

*i. Clines latitudin*als

En algunes de les espècies de *Drosophila* que presenten polimorfisme per inversions, aquest polimorfisme es distribueix geogràficament de manera que la freqüència d'algunes inversions varia en relació a la latitud formant clines latitudinals.

Així, a *D. melanogaster*, les seves 4 inversions cosmopolites, presenten un patró latitudinal força interessant. En estudiar diferents poblacions d'Amèrica, Europa i Australàsia, s'ha observat que aquestes inversions presenten una correlació negativa amb la latitud en totes les àrees analitzades (Lemeunier and Aulard, 1992).

A *D. subobscura* també s'han descrit clines latitudinals per a diferents ordenaments en diferents cromosomes cromosomes tant a Europa, regió ancestral de l'espècie, com a Sud Amèrica i Nord Amèrica, regions colonitzades a finals dels anys 70 i principis dels 80 (Prevosti *et al.,* 1988; Ayala *et al.,* 1989; Menozzi and Krimbas, 1992). El fet que les clines es donin en ambdós hemisferis i en el mateix sentit demostra que aquestes s'han establert per selecció natural.

Finalment, també s'han trobat clines latitudinals a *D. robusta* (Levitan, 1992), i *D. persimilis* (Powell, 1992).

*ii. Clines altitudin*als

L'altitud és l'altra variable que s'ha estudiat pel que fa als estudis de canvis geogràfics de les inversions.

En aquest cas, l'espècie que ha mostrat clines altitudinals més clares ha estat *D. robusta*. A més, l'establiment del polimorfisme en clines altitudinals és similar a tota la seva àrea geogràfica, el que constitueix una molt bona evidència de que la selecció és la responsable de l'establiment de la clina (Etges, 1984; Levitan, 1992).

Un altre exemple de selecció natural modulant l'establiment de clines altitudinals s'observa a l'espècie hawaiana *D. silvestris*. En aquest cas s'ha comprovat que poblacions que presentaven clines altitudinals i que han desaparegut després d'una erupció volcànica, al ser colonitzades de nou, s'ha restablert la clina altitudinal (Carson *et al.*, 1990).

Altres espècies que mostren clines altitudinals són *D. pseudoobscura* i *D. persimilis* (Dobzhansky and Epling, 1948), *D. flavopilosa* (Brnic, 1972), *D. nasuta* (Ranganath and Krishnamurthy, 1978) i *D. annanassae* (Reddy and Krishnamurthy, 1974).

b. Canvis temporals:

i. Canvis estacionals (o a curt termini)

Els canvis de freqüència de les inversions a curt termini, van ser una de les primeres proves que van permetre determinar que les inversions cromosòmiques estaven fortament sotmeses a l'acció de la selecció natural.

Els primers treballs en demostrar canvis estacionals en el polimorfisme cromosòmic van ser realitzats per Dobzhansky amb *D. pseudoobscura*. Dobzhansky (1970) va triar com a marcadors les inversions cromosòmiques perquè creia que eren neutres, però després d'analitzar mensualment el polimorfisme cromosòmic en 3 poblacions diferents i veure com aquest variava de manera cíclica, va determinar que aquests canvis havien de ser modulats per la selecció natural (Dobzhansky, 1970).

També s'han trobat variacions estacionals a *D. persimilis* (Dobzhansky and Ayala, 1973), *D. robusta* (Levitan, 1992), *D. funebris* (Sperlich and Pfriem, 1986), i a *D. subobscura* (Fontdevila *et al.*, 1983; Rodriguez-Trelles *et al.*, 1996).

ii. Canvis a llarg termini

Per a moltes de les especies aquí citades, es tenen registres de freqüències de les inversions a les poblacions que es remunten a més de 50 anys. Això ha permès poder analitzar si aquest polimorfisme ha patit canvis al llarg del temps.

Una d'aquestes espècies és *D. pseudoobscura* que, tot i que en general el polimorfisme s'ha mantingut estable al llarg del temps, en determinades poblacions aquest ha variat. Per exemple els ordenaments PP i TL han augmentat de freqüència en una determinada àrea (des de la Columbia britànica fins a Califòrnia). Una possible explicació a aquest fenomen seria que aquest canvi estigués associat a canvis en l'ambient, però els experiments duts a terme per comprovar-ho no varen donar resultats concloents (Anderson *et al.*, 1991). Una explicació alternativa és que les pròpies inversions han evolucionat. És a dir, que l'augment d'aquestes inversions s'hagi donat per que un canvi en el seu contingut genètic (per mutació, conversió gènica o entrecreuament) hagi augmentat el seu valor selectiu.

Altres espècies que presenten variacions del polimorfisme cromosòmic a llarg termini són *D. robusta* (Levitan, 1992), *D. melanogaster* (Umina *et al.,* 2005) i *D. subobscura* (Solé *et al.*, 2002; Balanyà *et al.*, 2004).

Els canvis del polimorfisme per inversions a *D. subobscura* es descriuran més endavant i amb més detall en un apartat específic.

1.2.2. Manteniment de les inversions a les poblacions: hipòtesis

Una de les qüestions principals en l'estudi de les inversions cromosòmiques va ser com aquestes es mantenen en les poblacions naturals. En un inici, es va pensar que les inversions cromosòmiques eren variants genètiques neutres, sense efectes positius ni negatius pels individus portadors (Dobzhansky, 1970). Per tant, el seu manteniment en les poblacions responia només a efectes històrics. Però a mida que s'han anat estudiant les inversions i la seva dinàmica a les diferents espècies i poblacions naturals, s'ha determinat que el polimorfisme d'inversions ha d'estar mantingut activament en les poblacions mitjançant selecció natural.

Tenint en compte els treballs de Hoffmann i Rieseberg (2008), Santos (2009) i Kirkpatrick (2010), es poden identificar sis mecanismes genètics que expliquen com les inversions cromosòmiques es mantenen en les poblacions:

i. **Coadaptació de complexos poligènics:** En la hipòtesi tradicional postulada per Dobzhansky (1950), al·lels de dins de la inversió mantenen relacions epistàtiques entre ells i amb els al·lels d'altres inversions, que donen lloc a una major eficàcia biològica de l'individu heterozigot. S'assumeix que aquests loci estan coadaptats (Dobzhansky, 1970).
ii. **Selecció supergènica:** Una hipòtesi derivada de l'anterior és la postulada per Wasserman (1968). Aquesta suggereix que en un mateix ordenament cromosòmic poden haver-hi diferent combinacions d'al·lels coadaptats. En aquest cas els heterozigots estan afavorits ja que mantenen els complexos coadaptats.
iii. **Adaptació local:** Aquesta hipòtesi diu que les inversions són adaptatives perquè agrupen tot un seguit d'al·lels adaptats a la població on la inversió s'ha format, independentment dels efectes epistàtics. Amb la seva teoria de la *Local adaptation,* Kirkpatrick i Barton (2006) postulen que les inversions són afavorides

en la població a través de l'equilibri selecció-migració quan aquesta en formar-se captura un haplotip avantatjós.

iv. **Inversions neutres:** Sovint, les inversions són neutres. Per tant, la seva probabilitat de fixació o pèrdua depèn únicament de paràmetres poblacionals com ara la mida de la població i la deriva genètica.

v. **Inversió sotmesa a selecció positiva:** Aquesta hipòtesi manté que les inversions poden estar sotmeses directament a la selecció en el cas que la formació de la inversió vagi acompanyada d'una mutació en el punt de trencament que afavoreixi a la població.

vi. **Inversió adaptativa:** En el cas que la inversió sigui portadora d'un o més al·lels adaptatius, la selecció natural actuarà sobre tota la inversió.

   a. **Underdominance:** És el cas de la majoria d'inversions pericèntriques. Un sol entrecreuament en un individu heterozigot produeix gàmetes no balancejats (amb delecions, duplicacions i amb dos centròmers o cap), reduint la seva eficàcia biològica. Moltes plantes anuals presenten altes taxes d'evolució per underdominance dels ordenaments cromosòmics. A més, al presentar grans canvis demogràfics i, ocasionalment, autofecundació, els dos mecanismes comporten la baixada de la mida efectiva de la població i, per tant, augmenten el poder de la deriva per a fixar o eliminar la inversió de la població.

   b. **Overdominance:** Els heterozigots per a una inversió tenen una major eficàcia biològica que qualsevol dels homozigots. La diferència amb els tres primers mecanismes descrits, on també els heterozigot estan seleccionats a favor, es troba en què causa la superioritat de l'heterozigot. En aquest cas, és perquè posa en heterozigosi al·lels que en condició d'homozigosi són deleteris. És a dir, que les diferents inversions poden acumular al·lels recessius deleteris i per tant, en els individus heterozigots els efectes deleteris desapareixen.

1.3. Adaptació a l'ambient

La influència que el medi ambient exerceix sobre els organismes determina la millor supervivència i reproducció d'alguns individus sobre altres en les diferents poblacions. Aquesta reproducció diferencial dels individus comporta l'adaptació a l'ambient dels individus de l'espècie i fa que les que no es poden adaptar desapareguin de l'ecosistema. Així, l'adaptació és un procés fonamental en l'evolució i diversificació de les espècies, resultat de certs canvis

heretables (mutacions) produïts a l'atzar, però que es mantenen per selecció natural. Tant mitjançant estructures, funcions o comportament, tot organisme vivent està adaptat al seu medi ambient, tant a les condicions biòtiques com abiòtiques.

Les condicions climàtiques determinen els límits geogràfics per a moltes espècies, però la temperatura és una de les variables més importants que en delimiten la seva distribució i abundància (Parmesan, 2006). En els eucariotes, la vida activa és possible entre uns pocs graus sota zero i uns cinquanta graus centígrads sobre zero. Si es superen aquests límits hi pot haver mort per congelació del citoplasma (es formen cristalls de gel que destrueixen les membranes) o per desnaturalització de les proteïnes en el cas d'un xoc tèrmic. Així doncs, podem considerar que la temperatura és un agent selectiu de gran importància.

L'escalfament global de la terra (0'6°C en els darrers 100 anys) s'està donant com a conseqüència de l'efecte hivernacle que comporta la utilització de combustibles fòssils. L'impacte del canvi climàtic sobre la biodiversitat és un tema a tenir en compte, ja que juntament amb l'activitat antropogènica, la contaminació i la desforestació, són causa de la reducció de la biodiversitat del planeta (IPCC, 2001).

Aquests canvis de l'ambient actuen com a forces selectives, ja que les espècies s'han d'adaptar per tal d'enfrontar-s'hi. En general, l'adaptació al nou ambient es pot donar en forma de modificacions fisiològiques o del comportament, o bé es pot donar una adaptació genètica mitjançant la selecció natural que acabarà alterant la composició genètica de les poblacions (Hoffmann and Parsons, 1991). Exemples d'aquestes respostes adaptatives ja s'han començat a trobar, essent moltes d'elles a nivell de la fenologia de les espècies. En els últims 50 anys, les espècies han anat estenent els seus rangs de distribució cap als pols. En un estudi on es relacionava informació d'espècies, com ara la densitat, la fenologia, la morfologia o el comportament, amb de l'escalfament global (Root *et al.*, 2003), es va determinar que en el 80% de les espècies que mostraven canvis relacionats amb la temperatura, aquests canvis s'havien donat en la direcció esperada tenint en compte els límits fisiològics de les especies. A més, aspectes relacionats amb la migració, la reproducció i desenvolupament, s'han avançat en el temps a mida que les temperatures mitjanes de la primavera han augmentat (Parmesan, 2006). Totes aquestes respostes son atribuïdes a la plasticitat fenotípica però, a més, estudis recents han demostrat que el canvi climàtic està donant lloc a canvis genètics en les poblacions d'alguns organismes, que comporten majoritàriament adaptació a la durada de les estacions (Bradshaw and Holzapfel, 2008). També a nivell genètic s'han observat canvis adaptatius a nivell temporal en diferents espècies del gènere *Drosophila* en general (Levitan, 2003; Umina

et al. 2005) i a *Drosophila subobscura* en particular (Rodríguez-Trelles and Rodríguez 1998; Balanyà *et al.,* 2006, 2009).

Les espècies del gènere *Drosophila* han estat àmpliament utilitzades com a organismes model per a estudiar les respostes evolutives a temperatures extremes (Maynard-Smith, 1956) , ja que presenten nínxols tèrmics i requeriments d'hàbitat força variats, que van des d'espècies amb distribucions molt restringides fins a espècies cosmopolites (Hoffmann *et al.* 2003).

1.3.1. Adaptació tèrmica

Com ja s'ha comentat, la temperatura és una de les variables climàtiques que determinen la distribució i abundància dels organismes vius, per tant, un dels factors que més afecten a la història evolutiva dels individus.

La temperatura ambiental en molts casos pot sobrepassar els límits fisiològics i per tant, poden ser potencialment letals. Per tal d'enfrontar-se als canvis de temperatura, els organismes poden presentar respostes tant de comportament (termopreferència), fisiològiques (plasticitat fenotípica) o genètiques (termotolerància).

i. Termopreferència

La termopreferencia (Tp) es defineix com la temperatura que un organisme tria quan se l'exposa a un rang de temperatures potencials. La temperatura corporal dels animals ectoterms està fortament lligada a la temperatura ambiental on viuen. En molts casos molts d'ells presenten fortes limitacions per tal de regular-la mitjançant ajustaments fisiològics i per tant, ajusten la seva temperatura corporal mitjançant el comportament. Per exemple, movent-se de llocs assolellats a llocs amb ombra (Dillon *et al.*, 2009).

La termoregulació mitjançant el comportament pot ser adaptativa de dues maneres complementàries: (i) Pot ajudar a l'individu a evitar temperatures extremes tant fredes com càlides que poden ser letals (Norris, 1967). (ii) Pot incrementar el temps que l'individu es manté a la seva temperatura fisiològica òptima (Huey *et al.*, 2003). De fet, la preferència tèrmica de les espècies correspon a la temperatura a la qual les espècies maximitzen la seva eficàcia biològica.

ii. Plasticitat fenotípica

La plasticitat fenotípica és la capacitat d'un determinat genotip de presentar diferents fenotips en diferents ambients. En altres paraules, és una característica de l'amplada fenotípica que pot tenir un determinat genotip.

En determinats casos, l'ambient pot influir directament en l'expressió gènica. Però sovint els canvis a l'exterior comporten canvis en "l'ambient interior" que poden alterar el seu desenvolupament, fisiologia o fins i tot el comportament, de manera que el resultat és que es produeixen diferents fenotips. Així, com que la plasticitat és dóna com a resposta a la variabilitat d'un estrès ambiental, juga un paper important com a font de variació sobre la que pot actuar la selecció natural i, per tant, l'evolució. Així, entendre els mecanismes pels que actua la plasticitat fenotípica també ens ajudaria a entendre els mecanismes de l'evolució.

Però la plasticitat també és important a nivell ecològic ja que el medi ambient és variable. Així doncs, davant d'aquesta variabilitat les espècies que poden produir respostes plàstiques, tenen major èxit en la supervivència. Per tant, la plasticitat actua com un mecanisme tamponador contra la variabilitat ambiental. Però, a més, aquest mecanisme permet ampliar el nínxol ecològic de les espècies que, de nou, comporta grans oportunitats per a la selecció, diversificació i radiació.

Gairebé tots els caràcters poden presentar plasticitat fenotípica. En un principi aquest concepte es va aplicar a caràcters morfològics, però a hores d'ara ja és clar que molts organismes poden alterar la seva bioquímica, fisiologia i comportament en resposta a l'ambient. A més, tota una sèrie de fenòmens com ara la resposta al xoc tèrmic, aclimatacions, diapauses, i en general la resposta a l'estrès ara per ara es poden analitzar mitjançat la plasticitat fenotípica que en el fons representa fisiologia alterada.

iii. Termotolerància

De la mateixa manera que la termopreferència ens dóna una idea de la temperatura a la qual la *fitness* de l'individu és major, la termotolerància o resistència tèrmica ens dóna el rang de temperatures que la espècie que estem estudiant pot suportar.

Els animals ectoterms constitueixen la gran majoria de la biodiversitat terrestre i són especialment propensos a ser vulnerables a l'escalfament climàtic perquè les seves funcions fisiològiques bàsiques com ara la locomoció, el creixement o la reproducció estan fortament

influenciades per la temperatura ambiental. La capacitat dels ectoterms per realitzar aquestes funcions a diferents temperatures es descriu mitjançant una corba de rendiment tèrmic (Huey and Stevenson, 1979), que relaciona l'eficàcia biològica amb la temperatura. Així, la corba s'eleva gradualment des d'una temperatura crítica mínima (CT_{min}) fins a la temperatura òptima (T_{opt}), i després cau ràpidament fins a la temperatura crítica màxima (CT_{Max}) (Figura 1.3).

Les temperatures crítiques CT_{min} i CT_{Max}, que es defineixen pels límits de l'organisme, s'han mesurat en diverses espècies d'ectoterms i en general covarien amb la latitud, cosa que reflecteix l'adaptació, si més no parcial, dels ectoterms al seu clima. Per tant, aquestes corbes mostren l'efecte directe de la temperatura en l'eficàcia biològica de l'organisme, i d'aquesta manera proporcionen un marc fisiològic per dilucidar els possibles efectes del canvi climàtic global d'una manera empírica (Deutsch *et al.*, 2008).

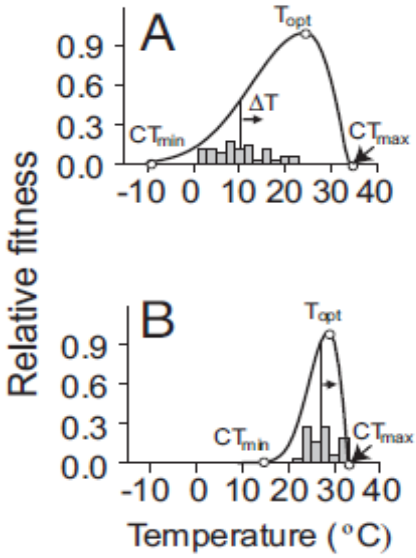


Figura 1.3: Corbes de rendiment tèrmic per a espècies d'àrees temperades (A) i d'espècies tropicals (B). En ambdues corbes s'indiquen la CT_{min}, la T_{opt}, i CT_{max}. (La imatge correspon a la Fig. 1 de Deutsch *et al.*, 2008).

Per concloure aquest apartat, podem considerar que les condicions estressants actuen com a força evolutiva que contribueix a l'adaptació de les poblacions naturals (revisat a Hoffmann *et al.*, 2003). En aquest sentit, la resistència tèrmica es presenta com un dels mecanismes més importants que permet als organismes enfrontar-se a l'augment en la variació de la temperatura. Per a *Drosophila*, s'ha observat que a la natura es dóna selecció a favor de la resistència tèrmica (Krebs and Feder, 1997a), i que es donen correlacions entre l'expressió de

les proteïnes d'estrès tèrmic i els gradients d'estrès ambiental (Feder and Hofmann, 1999). De manera que podem considerar, de nou, que la temperatura actua com a agent selectiu.

1.3.2. *Marcadors moleculars per a l'estudi de l'adaptació*.

L'estudi genètic de l'adaptació ha anat variant en funció de les tècniques que hi ha hagut disponibles en cada moment. En els inicis, els marcadors més utilitzats per la seva fàcil visualització varen ser les inversions cromosòmiques. A nivell molecular, els primers marcadors utilitzats van ser els al·loenzims, que varen permetre comparar el contingut genètic de les diferents inversions i per tant, poder avaluar les diferències entre elles per tal de poder-les relacionar amb el seu possible valor adaptatiu. El gran inconvenient d'aquests marcadors va ser que, van resultar uns marcadors molt poc polimòrfics degut a la gran constricció funcional que presenten les proteïnes.

El desenvolupament de les tècniques de seqüenciació va permetre analitzar directament la variabilitat dels DNA. Relacionant-lo amb les inversions, va permetre comparar directament les seqüències dels gens situats dins de les inversions i, per tant, el seu contingut molecular amb una resolució molt més acurada. Els primers gens que es van seqüenciar es van triar en base als coneixements previs que es tenien en el moment, derivats dels estudis d'al·loenzims o bé d'estudis bioquímics. Posteriorment, amb el desenvolupament dels microarrays i altres tècniques per monitoritzar els canvis en el nivell de transcrit, es van poder analitzar desenes de gens alhora, podent comparar l'expressió dels gens a diferents condicions experimentals i identificar aquells que s'expressen diferencialment com a possibles gens candidats a l'adaptació. Altres eines que s'han utilitzat per a identificar gens candidats han estat els experiments de selecció, el mapeig de QTLs i els estudis de mutants (Hoffmann and Willi, 2008).

També s'han utilitzat marcadors neutres, com per exemple els microsatèl·lits. Aquests són uns marcadors amb certs avantatges sobre els gens ja que són molt abundants en el genoma, són generalment molt polimòrfics i fàcils d'analitzar. El genotipat per microsatèl·lits i la comparació entre poblacions, permet identificar regions del genoma (i fins i tot gens específics) que hagin patit un procés selectiu. En aquet cas, la regió que hagi patit la selecció presentarà una menor variabilitat deguda a l'escombrada selectiva associada (Schlötterer, 2002).

Actualment estem de ple en la era de la genòmica i la transcriptòmica. Amb les noves tècniques d'ultraseqüenciació, es pot obtenir el genoma sencer o el transcriptoma d'una

espècie, cosa que permet que es puguin fer comparacions del genoma sencer per tal de trobar les regions específiques del genoma que estan sotmeses a la selecció.

1.3.3. L'estudi de l'adaptació tèrmica: les heat shock proteins.

Pel que fa a l'estudi de l'adaptació tèrmica, una de les àrees millor estudiades és la relació de la tolerància tèrmica amb l'expressió de les proteïnes de xoc tèrmic. Aquesta relació s'ha trobat en tots els individus on s'ha estudiat i s'ha observat que la inducció d'aquestes proteïnes fa augmentar la termotolerància dels individus (Krebs and Feder, 1998).

Tots els organismes responen a l'increment sobtat de la calor a través de la inducció i síntesis d'un grup de proteïnes anomenades Proteïnes de Xoc Tèrmic (Hsp per les seves sigles en anglès). Els gens que codifiquen per aquestes proteïnes varen ser descrits per primer cop a *Drosophila* l'any 1962 al veure que en patir un xoc tèrmic, apareixien una sèrie de puffs en els cromosomes politènics de les larves (Ritossa, 1962), tot i que no va ser fins l'any 1974 que es van descriure les proteïnes associades amb aquests puffs (Tissières *et al.*, 1974). La resposta tèrmica mitjançant les Hsps és un dels sistemes genètics major conservat dels coneguts fins a la data, i un dels més universals ja que s'ha trobat a tots els organismes on s'ha estudiat, des de llevats fins a mamífers (Lindquist and Craig, 1988). Els gens de les Hsp estan entre els més ben conservats que es coneixen. Per exemple, pel gen hsp70, que codifica per una de les proteïnes de xoc tèrmic més conservades, hi ha un 50% de similaritat aminoacídica entre *Escherichia coli* i *Homo sapiens*, arribant al 96% per a alguns dominis (Lindquist and Craig, 1988; Feder and Hofmann, 1999; Sørensen *et al.*, 2003, per a revisions). Aquesta baixa variació en els gens de les Hsps així com la seva presencia universal indiquen la gran importància evolutiva i el seu paper important en la protecció cel·lular.

Les Hsps són un grup de proteïnes que actuen com a xaperones moleculars que ajuden a mantenir la conformació natural de les proteïnes, evitant la seva desnaturalització deguda a l'estrès tèrmic (Lindquist and Craig, 1988; Feder and Hofmann, 1999; Sørensen *et al.*, 2003). Al mantenir l'estructura terciària de les proteïnes, eviten el dany cel·lular. A més, les xaperones intervenen en el transport, plegament, desplegament, assemblatge i dessamblatge d'unitats proteiques multi estructurals i en la degradació de proteïnes en mala conformació (Figura 1.4). Com que els estressos ambientals o fisiològics, així com les mutacions gèniques afecten de manera negativa l'estabilitat de les proteïnes, i resulten en l'incorrecte plegament d'aquestes, no és sorprenent que la resposta a l'estrès cel·lular, tingui un paper fonamental en el control de qualitat del plegament de proteïnes. L'expressió dels gens de xoc tèrmic és el primer pas de

la resposta a l'estrès (no només tèrmic, sinó també a metalls pesants, contaminants, etc.) (Parsell *et al.,* 1993; Zatsepina *et al.,* 2001). En tots els organismes, la inducció de les Hsps és molt ràpida i intensa, en concordança amb el fet que és una resposta d'emergència cel·lular. Malgrat les avantatges descrites, l'expressió de Hsps va relacionada amb uns costos per a l'organisme (Krebs and Loeschcke, 1994; Krebs and Feder, 1997b; Krebs and Feder, 1998). De manera que els costos imposarien una barrera pel nivell màxim de Hsp70 expressat, que a *Drosophila* es podria estendre a tot el seu cicle vital ja que l'expressió de Hsp70 entre els estadis de larva i adult semblen estar genèticament associats (Krebs *et al.*, 1998).

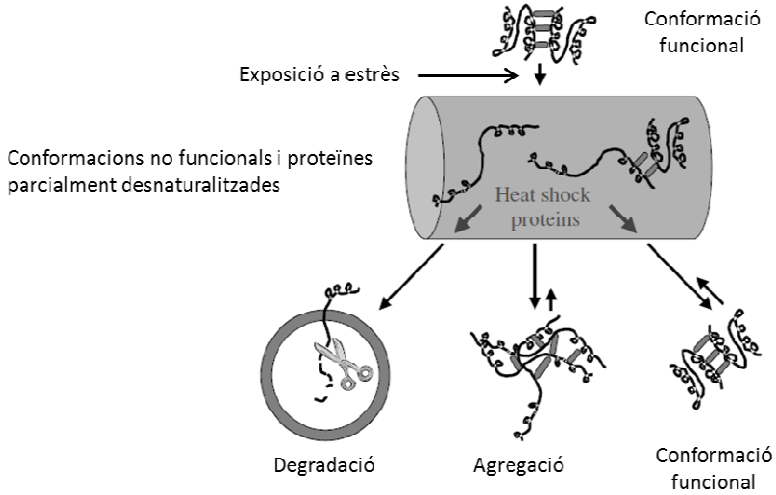


Figura 1.4: Funció cel·lular de les Hsps. El destí de les proteïnes amb conformacions no funcionals després d'una exposició a estrès pot ser retornar a la conformació funcional, formar agregats amb altres proteïnes desnaturalitzades o ser degradades. Les Hsps juguen un paper d'ajuda canviant l'equilibri en direcció de proteïnes més funcionals o bé degradant les proteïnes malmeses.

Els gens i els seus productes s'assignen a diferents famílies tenint en compte l'homologia de les seves seqüències així com el pes molecular (en kD) de la proteïna final. Dins de cada família , cada gen pot diferir en pes molecular. Les famílies són: hsp100, hsp90, hsp70, hsp60, hsp40, i la família de les hsp petites (amb mides inferiors als 30kDa). Als eucariotes, moltes de les famílies presenten diversos gens que difereixen en la seva inducció, localització cel·lular i funció (Feder and Hofmann 1999). A *Drosophila melanogaster* s'han descrit tres grans famílies d'Hsps: Hsp90 (amb un únic gen, *hsp83*, que s'expressa constitutivament i és induït en resposta a l'estrès), Hsp70 (amb els gens *hsp68* i *hsp70*) i les Hsp petites (Hsp23, Hsp26, Hsp27, i Hsp22), que conformen un grup molt divers ja que les diferents espècies difereixen tant en nombre com en pes molecular.

A molts organismes, la Hsp70 es la principal família de Hsps, que consisteix no només en proteïnes induïbles, sinó també en constitutives (Sørensen *et al.*, 2003). La forma induïble només s'expressa immediatament després de l'estrès, i s'indueix per la presència de proteïnes amb conformació no natural dins de les cèl·lules (Lindquist and Craig, 1988; Hoffmann *et al.*, 2003).

Malgrat la baixa variabilitat de les regions codificadores dels gens *hsp*, alguns estudis han demostrat l'existència de clines latitudinals i canvis en resposta a l'evolució tèrmica al laboratori per a alguns gens de la família de les hsp70 (Bettencourt *et al.*, 2002; McColl *et al.*, 1996; McColl and McKechnie, 1999). A més a més, altres estudis apunten a una associació entre la resistència tèrmica i les proteïnes de xoc tèrmic (Hoffmann *et al.*, 2003; Bettencourt *et al.*, 2008).

Tot i això, el paper que juga la Hsp70 en la termotolerància de *Drosophila* és un tema que encara presenta controvèrsia. En estudis on s'ha manipulat genèticament els nivells de Hsp70 mitjançant larves transgèniques de *Drosophila melanogaster* s'ha demostrat que els individus que produeixen més proteïna milloraven la seva termotolerància sota condicions de laboratori (Krebs and Feder, 1998; Bettencourt *et al.*, 2008) i condicions semi-naturals (Roberts and Feder, 2000); A més, la variació natural de l'expressió de Hsp70 també es correlaciona positivament amb la termotolerància larval (Krebs and Feder, 1998). Per altra banda, l'associació entre nivells d'Hsp70 i la termotolerància en adults és lleu (Dahlgaard *et al.*, 1998; Krebs *et al.*, 1998) o fins i tot nul·la (Jensen *et al.*, 2010). Aquests resultats es contraposen al que s'observa en les línies de *Drosophila* seleccionades per incrementar la termotolerància dels adults (Sørensen *et al.*, 1999; Folk *et al.*, 2006), en les quals també s'incrementa el nivell d'Hsp70, la qual cosa suggereix que aquests dos caràcters (l'expressió de Hsp70 i la termotolerància) estan relacionats.

1.4. Drosophila subobscura com a organisme model.

Drosophila subobscura (Collin, 1936) (Figura 1.5) és una espècie del subgènere *Sophophora* de l'ordre dels dípters. Pertany al grup *obscura* i forma el subgrup *subobscura* juntament amb les espècies *Drosophila madeirensis* i *Drosophila guanche* (Barrio *et al.*, 1994).



Figura 1.5: Imatges de *Drosophila subobscura*. La imatge de l'esquerre representa un mascle i a la dreta, es troba la femella.

Es cultiva fàcilment al laboratori, on el seu cicle biològic és aproximadament d'uns 24 dies a 18°C i en condicions òptimes de densitat larvària (Orengo and Prevosti, 1994). Ateses aquestes característiques, ha estat un organisme molt utilitzat per diferents grups europeus en estudis genètics, ecològics, evolutius, de fisiologia, comportament d'insectes i biologia en general. L'elevada abundància, que facilita la seva captura, i el seu ric polimorfisme cromosòmic per inversions fa que sigui una espècie de referència en l'àmbit de la genètica evolutiva, com ho és la seva homòloga americana *D. pseudoobscura* (Krimbas, 1993; Powell, 1997).

1.4.1 Nombre de cromosomes i inversions

El cariotip de *D. subobscura* està format per 6 parells de cromosomes (Figura 1.6): 5 d'acrocèntrics (A (cromosoma sexual), E, J, O i U) i 1 de puntiformes, anomenat dot (Mainx *et al.*, 1953). Els cromosomes acrocèntrics presenten un ric polimorfisme per inversions en les poblacions naturals (Krimbas, 1993), on s'han arribat a descriure més de 60 inversions paracèntriques que conformen més de 85 ordenaments diferents pel total dels cromosomes. Cada inversió s'anomena amb la lletra del cromosoma on es troba i un número, que determina l'ordre en què es va descriure. Per exemple la inversió A_1 va ser la primera descrita pel cromosoma A. El fet que hi hagi més ordenaments que inversions és degut a què moltes de les inversions no es troben soles a la natura, sinó formant complexos d'inversions. Així, una

inversió pot formar part de diferents ordenaments cromosòmics com per exemple O_2, que es pot trobar en els ordenaments O_{3+4+2} o $O_{3+4+23+2}$. A més, podem trobar inversions imbricades com ara O_{3+4+8} o inversions en el mateix cromosoma però no solapades com O_{3+4+1}. Per indicar que les inversions es troben solapades o imbricades se subratllen els números amb una línia contínua (O_{3+4}). En canvi, les inversions no solapades s'indiquen amb una línia discontínua (O_{3+4+22}). En poblacions naturals, s'ha vist que les inversions no imbricades d'un mateix cromosoma presenten un fort desequilibri de lligament entre elles. Així, encara que la inversió O_7 es trobi separada del complex O_{3+4}, en poblacions naturals es troba gairebé sempre l'ordenament O_{3+4+7}, mentre que la inversió O_7 sola es presenta en molt baixa freqüència (Krimbas, 1993).

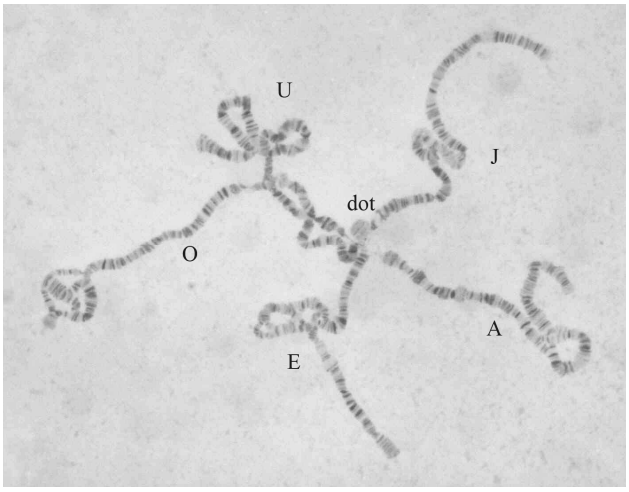


Figura 1.6: El cariotip de *D. subobscura* observat al microscopi òptic en una preparació de cromosomes politènics. S'observen les inversions A_2/A_{ST}, $E_{1+2+9+12}/E_{ST}$, J_1/J_{ST}, O_{ST}/O_{3+4} i U_{1+2}/U_{ST}.

La present tesi doctoral es centrarà només en el cromosoma O (corresponent a l'element E de Muller i homòleg al braç 3R de *D. melanogaster*) per una sèrie de motius. Per una banda, és un dels cromosomes que presenta major polimorfisme per inversions, ja que se n'han descrit fins a 26 de diferents (Krimbas, 1993) que conformen ordenaments complexos amb inversions solapades i no solapades. A més, es disposa de la soca homocariotípica *chcu* (O_{3+4}, J_{ST}, U_{ST}, E_{ST} i A_{ST}) que presenta uns marcadors recessius localitzats en el cromosoma O (Lankinen and Pinsker, 1977). També hi ha una soca de gens letals equilibrats *Va/Ba* (*Varicose* / *Bare;* (Sperlich *et al.*, 1977) que permet obtenir línies isocromosòmiques pel cromosoma O seguint el patró d'encreuaments adequat (Mestres *et al.,* 1990). D'aquesta manera, no cal recórrer a encreuaments consanguinis, imprescindibles per obtenir línies homozigòtiques de qualsevol dels altres cromosomes.

Aquest cromosoma, que és el més llarg del cariotip (190 cM, que corresponen aproximadament a 31Mb; (Pegueroles *et al.*, 2010a), s'ha dividit tradicionalment en dos segments atenent a la distribució de les inversions: un de distal en relació al centròmer (segment I) i un altre de proximal (segment II) (Krimbas and Loukas, 1980).
Els punts de trencament de cada inversió estan definits al mapa de Kunze-Mühl and Müller (1958), que divideixen tot el genoma en 100 seccions i 405 subseccions. El cromosoma O per exemple, comprèn les seccions 75 a 99 des de la regió proximal fins a la distal. Dins de cada secció, les subseccions s'identifiquen amb lletres (Figura 1.7).

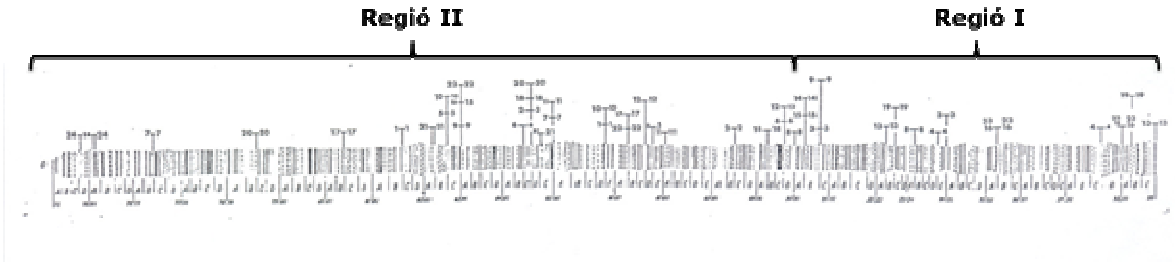


Figura 1.7: Mapa citològic del cromosoma O de *D. subobscura*. En ell estan representades les 25 seccions (amb les seves subseccions) i els punts de trencament de les principals inversions cromosòmiques.

1.4.2. Ecologia i distribució

L'ecologia de *D. subobscura* és mal coneguda, tot i que sembla ser una espècie molt generalista. A la natura , es distribueix a prop dels marges dels boscos de *Quercus*, *Abies*, *Pinus*, *Castanea*, *Ulmus*, *Acer* i altres, tot i que sembla més associada a l'activitat humana del que es pensava inicialment, ja que es pot trobar a parcs i jardins urbans. No es coneix exactament on es reprodueix; s'ha trobat sobre quatre substrats potencialment nutritius: fongs, saba dels arbres, vegetals en descomposició i fruits (Begon and Shorrocks, 1978). Però el nombre d'individus que normalment emergeixen d'aquests substrats quan s'han analitzat no explica la gran abundància d'aquesta espècie a la natura.

Com a totes les espècies, l'abundància de *D. subobscura* en les diferents zones de la seva àrea de distribució varia segons si les poblacions es troben en l'àrea central o marginal. A les regions perifèriques, es troba en un percentatge menor del que es troba en l'àrea central de la distribució. La dinàmica poblacional al llarg de la seva distribució varia estacionalment i depèn de les condicions climàtiques (especialment de la temperatura i de la humitat) i de la disponibilitat d'aliments. Al Nord d'Europa, presenta un màxim d'abundància a l'estiu, mentre

que a les poblacions del Sud d'Europa en presenta dos, un a la primavera i un altre a la tardor. Aquestes diferències correspondrien a reaccions relacionades amb les respostes adaptatives a les condicions ambientals d'humitat i temperatura, així com a la disponibilitat de recursos alimentaris tant per a les larves com per als adults, recursos que canvien de Nord a Sud en qualitat i quantitat al llarg de l'any. L'estudi de la seva distribució geogràfica i diferents anàlisis ecològiques realitzades al continent europeu i americà tendeixen a indicar que és una espècie amb una gran flexibilitat adaptativa, ja que es detecta en diferents condicions climàtiques i d'hàbitat (Monclús, 1964; Codina and Perez, 1980; Huey and Pascual, 2009).

Drosophila subobscura és una espècie originàriament de distribució Paleàrtica. La seva distribució a Europa comprèn tot el continent -excepte el Nord d'Escandinàvia-, les illes Britàniques, totes les de la Mediterrània i alguns grups d'illes de l'Atlàntic com ara les Canàries, Açores i Madeira. Cap a l'est, s'ha trobat en diverses repúbliques de l'antiga Unió Soviètica, la regió iraniana del mar Caspi, Turquia, Líban, Israel i la zona central d'Àsia. També es detecta a la costa del Nord d'Àfrica fins al Sàhara (Revisat a Krimbas, 1993) i últimament ha estat descrita a localitats a l'oest de la Xina (Bächli *et al.*, 2004). En els darrers anys, aquesta espècie està augmentant la seva distribució cap al Nord. D'aquesta manera, mentre que al 1959 la localitat més al Nord era Uppsala, l'any 1988 es va trobar a Umeå (400km més al Nord) i l'any 2004 a Skellefteå (a 150 km al Nord d'Umeå). Aquest desplaçament de la distribució cap al Nord segurament estigui molt relacionat amb el recent canvi climàtic (Krimbas, 1993).

1.4.3. Colonització i adaptació

A finals dels anys setanta *D. subobscura* es va trobar per primer cop a la costa de Xile, a la població de Puerto Montt (Brncic *et al.*, 1981). Posteriorment, l'any 1982, es va trobar també a la costa oest Nord americana, a Port Townsend, Washington (Beckenbach and Prevosti, 1986). A tots dos continents, *D. subobscura* es va expandir ràpidament i en pocs anys les àrees colonitzades van presentar un rang geogràfic simètric a ambdós hemisferis, amb condicions climàtiques paral·leles a les de l'àrea de distribució paleàrtica (Prevosti *et al.*, 1988) (Figura 1.8).

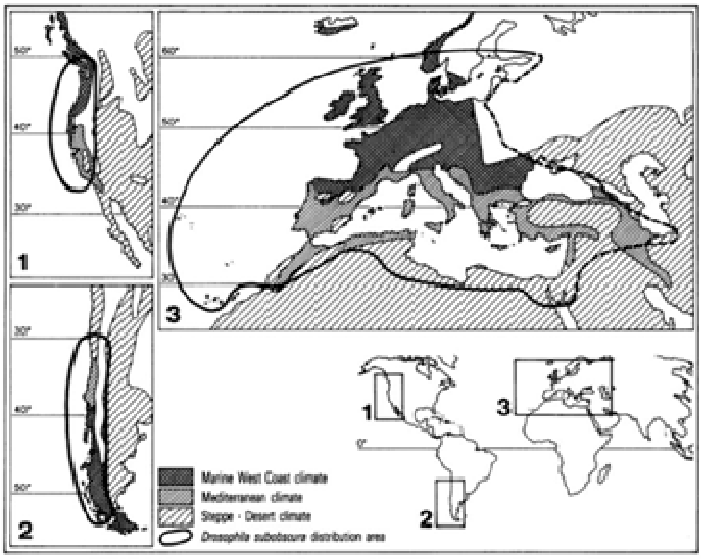


Figura 1.8: Mapa de la distribució de *D.subobscura* als tres continents on es relaciona amb el tipus de clima a cada regió (Prevosti *et al.*, 1988).

La colonització d'Amèrica per part de *D. subobscura* representa un experiment natural amb dues rèpliques molt interessant per estudiar qüestions de tipus evolutiu (Ayala *et al.*, 1989). Poc després que es detectés la colonització del nou món, es van iniciar tota una sèrie d'estudis genètics amb l'objectiu d'entendre millor la dinàmica evolutiva de l'espècie i el procés colonitzador. S'ha estudiat des del punt de vista tant biogeogràfic com ecològic i genètic (Brncic *et al.*, 1981; Prevosti *et al.*, 1983b, 1985, 1988, 1990; Beckenbach and Prevosti, 1986; Latorre *et al.*, 1986; Ayala *et al.*, 1989; Rozas *et al.*, 1990; Rozas and Aguadé, 1991; Mestres *et al.*, 1992, 1995, 2001; Pascual *et al.*, 1993; Solé *et al.*, 2000). S'ha demostrat que aquestes colonitzacions no són independents, sinó seqüencials (Mestres *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2007), a partir d'un baix nombre d'individus (Brncic *et al.*, 1982; Mestres *et al.*, 1990; Balanyà *et al.*, 1994; Pascual *et al.*, 2001) però encara no ha estat identificada la població Europea que va ser l'origen de la colonització, tot i que sembla plausible un origen mediterrani occidental (Mestres *et al.*, 1992; Zivanovic and Mestres, 2000; Pascual *et al.*, 2007; Araúz *et al.*, 2009).

La ràpida expansió de *D. subobscura* en les àrees colonitzades ha fet que sigui l'espècie més freqüent en algunes de les poblacions analitzades. Aquest èxit de la colonització pot ser atribuït a les diferències clares en la estacionalitat en relació a les espècies de *Drosophila* natives de Nord Amèrica (Pascual *et al.*, 1993) i a la competència amb les espècies autòctones (Pascual *et al*., 1998), mentre que a Sud Amèrica estaria relacionat amb que és la única espècie representant del grup *obscura*.

1.4.4. Variacions del polimorfisme per inversions a D. subobscura:

i. Variacions geogràfiques, les clines latitudinals

El polimorfisme per inversions a *D. subobscura*, ha estat estudiat de manera exhaustiva en tot Europa (Krimbas, 1993; Krimbas and Loukas, 1980), permetent conèixer quina és la distribució de les diferents inversions cromosòmiques. Dels resultats dels diferents estudis s'ha vist que moltes de les inversions que es troben àmpliament distribuïdes presenten clines latitudinals de freqüència (Menozzi and Krimbas 1992; Balanyà *et al.,* 2003).

Les clines es poden formar principalment per dos motius: com a resultat d'un procés adaptatiu o degut a factors històrics. En el primer cas, cada inversió mantindria un conjunt de gens adaptats a unes determinades condicions que donarien una resposta adaptativa diferencial als individus que les porten. Per exemple, l'ordenament O_{ST}, que presenta una clina latitudinal amb freqüències més elevades a les poblacions del Nord (Figura 1.9) hauria de tenir un contingut genètic millor adaptat al fred i diferent del contingut genètic del complex $O_{\underline{3+4}}$ que presenta la clina oposada. En aquest cas les clines, per tant, estarien originades i mantingudes per selecció natural i serien estables al llarg del temps si les condicions ambientals no canvien. En el segon cas, les freqüències de les inversions dependran d'on es va generar la inversió. En el punt d'origen, la freqüència seria màxima i aniria disminuint a mesura que ens n'allunyem. En aquesta situació, les clines serien de caràcter transitori i estarien originades per acció de la migració i la deriva (Krimbas and Powell, 1992).

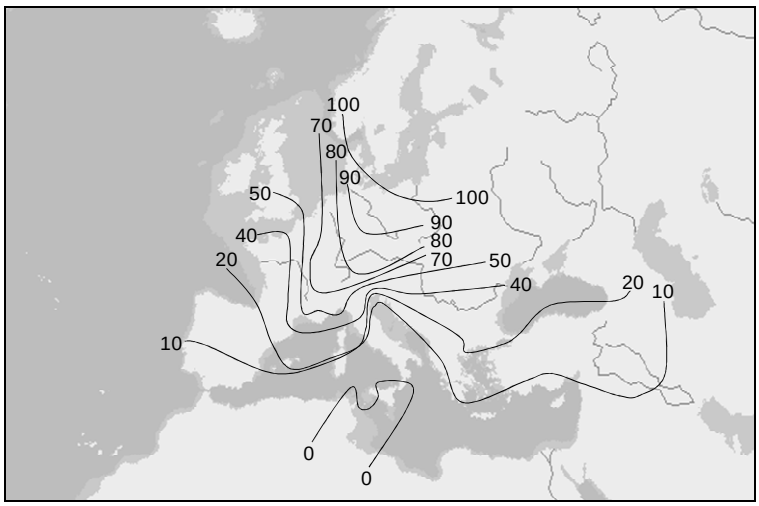


Figura 1.9: Distribució en freqüència de l'ordenament cromosòmic O_{ST} a Europa.

En descobrir-se l'existència de les clines latitudinals a Europa, es va discutir molt sobre si eren adaptatives o no. La colonització d'Amèrica per part de *Drosophila subobscura* ha permès demostrar que aquestes clines són adaptatives. Com ja s'ha comentat abans, al cap de tan sols 5 anys després de ser detectada, *D. subobscura* ocupava el mateix rang geogràfic que a Europa i, analitzant la freqüència d'inversions, es va veure que presentava les mateixes clines latitudinals a ambdós subcontinents (Prevosti *et al.* 1985, 1988) i, el més important, amb el mateix signe que les presents a Europa (Ayala *et al.* 1989; Brncic *et al.* 1981; Solé *et al.* 2002; Balanyà *et al.* 2003). Així doncs, es va demostrar que els ordenaments cromosòmics que presentaven clina latitudinal eren adaptatius a algun factor que variava conjuntament amb la latitud. I per tant, que el conjunt d'ordenaments cromosòmics constitueix un mecanisme genètic d'adaptació ràpida a l'ambient, que ofereix una especial flexibilitat adaptativa.

ii. Variacions geogràfiques, les clines altitudinals

Pel que fa a les variacions del polimorfisme cromosòmic en relació als canvis d'altitud, són pocs els estudis publicats. En el primer d'ells, dut a terme per Martinez-Sebastian *et al.*, (1984), es va comparar el polimorfisme cromosòmic de tres poblacions situades a diferents alçades a la Sierra de Gúdar, amb les seves diferències pel que fa a condicions ecològiques i climàtiques, però no es va detectar cap diferència. En canvi, Burla *et al.*, (1986) sí que van detectar diferències en el polimorfisme en comparar mostres capturades a diferents alçades d'una regió de Suïssa. Les diferències varen ser donades principalment pel cromosoma J, que presentava una clina altitudinal comparable amb la que presenta latitudinalment.

iii. Variacions en el temps, canvis estacionals

L'estudi més complet fins a la data per a poder determinar si *D. subobscura* presenta algun tipus de variació estacional és el que s'ha dut a terme a la població gallega de El Pedroso. En els dos períodes estudiats es va veure que algunes inversions presentaven estacionalitat (Fontdevila *et al.*, 1983; Rodríguez-Trelles *et al.*, 1996). En general, es va observar un augment de l'ordenament $O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$ a l'estiu i una disminució a la primavera i la tardor, mentre que l'O_{ST} es comporta a l'inrevés.

Aquests canvis estacionals presenten un comportament que concorda amb la distribució geogràfica clinal d'aquests ordenaments. És a dir, que l'ordenament O_{ST}, que és molt freqüent a les poblacions del Nord d'Europa, va presentar una freqüència mínima a l'estiu en el lloc d'estudi, mentre que l'ordenament $O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$, típicament del Sud, va presentar un màxim de

freqüència en la mateixa època. A més, aquests ordenaments van presentar una forta relació amb factors climàtics com ara la temperatura màxima diària i la humitat relativa.

També existeix un estudi que compara les variacions estacionals a una població prop de Barcelona. En aquest treball, de Frutos and Prevosti, (1984) no varen detectar variacions per als cromosomes A, E i O, però sí per a les freqüències d'ordenaments dels cromosomes J i U, tot i que les dades eren insuficients per a veure si es seguia un model cíclic.

iv. Variacions en el temps, canvis a llarg termini

Un dels primers estudis a llarg termini va ser el dut a terme per Gosteli (1990), que comparava els nivells de polimorfisme de dades obtingudes a mitjans dels anys 80 amb d'altres de principis dels 60 en una població Suïssa. La conclusió d'aquest estudi és que els ordenaments estàndard dels cromosomes A, J, U i O havien disminuït de freqüència mentre que els ordenaments J_1, $U_{\underline{1+2}}$, $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+8}}$ havien augmentat.

Els estudis a El Pedroso (Rodríguez-Trelles *et al.,* 1996, 1998) també es poden considerar com a llarg termini ja que en comparar les dades obtingudes els anys 1976-1980 amb les dels anys 1988-1991 es va apreciar una disminució dels ordenaments O_{ST} i $O_{\underline{3+4+8}}$, i un augment significatiu de l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$.

Uns resultats semblants van obtenir Orengo and Prevosti (1996) en la comparació de dades de la població de Barcelona en un interval de 29 anys. En general, els ordenaments estàndard havien disminuït mentre que ordenaments típics de poblacions més al sud havien augmentat la seva freqüència.

Més recentment, Balanyà *et al.* (2006) en un estudi on relacionaven diferents factors ambientals com ara la temperatura amb les dades de polimorfisme d'inversions recollides durant els últims 40 anys en 26 poblacions d'Europa, Sud Amèrica i Nord Amèrica, van posar de manifest que el polimorfisme cromosòmic ha anat variant amb el temps i que els ordenaments típicament considerats com *warm-climate* (els que presenten clina S-N) (Menozzi and Krimbas, 1992), han anat augmentant de freqüència a mesura que ha augmentat la temperatura global del planeta. Així doncs, podem considerar la temperatura com a força selectiva en l'adaptació mitjançant el polimorfisme cromosòmic.

Malauradament, en el moment de testar al laboratori aquesta hipòtesi, els resultats obtinguts no han estat definitius. S'ha intentat estudiar el paper de la temperatura en l'adaptació

tèrmica examinant com evolucionaven les freqüències de les inversions cromosòmiques i altres marcadors genètics en poblacions xilenes de *D. subobscura* mantingudes a tres temperatures diferents (13, 18 i 22°C), que comprenen una gran part del rang tèrmic d'aquesta espècie (Santos *et al.*, 2004, 2005). Els resultats varen mostrar que, encara que algunes freqüències d'inversions variaven d'acord a l'esperat, els patrons observats a la natura no sembla que siguin causats només per un efecte directe de la temperatura. De totes maneres, s'ha de tenir en compte que en aquest experiment les mosques es van mantenir a temperatures constants, cosa que no reflecteix exactament el que passa a la natura. Per tant, pot ser que les inversions estiguin afavorides no per la temperatura total, sino per les oscil·lacions tèrmiques que pateixen els individus a les diferents poblacions.

1.4.5. Manteniment de les inversions

Tenint en compte que a *Drosophila* les inversions cromosòmiques paracèntriques inhibeixen la recombinació, tot mantenint les combinacions favorables de gens i no són contra-seleccionades perquè no redueixen la eficàcia biològica, la seva permanència a la població dependrà del seu contingut genètic (Powell, 1997). Així, la presència de complexos de gens en els segments invertits dels cromosomes, adaptatius a diferents condicions ambientals, podrien explicar el ràpid efecte de la selecció natural sobre les inversions i la creació i establiment de les clines latitudinals a les poblacions naturals de *D. subobscura* (Prevosti *et al.*, 1985). Per tant, tot i que sembla clar que a *D. subobscura* les inversions cromosòmiques són adaptatives, encara no se sap amb certesa quin dels mecanismes descrits en la secció 1.2 és el que explica que ho siguin. Descriurem breument els principis de la coadaptació, dels complexos de gens adaptats i la de l'adaptació local ja que són les hipòtesis que comporten un paper selectiu de les inversions.

i. Coadaptació

La hipòtesi de la coadaptació postula que les inversions mantenen un conjunt d'al·lels que interactuen epistàticament entre ells i, a la vegada, amb els al·lels de les altres inversions de la població, donant lloc a la superioritat dels individus heterozigots (Dobzhansky, 1950). L'intercanvi genètic entre inversions cromosòmiques provinents d'altres poblacions desbarataria els complexos d'al·lels coadaptats i produirien descendents amb una eficàcia biològica menor. Els experiments de Dobzhansky (Dobzhansky and Epling, 1948) amb caixes de poblacions van demostrar que a *D. pseudoobscura* cada ordenament cromosòmic d'una població està coadaptat de manera específica amb els ordenaments alternatius de la mateixa

població. A més a més, la recombinació entre cromosomes portadors del mateix ordenament però procedents de poblacions diferents, elimina el caràcter heteròtic de les combinacions heterocariotípiques i per tant, la coadaptació. Així doncs, les inversions cromosòmiques són inhibidors de la recombinació que ajuden a mantenir les relacions epistàtiques dins de poblacions. Per tant, el model de la coadaptació prediu que una mateixa inversió cromosòmica a diferents poblacions tindrà un contingut genètic diferent.

A *D. subobscura* s'ha intentat buscar evidències que recolzessin la teoria de la coadaptació, però sense resultats positius (Krimbas, 1993). Per exemple, els treballs de McFarquhar and Robertson (1963) i de Pentzos-Daponte and Sperlich (1965) en cap cas van trobar heterosis (superioritat dels híbrids) en la F_1 i en la F_2 no varen trobar un trencament dels complexos coadaptats. Tot i amb això, Prevosti (1967) sí que va observar a la F_2 un possible trencament dels complexos coadaptats en referència a la llargada de l'ala encara que tampoc no va trobar superioritat dels híbrids de la F1,

ii. Selecció supergènica

Aquesta teoria, postulada per Wasserman (1968), manté que dins d'un mateix ordenament cromosòmic es poden trobar diferents complexos de gens coadaptats (o supergens). És a dir, que l'homozigositat estructural no implica homozigositat gènica. Així, els individus homocariotípics per a un determinat ordenament (cadascun amb una combinació de gens diferents) presentaran una menor eficàcia biològica que els heterocariotips degut al trencament de les interaccions epistàtiques per recombinació. A diferència de la hipòtesi de la coadaptació, aquestes interaccions es donarien només dins de la inversió, no entre ordenaments.

D'aquesta manera, el valor selectiu d'un determinat supergen dependrà tant de l'ordre dels gens dins el complex (la seqüència dels gens) com dels al·lels particulars que presenta cada gen. Així, la selecció actuarà sobre tota la inversió per tal de perpetuar i incrementar la freqüència d'aquests supergens Wasserman (1968).

Aquesta hipòtesi podria ser la que millor s'ajusta a les dades observades pel cromosoma O de *D. subobscura* ja que en estudis de desequilibri de lligament de les variacions estacionals d'al·loenzims s'han trobat evidències d'interaccions epistàtiques entre loci especialment dins de l'ordenament O_{ST} (Santos, 2009). Però degut a la gran capacitat de dispersió d'aquesta espècie (Ayala *et al.*, 1989) i a la presència d'una clina geogràfica de freqüències per a la

inversió O_{ST}, podria ser que l'explicació a aquest fenomen no fos aquesta hipòtesi. L'explicació alternativa podria ser que per a alguns ordenaments les diferents poblacions geogràfiques es troben diferenciades i que les fluctuacions periòdiques on es barregen les poblacions poden induir canvis cíclics en el desequilibri de lligament que serien deguts a la migració més que no pas a l'epistasi (Santos, 2009).

iii.Adaptació Local

Segons el model de l'adaptació local, en el moment de formació d'una inversió, aquesta retindria tot un conjunt d'al·lels específicament adaptats a les condicions ambientals de la població on es crea.

La inhibició de la recombinació manté intactes els complexos d'al·lels més ben adaptats a les condicions locals i, a més, els estabilitza contra l'intercanvi genètic amb migrants d'altres poblacions o continguts genètics. Així, les inversions estan afavorides (fins i tot sense epistasi) i s'estableixen a les poblacions per mantenir els complexos de gens adaptats. És important remarcar que, tot i que aquest model no requereix d'interaccions epistàtiques, tampoc no les rebutja, ja que els autors proposen que de fet l'epistasi afavoriria l'evolució de les inversions cromosòmiques (Kirkpatrick and Barton, 2006).

Si els gens mantinguts dins de les inversions no interactuen epistàticament, la diferenciació entre ordenaments s'espera que es mantingui només als punts de trencament ja que els dobles recombinants i la conversió gènica en individus heterozigots homogeneïtzaran les regions invertides (Navarro *et al.*, 2000). Per tant, sota l'escenari de l'adaptació local, la mateixa inversió en les diferents poblacions tindrà el mateix contingut genètic sobretot al voltant dels seus punts de trencament.

A *D. subobscura*, en diferents estudis no s'ha trobat diferenciació per a un determinat ordenament del cromosoma O entre dues poblacions geogràficament allunyades (Rozas and Aguadé, 1990; Rozas *et al.*, 1995, 1999). A més a més, també s'ha trobat una gran diferenciació genètica entre diferents ordenaments del cromosoma O (Rozas *et al.*, 1999; Munté *et al.*, 2005; Sánchez-Gracia and Rozas, 2011), cosa que suggereix que el model de l'adaptació local seria el més adequat per explicar el manteniment del polimorfisme d'aquest cromosoma.

1.4.6. Marcadors moleculars disponibles

Per tal de poder determinar quina de les tres hipòtesis pel manteniment de les inversions a les poblacions és la que millor explica el polimorfisme cromosòmic de *D. subobscura*, en el presenten treball s'analitzarà el contingut genètic de les inversions mitjançant diferents marcadors moleculars en múltiples poblacions europees distribuïdes latitudinalment. En una primera aproximació, s'utilitzaran loci microsatèl·lits localitzats al llarg del cromosoma O per estudiar la variabilitat gènica global dels tres ordenaments més freqüents a Europa. Posteriorment es seqüenciaran gens candidats per a l'adaptació tèrmica situats dins i fóra d'una inversió típica del Sud d'Europa. Finalment, per als dos ordenaments que presenten una clina latitudinal més marcada ($O_{\underline{3+4}}$ i O_{ST}) s'analitzaran diferències en l'expressió de la Hsp70 i la relació amb la seva tolerància tèrmica.

i. Microstatèl·lits

Els microsatèl·lits són uns marcadors moleculars altament polimòrfics formats per repeticions en tàndem d'unes poques bases (des d'un fins a sis nucleòtids). Tot i que es distribueixen per tot el genoma són més freqüents a les zones no codificadores. Per tant, com que en principi no estan sotmesos a la selecció natural, aquests marcadors codominants es consideren neutres i s'han utilitzant àmpliament per a estudiar la dinàmica dels processos evolutius (Goldstein and Schlötterer, 1999).

Per a *D. subobscura* han estat descrits Un total de 96 loci microsatèl·lits dinucleòtids (Pascual *et al.*, 2000), dels quals 72 han estat localitzats citològicament (Santos *et al.*, 2010). De la seva localització, es va observar que es distribueixen per tots els cromosomes acrocèntrics, tot i que són més freqüents en el cromosoma A (que és el sexual).

Aquests marcadors han servit per a obtenir el mapa genètic del cromosoma O (Pegueroles *et al.,* 2010a), obtenir nivells de recombinació en individus heterocariotípics per aquest cromosoma (Pegueroles *et al*., 2010b), inferir el procés de colonització del nou món (Pascual *et al.*, 2001, 2007) i per a estudiar la dinàmica de l'adaptació a les condicions de laboratori (Simões *et al.*, 2008, 2010).

ii. Gens candidats

Com ja s'ha comentat anteriorment, una de les maneres de buscar gens candidats a l'adaptació és per comparació dels patrons d'expressió gènica dels organismes a diferents condicions. Per tal de trobar gens candidats a l'adaptació tèrmica a *D. subobscura*, es van analitzar els patrons d'expressió gènica a diferents temperatures mitjançant un *microarray* desenvolupat per a *D. melanogaster* (Laayouni *et al.*, 2007). Els resultats de la comparació entre les condicions de temperatura baixa (13°C) i alta (22°C) varen mostrar que un total de 306 (6.6%) dels gens analitzats s'expressaven diferencialment, dels quals 80 es troben en el cromosoma O. Entre els possibles candidats, es van trobar gens que ja s'havien descrit anteriorment com a gens candidats per a la termotolerància a *Drosophila*, com ara gens de la família de les *hsp*, el gen *Fst* o el *Treh*. A més a més, en el mateix estudi es van localitzar físicament un total de 88 gens mitjançant localitzacions *'in situ'* i es va poder observar que un nombre major a l'esperat es troben localitzats dins de les regions invertides dels cromosomes.

iii. Les heat shock proteins

La resposta al xoc tèrmic es dóna mitjançant la producció de les proteïnes de xoc tèrmic. A *D. subobscura*, un dels primers treballs per analitzar aquesta resposta i veure quins eren els gens que s'activaven, va ser el dut a terme per Moltó *et al.,* (1992). En el seu treball, varen realitzar un xoc tèrmic en individus en estat de prepupa i després, mitjançant l'anàlisi dels cromosomes politènics, varen estudiar el patró de *puffs* resultant. Els *puffs* són àrees on el cromosoma politènic es veu com inflat, ja que el material genètic es troba en un estat més laxe per facilitar que es pugui transcriure l'RNA. Així doncs, els *puffs* mostren on hi ha activitat gènica i per tant, l'aparició de *puffs* després d'un xoc tèrmic mostrarà on estan situats els gens que codifiquen per a les Hsps. Posteriorment, per comprovar a què equivalia cada *puff*, es van hibridar amb sondes de melanogaster i d'aquesta manera varen localitzar els gens de les principals proteïnes de xoc tèrmic a *D. subobscura*. Així doncs, van descriure un total de 8 *puffs*, que corresponen als gens de les Hsp i que es localitzen en 3 dels 5 autosomes (en el cromosoma sexual i en els cromosomes J i O).

En el cromosoma O es troben els dos gens de la família de les Hsp70s: *hsp70* i *hsp68* (Moltó *et al.,* 1992; Cuenca *et al.* 1998). El gen *hsp70* es localitza en la secció 94A del cromosoma, a la regió I. Aquesta regió té descrites diferents inversions, i el gen es troba molt a prop del seu punt de trencament fent que la posició final del gen respecte del centròmer depengui de l'ordenament del cromosoma (Figura 1.10).

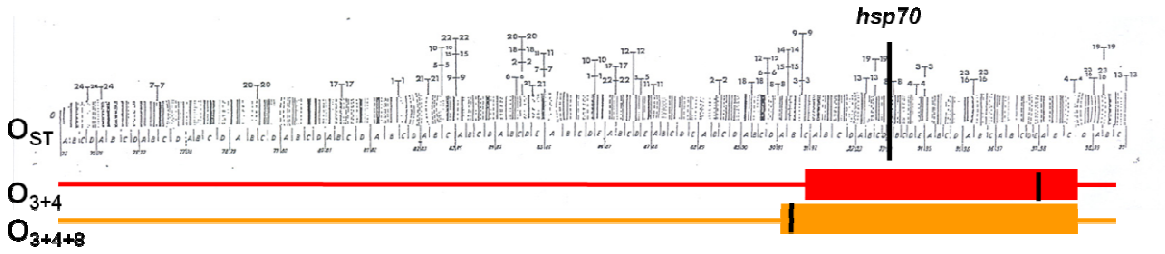


Figura 1.10: Posició del gen *hsp70* en diferents ordenaments cromosòmics.

1.4.7. La hipòtesi de la coadaptació tèrmica a Drosophila subobscura

Recentment, per a *Drosophila subobscura* s'han trobat algunes associacions entre caràcters tèrmics i les inversions. Rego *et al.* (2010) van estudiar la relació entre diferents paràmetres associats amb el comportament tèrmic - com ara la termopreferència i la termotolerància- i els ordenaments cromosòmics. Van veure que la termopreferencia que depèn del nombre d'ordenaments estàndard (dosi d'estàndard) i que els cromosomes que més hi contribueixen són l'A i l'O, mentre que la resistència tèrmica, calculada amb la T_{KO} (temperatura de *knock down*: temperatura màxima que suporta l'individu abans de perdre la mobilitat) també depèn de la dosi d'estàndard, però amb una contribució més elevada del cromosoma E. A més, en considerar tots els ordenaments, van trobar que les mosques portadores d'ordenaments "freds" (aquells que mostren correlació positiva amb la latitud; Balanyà *et al.*, 2003) prefereixen temperatures menors i presenten una termotolerància menor que els portadors d'ordenaments "càlids" (Rego *et al.*, 2010). Aquests resultats van fer que el nostre grup es plantegés avaluar la hipòtesi de la co-adaptació tèrmica (Dolgova *et al.*, 2010); és a dir, que el comportament (preferència tèrmica) dirigeix l'evolució en noves direccions i pot accelerar l'adaptació fisiològica (termotolerància) (Huey and Bennett, 1987; Angilletta, 2009).

Per tal de provar la hipòtesi de la coadaptació, ens varen centrar en el cromosoma O ja que en la regió I presenta ordenaments amb clines de freqüència oposades. A més, aquest cromosoma està associat amb la termopreferencia (Rego *et al.*, 2010) i en ell estan localitzats alguns gens *hsps*. Finalment, els ordenaments $O_{\underline{3+4}}$ (càlid) i O_{ST} (fred) presenten una gran diferenciació gènica en la regió de la inversió imbricada 3+4 (Munté *et al.*, 2005). Per tant, vam analitzar si aquests ordenaments mantenen un conjunt de combinacions al·lèliques diferents per a la preferència tèrmica i la termotolerància que generarien una correlació genètica positiva entre aquests dos trets, en línia amb les prediccions de la hipòtesi de la coadaptació

tèrmica. La nostra expectativa era que les mosques mostrarien una termopreferencia i una termotolerància d'acord a la seva constitució genètica del cromosoma O i, alhora, relacionada amb els patrons clinals de les inversions. Però tot i que vam ser capaços de replicar els resultats de Rego *et al.* (2010) pel que fa a la termopreferencia, no vàrem detectar cap diferència entre els dos ordenaments en la termotolerància (Dolgova *et al.*, 2010; veure annex). Per tant, es va concloure que qualsevol correlació entre aquests trets al llarg de les clines latitudinals reflectien un patró de selecció correlacionada en comptes d'una correlació genètica (Dolgova *et al.*, 2010).

Tenint en compte que el polimorfisme per inversions en els altres cromosomes associats amb la termotolerància sí que mostraven una variació clinal en la direcció esperada (Rego *et al.* 2010), no queda clar per què en el nostre experiment els diferents ordenaments no tenen cap efecte en la termotolerància. Creiem que poden haver tres possibles explicacions. En primer lloc, podria ser que no hi ha hagi suficient diferenciació pel gen *Hsp*70 entre els ordenaments $O_{\underline{3+4}}$ i O_{ST}. Segon, en cas que hi hagi diferenciació gènica, podria ser que no existeixi cap relació entre els nivells de Hsp70 i la termotolerància en adults de *D. subobscura*, com s'ha demostrat que és el cas de *D. melanogaster* (Jensen *et al.*, 2010). I per últim, podria ser que les mosques portadores de diferents ordenaments cromosòmics presentin una plasticitat fenotípica diferent, donant lloc a patrons estranys entre la termotolèrancia basal i la induïda (Rezende, *et al.*, 2011). Per tant, la manca d'evidències a favor de la hipòtesi de la coadaptació tèrmica en el treball de Dolgova *et al.*, (2010) podria ser causada per una avaluació inadequada dels beneficis d'una inducció de la termotolerància en condicions extremes (Loeschcke and Hoffmann, 2007).

2. OBJECTIUS

L'Objectiu principal d'aquest treball ha estat investigar i determinar quin és el paper de les inversions cromosòmiques en l'adaptació de *Drosophila subobscura* a l'ambient.

Per tal de discriminar entre les diferents hipòtesis de partida, es va analitzar si el contingut genètic de les inversions és uniforme o no en les diferents poblacions, tot utilitzant diferents marcadors moleculars, com ara *loci* microsatèl·lits i gens candidats a l'adaptació tèrmica. A més a més, a nivell intrapoblacional, s'ha estudiat la relació de les diferents inversions cromosòmiques amb la termotolerància i la resposta a l'estrès tèrmic dels individus.

Per tal d'assolir l'objectiu principal es van establir el següents objectius específics:

1. Seleccionar i mostrejar un total de 7 poblacions europees situades en gradient latitudinal intentant abastar tota l'àrea de distribució de Drosophila subobscura amb especial atenció en la Península Ibèrica. Algunes de les poblacions havien estat prèviament analitzades i per tant el mostreig es va realitzar aproximadament a les mateixes dates per tal d'evitar possibles efectes de la variació estacional.

2. Descriure i analitzar la composició de Drosofílids a cadascuna de les set poblacions.

3. Caracteritzar les poblacions mitjançant el polimorfisme cromosòmic del cromosoma O i comparar les freqüències d'inversions i ordenaments obtingudes amb les mostres estudiades en anys anteriors.

4. Estudiar la variació en l'espai del polimorfisme cromosòmic pels ordenaments més freqüents a Europa per tal de comprovar l'existència de clines latitudinals.

5. Analitzar el contingut genètic de 4 ordenaments cromosòmics ($O_{\underline{3+4}}$, O_{ST}, $O_{\underline{3+4+8}}$ i $O_{\underline{3+4+7}}$), mitjançant 13 loci microsatèl·lits per tal d'estudiar si existeixen diferències en el contingut genètic entre ordenaments dins de la mateixa població o bé entre el mateix ordenament a les diferents poblacions.
6. Estudiar els patrons de desequilibri de lligament (LD) entre al·lels microsatèl·lits i les inversions per determinar la presència de diferents combinacions d'al·lels en les diferents inversions.

7. Per a les poblacions Ibèriques, estudiar les diferències en el contingut genètic entre els ordenaments $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+7}}$ mitjançant l'anàlisi de 4 gens candidats a l'adaptació tèrmica (*Fst, Sqd, Yrt* i *Atpα*) localitzats dins i fóra de la inversió O_7.

8. Analitzar si els ordenaments "càlid" ($O_{\underline{3+4}}$) i el "fred" (O_{ST}) mostren una diferent expressió de proteïna Hsp70 després d'un xoc tèrmic.

9. Determinar si existeixen diferències en la termotolerancia entre individus portadors de diferents ordenaments cromosòmics.

10. Relacionar els resultats dels patrons d'expressió de la Hsp70 i els de termotolerància amb els disponibles per la termopreferencia d'aquesta espècie per tal de discutir si aquests trets estan relacionats de manera que la hipòtesi de la coadaptació tèrmica es dóna a Drosophila subobscura.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. *Poblacions analitzades*

En aquest estudi es va analitzar la variabilitat genètica del cromosoma O al llarg d'una clina latitudinal a Europa. A més a més, com a part d'un estudi a llarg termini de la variabilitat cromosòmica de *D. subobscura*, es va intentar triar poblacions que ja havien estat mostrejades anys enrere. Les set localitats mostrejades van ser: Barcelona, Málaga, València i Rasquera (Espanya), Montpellier i Dijon (França), i Groningen (Països Baixos) (Figura 3.1). Les poblacions van ser mostrejades en tres anys consecutius, essent Barcelona la primera l'any 2007 i la darrera Montpellier l'any 2009 (Taula 3.1).

Breu descripció de les localitats triades:



Barcelona (Espanya): Mostra capturada al Parc Natural de Collserola, al costat de la ciutat de Barcelona. El punt de mostreig triat va ser la Font Groga, una zona del parc molt ben conservada, ombrívola, amb vegetació típica mediterrània formada de bosc de pins (*Pinus pinea*) amb algunes alzines (*Quercus ilex*) i sotabosc mediterrani (*Quercus coccifera, Buxus sempervirens*, etc.). La captura es va realitzar els dies 23, 24 i 29 d'Octubre de 2007.



Málaga (Espanya): La població de Málaga va ser capturada en uns vivers abandonats pertanyents a l'INFOCA (Centro Operativo Provincial de Lucha contra Incendios Forestales, de la Junta de Andalucía), a la N-340 entre Málaga i Torremolinos. La vegetació estava composada bàsicament per pins (*Pinus pinea*), alzines (*Quercus ilex*) i eucaliptus (*Eucalyptus camaldulensis).* Captura realitzada el 20 d'Octubre de 2008.



<u>València (Espanya)</u>: Població mostrejada en un bosc als afores de l'àrea residencial de la Canyada, format bàsicament per pins (*Pinus pinea*). Es va intentar repetir la captura feta a Riba-Roja l'any 1998, però el canyissar de la llera del riu estava completament destrossat per una crescuda recent. Mostra obtinguda el 23 d'Octubre de 2008.



<u>Rasquera (Espanya)</u>: Població mostrejada en una taca de bosc situat al km 11 de la carretera entre El Perelló i Rasquera. El bosc estava format per pins (*Pinus pinea*) i el seu sotabosc corresponent (*Rubus sp*.). La captura es va realitzar el 25 d'Octubre de 2008.



<u>Montpellier (França)</u>: Mostra capturada al Parc de Mas Prunet, un parc urbà del segle XVIII de 9000 m2. Estava format per arbres caducifolis i perennes. La captura es va realitzar l'1 setembre de 2009.



<u>Dijon</u> <u>(França)</u>: La captura es va realitzar al Parc de la Colombière, el parc més gran de Dijon I creat al segle XVI i restaurat en 1978, format tant d'arbres caducifolis com perennes. Es va realitzar el 27 d'Agost de 2009.



<u>Groningen, (Països Baixos)</u>: Mostra capturada al parc Noorderplantsoen, un parc d'estil jardí anglès situat a l'àrea de les antigues fortificacions de la ciutat. Les trampes es van col·locar a prop del llac el 30 d'Agost de 2009.

Taula 3.1: Taula amb les localitzacions geogràfiques i data de col·lecció de les mostres

POBLACIÓ	DATA COL·LECCIÓ	LATITUD	LONGITUD	NOMBRE INDIVIDUS
Groningen (Països Baixos)	30/08/2009	53° 13’ N	6° 33’ E	**152**
Dijon (França)	27/08/2009	47° 18’ N	5° 02’ E	**148**
Montpellier (França)	01/09/2009	43° 35’ N	3° 49’ E	**141**
Barcelona (Espanya)	23-29/10/2007	41° 25’ N	2° 05’ E	**286**
Rasquera (Spain)	25/10/2008	40° 57’ N	0° 38’ E	**120**
València (Spain)	23/10/2008	39° 32’ N	0° 29’ O	**102**
Málaga (Espanya)	20/10/2008	36° 43’ N	4° 25’ O	**125**



Figura 3.1: Mapa d’Europa amb les set poblacions mostrejades al llarg d’una clina latitudinal.

3.1.1. *Recol·lecció de les mostres*

Per capturar les mosques salvatges es van utilitzar trampes de plàtan fermentat. La preparació de l’esquer és senzilla, només cal posar en un recipient el plàtan tallat a trossos petits amb la pell i tot, amb llevat sec barrejat (Monclús, 1964) ja que l’olor que desprèn és molt atraient per a aquests dípters. A cada lloc de captura es van posar entre 10-15 trampes separades entre sí per uns 10 metres. Un cop col·locades, es varen deixar durant una hora abans de la primera ronda de captura i cada mitja hora es van anar buidant mitjançant una mànega de captura.

Al camp mateix, es va fer la primera tria de drosofílids capturats, les femelles de D*. subobscura* es van posar en tubs individuals per tal de fundar línies isofemelles i els mascles es van guardar

en pots amb medi de cultiu fins a l'arribada al laboratori, on es van fer els encreuaments. La resta de drosofílids, es va guardar en etanol al 70% per la seva posterior classificació al laboratori, per tal de conèixer la diversitat d'espècies de cada indret de captura.

Un cop al laboratori, tant els mascles salvatges com els mascles descendents d'una femella salvatge es van encreuar individualment amb 3-4 femelles verges de la soca *chcu* (Koske and Maynard Smith, 1954) (Figura 3.2). Aquesta és una soca mutant de laboratori que porta els marcadors recessius *cherry* (ulls de color cirera) i *curled* (ales corbades) situats al cromosoma O i que és homocariotípica pels ordenaments A_{ST}, E_{ST}, U_{ST}, J_{ST} i $O_{\underline{3+4}}$ (Lankinen and Pinsker, 1977).

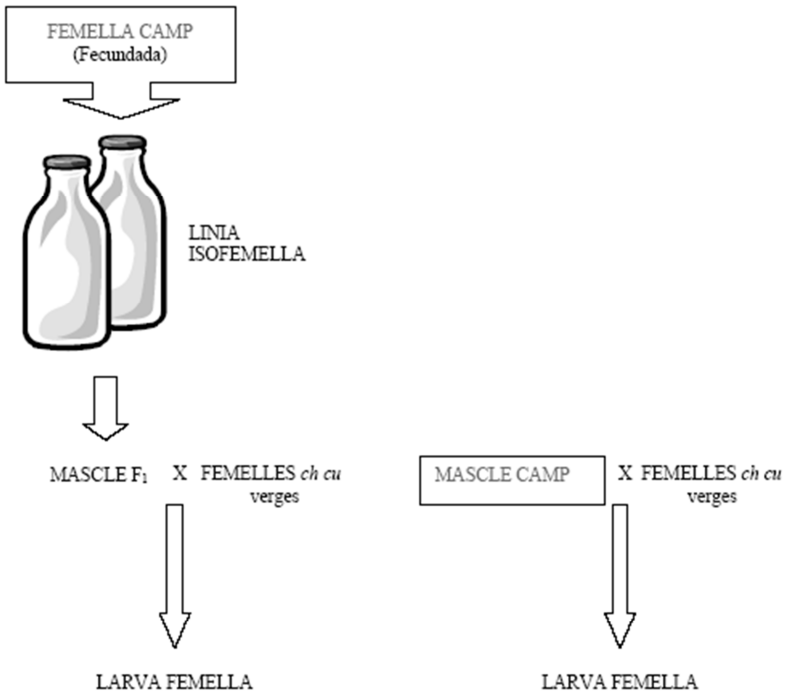


Figura 3.2: Esquema de la metodologia emprada per fundar les línies d'estudi, així com el encreuament per poder fer les preparacions dels cromosomes politènics.

3.1.2. Identificació del polimorfisme cromosòmic i obtenció de les línies isocromosòmiques

El polimorfisme cromosòmic de cada població es va determinar realitzant una preparació de cromosomes politènics de les glàndules salivals de larves femelles de tercer estadi descendents de cadascun dels anteriors encreuaments. La determinació del sexe de les larves es va fer mitjançant la visualització per transparència dels òrgans sexuals. En aquesta fase larvària, cap a l'últim terç del cos es veuen uns cossos translúcids que són els precursors dels

òrgans sexuals. En el cas de les femelles, aquests cossos són de mida força inferior als dels mascles. Es varen triar larves femelles perquè d'aquesta manera ens assegurem que a l'observar el cromosoma A dels seus cromosomes politènics estem veient també el cromosoma del camp.

La dissecció de les larves es va realitzar sobre un portaobjectes amb un parell de gotes de solució salina al 0'9%, sota una lupa binocular 40X. El procediment és el següent: la larva se subjecta amb unes pinces i amb unes altres pinces de punta molt fina s'agafen les mandíbules i s'estiren per extreure les glàndules salivals, que es troben unides a les mandíbules mitjançant els conductes salivals. Amb unes agulles entomològiques, es netegen al màxim possible de greix. En un portaobjectes nou, posem una gota d'orceïna acètico-làctica (50% orceïna acètica al 2%, 50% àcid làctic) i hi afegim les glàndules salivals, tot deixant-les tenyir durant trenta minuts. Al cap de la mitja hora, cobrim amb un cobreobjectes i realitzem *l'squash* (aixafament) de les glàndules, que permet que els cromosomes s'estenguin i fixin bé a la preparació. Finalment, el cos de la larva, es va conservar en alcohol absolut a -80°C fins a la seva utilització en el genotipat de la població mitjançant microsatèl·lits. Les preparacions dels cromosomes politènics s'observaren al microscopi òptic amb contrast de fases.

Tant per a la seqüenciació de gens candidats com per a l'experiment de termotolerància, es van haver d'obtenir cromosomes del camp en condició isocromosòmica. És a dir, individus homocariotípics que presentin dues còpies idèntiques per descendència del cromosoma salvatge. Es van obtenir línies isocromosòmiques per a les poblacions de Màlaga, València i Barcelona. Per a la població de Barcelona, a més, es va uniformitzar el fons genètic abans d'obtenir les línies isocromosòmiques. Breument, el patró de encreuaments seguit a cada població va ser el següent:

Barcelona: Els mascles salvatges o els mascles descendents d'una femella salvatge es van encreuar individualment amb 3-4 femelles verges de la soca mutant *chcu*. De la descendència resultant es va triar un mascle i es va encreuar de nou amb 3-4 femelles verges *chcu*, i 8 larves de la descendència van ser utilitzades per determinar l'ordenació del cromosoma O. Per tal d'uniformitzar els fons genètic de les línies, es van realitzar 3 encreuament recurrents amb 1 mascle de fenotip normal de la descendència i 3-4 femelles verges *chcu*. Al final d'aquests encreuaments, tots els individus són heterozigots pel cromosoma O, amb 1 cromosoma provinent del camp i l'altre de la soca *chcu*. Per obtenir les línies en homozigosi, es va utilitzar la soca de letals equilibrats *Va/Ba* (*Varicose*: engruiximents irregulars en les interseccions de

les venes alars; *Bare*: reducció en el nombre de micro i macro quetes; (Sperlich *et al.*, 1977), que es va crear a partir de la soca *chcu*. De cada línia, es va agafar un únic mascle i es va encreuar amb 3-4 femelles verges *Va/Ba.* De la descendència d'aquest encreuament es trien mascles i femelles de fenotip *Varicose* i s'encreuen entre elles (Figura 3.3). Com que el gen *Varicose* en homozigosi és letal, de la descendència d'aquest encreuament obtindrem les línies homocariotípiques. És en aquest punt del procés on podrem veure també quines de les nostres línies porten mutants letals (ja que no obtindran descendència), semiletals o bé mutants estructurals. No es va utilitzar el marcador *Bare* ja que la seva expressió està altament afectada per modificadors localitzats en el cromosoma O (Álvarez *et al.*, 1990) i de vegades costa visualitzar correctament el fenotip d'interès.

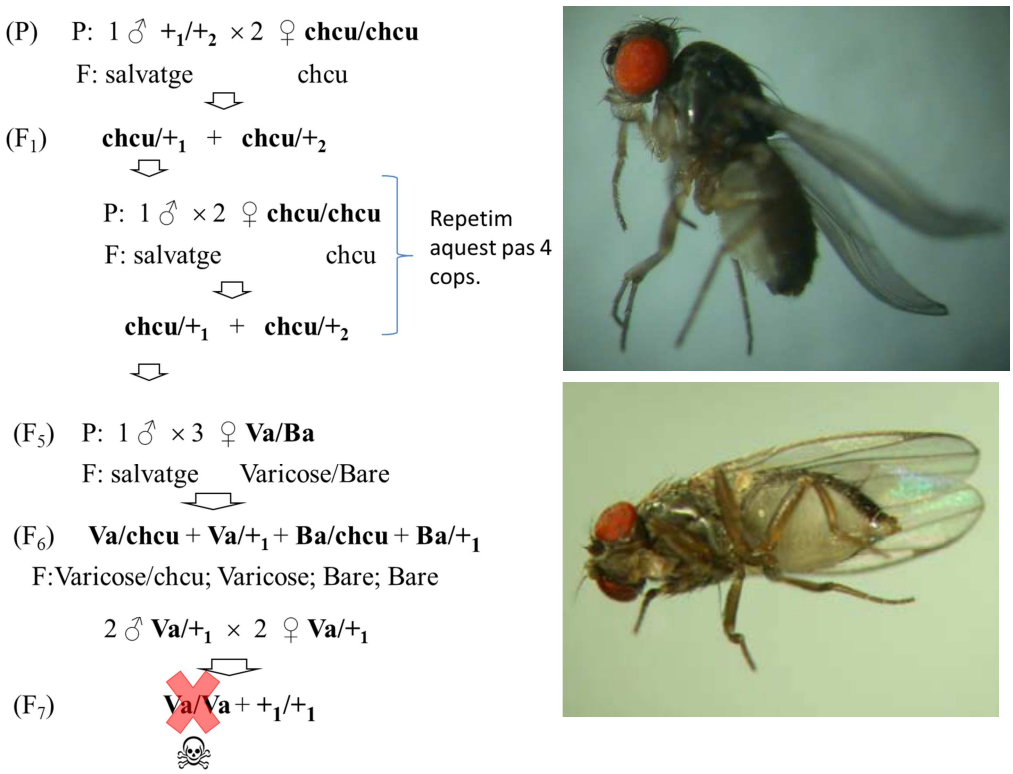


Figura 3.3: A l'esquerra, esquema dels encreuaments realitzats per obtenir el cromosoma del camp en homocariosi. El genotip $+_1/+_2$ indica la combinació cromosòmica inicial del cromosoma del camp. A la dreta, es poden observar les dues soques mutants de laboratori utilitzades en el patró de encreuaments. A dalt, un mascle de la soca *chcu* amb els ulls vermell brillant i les ales corbades cap amunt. A sota, femella de la soca *Va/Ba* on es veuen els engruiximents de les venes a l'extrem de les ales.

Com que el cromosoma *Varicose* presenta l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$, si el cromosoma del camp també presents aquest ordenament, hi ha possibilitat de recombinació en aquesta regió. Per detectar els individus recombinants, es van genotipar amb microsatèl·lits i les línies recombinants van ser descartades per a les anàlisis.

Málaga, València i Rasquera: Per a aquestes poblacions tan sols es van obtenir línies homocariotípiques però sense el fons genètic uniformitzat amb la soca mutant *chcu*. Per tant, del patró descrit anteriorment, tan sols es va fer un encreuament amb la soca *chcu* i directament es va passar a l'encreuament amb la soca *Va/Ba.*

Un cop obtingudes les línies isocromosòmiques, es van mantenir a 18°C en flascons de vidre amb 130 mL de medi de cultiu i a densitat controlada. A l'interior del flascó s'afegia també un paper plegat impregnat d'acaricida, per proporcionar una superfície seca on les larves puguin pupar i evitar la proliferació dels àcars. Cada línia es va mantenir en 5 flascons escalonats cada 7 dies, de manera que es disposava dels individus a cada fase del desenvolupament en tot moment. A més, de cada línia es van guardar individus en alcohol que es van mantenir a -20°C.

3.1.3 Anàlisi de dades

3.1.3.1. Anàlisi de la diversitat d'espècies de les poblacions capturades

La classificació de les espècies es va dur a terme utilitzant les claus de Burla (1951). Amb els resultats es va calcular per a cada població:

- **Riquesa d'espècies:** Es mesura com el nombre total d'espècies presents en una població. El problema es que depèn del nombre d'individus capturats, ja que en mostres més petites esperem trobar només les espècies més freqüents, mentre que les espècies més rares només les obtindrem si la mostra és més gran. Això dificulta la comparació de mostres de diferent grandària.
- **Índex de diversitat de Shannon:** La diversitat d'una població no depèn tan sols del nombre d'espècies sinó també de l'abundància relativa de cadascuna d'elles. Per tal de calcular la diversitat, apliquem l'índex de Shannon amb la següent fórmula:

$$H' = -\sum_{i=1}^{S} p_i \ln p_i$$

on p_i és la probabilitat que un individu pertanyi a l'espècie i (la freqüència de l'espècie i a la població); i S és el nombre d'espècies presents a la mostra. Aquest índex presenta valors alts si tenim moltes espècies de freqüències similars i baix si tenim poques espècies distribuïdes irregularment. Aquest índex ens aporta molta informació i té en compte les espècies poc freqüents.

- **Índex d'uniformitat de Shannon:** Aquest paràmetre permet saber si la distribució de les espècies és uniforme, o bé si tenim una espècie molt més abundant que les altres. Es calcula com:

$$J = \frac{H'}{\mathrm{LN}\, S}$$

on es corregeix l'índex de Shannon pel logaritme neperià de la riquesa d'espècies.

3.1.3.2. Anàlisi del polimorfisme cromosòmic

Amb el programa Fstat (Goudet, 1995) es van calcular els paràmetres de diversitat cromosòmica com ara la heterozigositat i la riquesa al·lèlica. En aquest cas, s'ha considerat com a marcador el cromosoma i els diferents ordenaments cromosòmics són els diferents al·lels del marcador.

Es va analitzar si hi havia diferències significatives entre el polimorfisme cromosòmic obtingut en les captures amb el de mostres antigues de les mateixes localitats mitjançant una prova d'homogeneïtat.
Per determinar si les freqüències d'alguns ordenaments presentaven una variació en clina latitudinal de, es van calcular els coeficients de regressió de les freqüències normalitzades dels diferents ordenaments respecte a la latitud. Al tractar-se de freqüències, les dades es van normalitzar tot calculant l'$\arcsin \sqrt{p}$, on p és la freqüència de l'ordenament.

3.2. *Extracció de DNA*

Dos mètodes d'extracció de DNA van ser emprats, depenent de l'anàlisi a realitzar. Per l'anàlisi mitjançant microsatèl·lits, es va extreure el DNA a partir del cos de les larves de les que es va obtenir el polimorfisme cromosòmic. Com que es partia de poc material, es va optar per utilitzar el protocol d'extracció descrit a Pascual *et al.,* (1997). Així, les larves emmagatzemades a -80°C es van rehidratar amb TE (TrisHCl 10mM, EDTA 1mM; pH 8) durant tota la nit a 4°C com a pas previ a l'extracció. Cada larva es va homogeneïtzar en un microtub amb 160 µl de DISSOLUCIÓ I (Tris 10mM, NaCl 60mM, sacarosa 5%, EDTA 10mM, pH 7.8) freda amb una punta blava amb l'extrem segellat. Seguidament es van afegir 200 µl de DISSOLUCIÓ II (Tris 300mM, SDS 1.25%, sacarosa 5%, EDTA 10mM, pH 8), i es va agitar l'homogenat per inversió diverses vegades abans de deixar-ho incubar a 65°C durant 30 minuts. Posteriorment es va afegir 60 µl d'acetat potàssic 3M, pH 5, i després d'agitar per inversió, el tub es va refredar mantenint-lo a -20°C durant 20 minuts. Després, es centrifugaren les mostres durant 15 minuts

a ~12.000 rpm. Després de la centrifugació, el sobrenedant es transferia a un nou microtub i se li afegia el mateix volum d'isopropanol, i la mostra es deixava incubar durant 5 minuts a temperatura ambient, abans de fer una centrifugació de 10 minuts. Després de la centrifugació, el sobrenedant es descartava i el pelet es rentava amb 500 µl d'etanol al 70% en una centrifugació d'entre 3-4 minuts. Finalment, es descartava el sobrenedant i es deixaven assecar les mostres sota la campana abans de resuspendre el pelet en 50 µl d'aigua destil·lada estèril (Aqua B Braun).

Per l'anàlisi de seqüències de gens candidats es van haver d'obtenir línies homocariotípiques per tal de no tenir problemes de dobles pics a les seqüències. Un cop obtingudes les línies homocariotípiques, entre 50 i 100 individus de cada línia es van conservar en alcohol a -20°C. En aquest cas, com que hi havia la possibilitat de repetir l'extracció de DNA, es va optar per un altre mètode molt més ràpid, descrit a (Gloor *et al.*, 1993). És un mètode per extreure el DNA a partir d'un individu i, encara que s'obté un DNA menys purificat, és suficient per a l'anàlisi. Breument, en aquest protocol a cada individu se li havien d'afegir 50µl d'*Squishing buffer* (TrisCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 25mM, pH 8.2; amb 200 µg/ml de proteinasa K) i s'homogeneïtzava amb una punta blava segellada. Es deixava incubar durant 30 minuts a temperatura ambient i posteriorment s'inactivava l'acció de l'enzim amb un xoc tèrmic de 95°C durant dos minuts. Finalment, es feia una centrifugació ràpida i el sobrenedant (DNA en concentració d'aproximament 100pg/ml) es transferia a un tub nou.

3.3. *Loci microsatèl·lits del cromosoma O*

Per a l'estudi de la variabilitat del cromosoma O a nivell de loci microsatèl·lits, es van triar els 4 ordenaments més freqüents a Europa (Figura 3.4). El nombre d'individus genotipats per a cada ordenament en cada població es mostren a la Taula 3.2. Un total de 13 microsatèl·lits del cromosoma O de *D. subobscura* prèviament aïllats (Pascual *et al.,* 2000) i localitzats per hibridacions in situ en el cromosoma O (Santos *et al.,* 2010) van ser amplificats (Taula 3.3) utilitzant els encebadors descrits a treballs previs (Pegueroles *et al.,* 2010a).

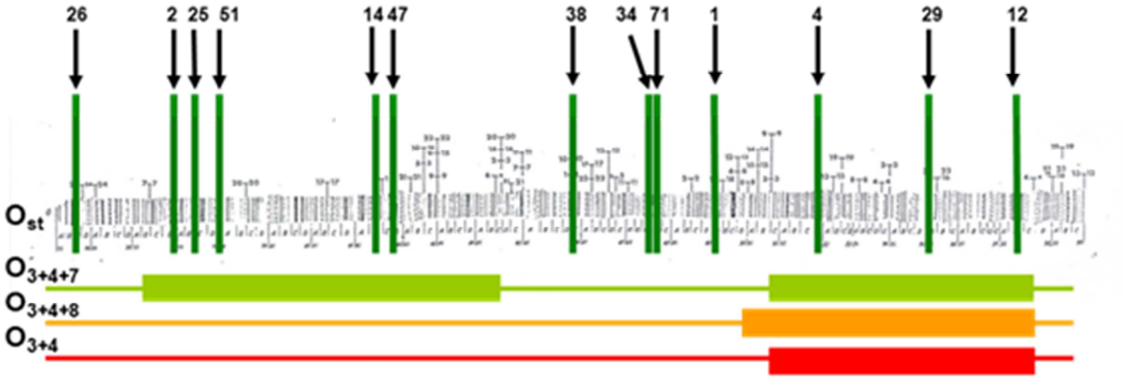


Figura 3.4: Localització dels 13 microsatèl·lits estudiats en relació a l'ordenament O_{ST}. A sota, representació dels altres quatre ordenaments estudiats. Les caixes de color representen el fragment invertit en relació a l'ordenament O_{ST}.

Taula 3.2: Nombre d'individus analitzats de cada població. En el moment d'obtenir la mostra, es va procurar tenir un nombre elevat d'individus de cada ordenament, independentment de la freqüència de l'ordenament a la població. En el cas de l'ordenament O_{3+4+7}, aquest no es presenta a les poblacions del Nord d'Europa.

	O_{ST}	O_{3+4}	O_{3+4+8}	O_{3+4+7}
Groningen	30	30	30	-
Dijon	30	30	30	-
Montpellier	30	30	30	-
Barcelona	30	30	30	16
Rasquera	15	30	25	30
València	5	29	14	30
Málaga	10	30	11	30

3.3.1. *Amplificació dels microsatèl·lits*

Els 13 marcadors no es van amplificar individualment sinó que es van agrupar segons mida i fluorocrom en un total de 3 reaccions *multiplex* (Taula 3.3). Les amplificacions es van dur a terme amb el *Qiagen Multiplex amplification kit* en un volum total d'amplificació de 15 µl, amb 7.4 µl de *Master Mix* del *Kit* (solució amb la Taq polimerasa i els tampons necessaris), 1.5µl de primer mix (amb cada parella d'encebadors en concentració 2 µM), 5'1 µl d'aigua ecoLab i 1µl de solució de DNA. Les condicions d'amplificació van ser: un primer pas de 15 min a 95°C per a la desnaturalització inicial, seguit de 30 cicles de 30 s a 94°C, 90 s a la temperatura d'anellament requerida (Taula 3.3) i 60 s a 72°C, i un pas d'extensió final de 30 min a 60°C. En alguns casos, els *loci* dsub26 i dsub38 van ser amplificats individualment degut a problemes amb la *multiplex*. L'amplificació individual es va fer en un volum final de 25 µl amb 2.5 µl de

buffer 10X, 3 µl dNTPs, 0.2 µl Taq polimerasa, 0.5 µl de cada encebador (10 mM), 16.3 µl d'aigua i 1 µl de DNA, i les mateixes condicions d'amplificació.

Taula 3.3: Encebadors i característiques dels 13 marcadors microsatèl·lits utilitzats en l'estudi.

Marcador	Localització citològica	Encebadors (F, R; 5'-3')	Fluorocrom	T°C Anellament	Multiplex	Rang (bp)	Al·lel ch-cu (bp)
dsub26	75B	GCAGGTCGGTACCTGTCAAT ATTTGCAGTGGCTACCCCTA	6-FAM	54°C	A	420-495	440
dsub02	78A	CCAGGTACGTGTCACACAGG TGACAAAAAGGACAACCTTCG	6-FAM	54°C	A	209 - 271	232
dsub25	78C	TCGCGTCTTGTGTCTAAGGA GGCAGCAGAGGAACTACCTG	HEX	54°C	A	240-323	254
dsub51	79A	GTAAGAATGGGCAAGCGAAT TTGAAGCAGGTCAGACGATG	6-FAM	50°C	B2	380-446	399
dsub14	82C	CAACAGCATCTTGAGAAAAG GTCAACCCTTTGACCAAT	HEX	54°C	A	95-126	103
dsub47	82D-83A	AGTGGCCCCAAAAATAGTCA GCATTTTATGTTGCCCCATT	HEX	50°C	B1	119-200	144
dsub38	86E	ATCCCAATACCCCTGGTAGC TTCCATTAAGGCCCACTCAC	HEX	50°C	B1	390-470	417
dsub34	88B	AGTCCCTCGGGTATGACTGA CGAGCAGTGTACGCAGGTTA	6-FAM	54°C	A	100-170	117
dsub71	88C	TAGCTCAATGGCCAGCTCTT CCAAGGCGCTCAAGATAGAC	NED	54°C	A	249-325	258
dsub01	90A	CCAGAGCACTCGTGTAAGCA ACGTTTTGTCTTTCGCTGGT	HEX	50°C	B2	254-289	263
dsub04	92D	GCACTTGAAGTCTTGTGGCA TTGACGACTTCATGCTCAGG	6-FAM	50°C	B2	176-240	197
dsub29	96A-B	TTTGTTTCGCCTTTCCATTC TTCATGCGGTTTTCATGGTA	NED	50°C	B2	238-310	258
dsub12	98B	TCTCTGTGCTCCTGCCACTA CCCCAAGCATTATGCAATTT	6-FAM	50°C	B1	247-320	272

Els productes resultants de l'amplificació es van visualitzar en un gel d'agarosa al 2%. La placa de genotipació es va preparar posant a cada pou 1.5 µl de DNA diluït (1:30), 0.3 µl de Rox 70-500 (BioVentures) (el marcador de mida molecular) i 1.7 µl de formamida. L'anàlisi dels fragments amplificats es va realitzar amb el seqüenciador ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems) als Serveis Cientifico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Per últim, la mida dels al·lels es va assignar amb el programa GeneMapper 3.7 (AppliedBiosystems). Com totes les larves són heterocariotípiques per *chcu*, l'al·lel del camp es va inferir per comparació amb l'al·lel de la soca mutant(Figura 15), prèviament caracteritzada (Taula 3.3) (Figura 3.5).

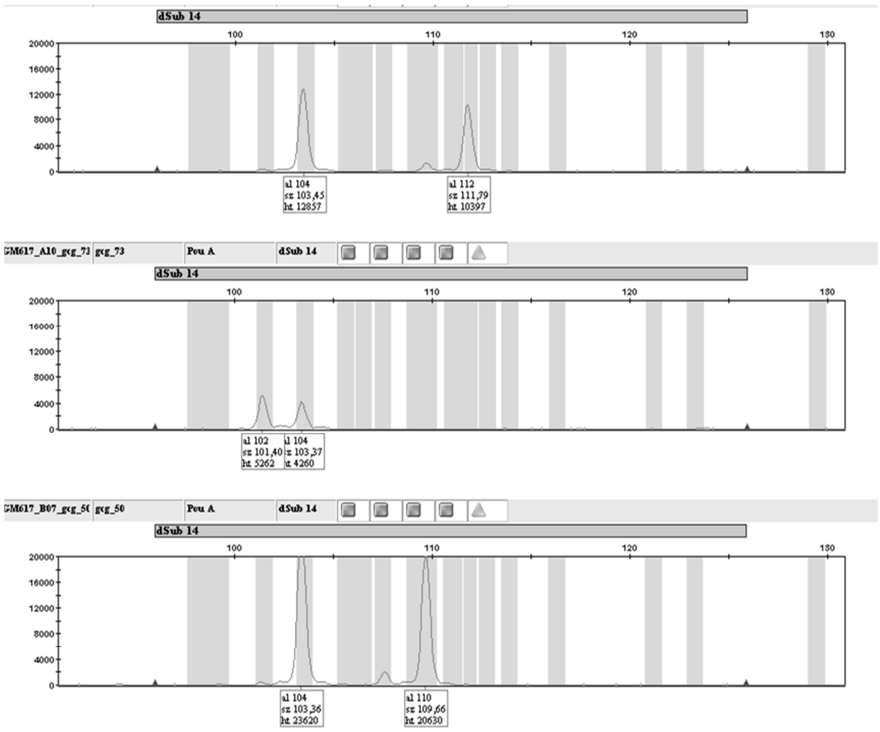


Figura 3.5: Exemple de com es veuen els al·lels dels loci microsatèl·lits amb el GeneMapper. A tall d'exemple, en el gràfic del mig, cas, el pic de l'esquerre (232bp) és l'al·lel de *chcu*. Per tant, l'al·lel del cromosoma salvatge és de 244bp.

3.3.2. Anàlisi de les dades

Un cop obtinguts els genotips de tots els individus es va utilitzar el programa Microsatellite Toolkit (Park, 2001) per determinar les freqüències al·lèliques de cada *locus* a cada població i per generar els fitxers d'entrada dels diferents programes d'anàlisi de microsatèl·lits utilitzats.

Com que el nombre d'individus de cada ordenament a cada població no reflecteix la freqüència en la població de l'ordenament sinó que la mostra està forçada per a tenir el mateix nombre d'individus de cada ordenament amb un màxim de 30, totes les anàlisis s'han fet tenint en compte l'ordenament. En cap anàlisi es va fer servir la població formada per tots els ordenaments com a unitat de comparació.

La variabilitat genètica de cada ordenament dins de cada població es va estimar mitjançant l'heterozigocitat esperada (H_e) i la riquesa al·lèlica calculats amb el programa FSTAT (Goudet, 1995). Per a fer-ho es va considerar cadascun dels quatre ordenaments com una "subpoblació" dins de cada població. Per tant es va treballar amb un total de 24 subpoblacions. A més, l'ordenament O_{ST} de València es va excloure de les anàlisis degut a que només es disposava de

5 individus. El programa FSTAT dóna un valor per a cada *locus*. Com a mesura global de diversitat es va utilitzar la mitjana dels 13 *loci* i la diversitat per regions es va calcular tot fent la mitjana de diversitat dels *loci* de cadascuna de les regions.

Amb el test de Kolmogorov-Smirnov es va testar la normalitat de les dades i totes seguien una distribució normal. Per tant, en totes les anàlisis es va utilitzar la estadística paramètrica.

Com a primera aproximació, la variabilitat entre ordenaments calculada tant al l'heterozigositat esperada com amb la riquesa al·lèlica, es va comparar amb un test t-student. Al ser els resultats equivalents per als dos paràmetres, la resta d'anàlisis es van realitzar amb la riquesa al·lèlica.

La relació entre la riquesa al·lèlica de cada ordenament amb la latitud, o amb la freqüència de l'ordenament a la població, es va determinar mitjançant regressions calculades amb el programari estadístic SPSS v.18.

Per avaluar si existeixen diferències significatives pel que fa a la riquesa al·lèlica entre poblacions i entre ordenaments dins de població, es van realitzar diferents tipus d'anàlisi de la variància. Es va realitzar un *mixed model* trifactorial per comparar la riquesa al·lèlica entre poblacions i veure si existeixen diferències significatives entre poblacions i/o ordenaments. Es van considerar factors fixos l'ordenament ($O_{\underline{3+4}}$, $O_{\underline{3+4+7}}$, $O_{\underline{3+4+8}}$ i O_{ST}) i la població i com a factor aleatori el *locus* microsatèl·lit, però només considerant les interaccions entre dos factors.

Per a poder veure en detall les interaccions que ens interessen (població x ordenament), es va realitzar una ANOVA amb la població i l'ordenament com a factors fixos per la riquesa al·lèlica de cadascun dels 13 *loci* microsatèl·lits.

Per determinar si hi ha diferències entre poblacions per a un mateix ordenament, es va realitzar una ANOVA considerant la població com a factor fix i la diversitat genètica com a variable dependent, per a cadascun dels ordenaments. De nou, es va tenir en compte la mitjana dels 13 *loci*, com a valor global de diversitat, però també es va realitzar l'anàlisi amb el cromosoma dividit per regions, essent el valor de cada regió la mitjana de la riquesa al·lèlica dels *loci* presents a cada regió cromosòmica. Com que l'anàlisi de la variància compara les mitjanes de totes les poblacions a la vegada, es va realitzar a Post Hoc un test de Tukey per veure si hi havia diferències entre les diferents parelles de poblacions.

El programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000) es va utilitzar per tal de determinar el nombre de poblacions genèticament diferenciades que hi ha a la nostra mostra. Es va utilitzar el model d'*admixure model*, i utilitzant la informació dels individus per crear les poblacions pre-definides, ja que aquest model és l'adient per a detectar diferències quan les poblacions són molt similars entre elles. Les simulacions es van dur a terme considerant que hi poden haver fins a un total de 7 poblacions (K=7; ja que a l'estudi partim de 7 poblacions naturals); amb 200.000 Cadenes de Markov, un *burning* de 20.000 (nombre de simulacions inicials que descarta el programa), i 20 repeticions per a cada K possible. Per determinar la K més probable, amb els resultats de les simulacions es va utilitzar la mitjana del logaritme neperià de les probabilitats posteriors per a cada k (ln Pr(x|K)) i la desviació estàndard a partir de les 20 iteracions seguint l'equació de Falush *et al.*, (2007) per a cada K. Aquest paràmetre permet detectar el nombre de poblacions genèticament diferenciades. Es va utilitzar el programa CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg, 2007) per a unir els resultats de les 20 iteracions per la millor k en un únic fitxer i el resultat es va visualitzar amb el programa DISTRUCT v.1.1 (Rosenberg, 2004).

Per poder identificar les relacions entre les poblacions en un espai de dos dimensions i visualitzar com es distribueixen, es va dur a terme una Anàlisi de Coordenades Principals (PCoA) a partir de les distàncies de Nei entre les diferents parelles de poblacions utilitzant el software GeneAlEx (Peakall and Smouse, 2006).

La diferenciació genètica es va calcular amb l'estadístic F_{ST} de (Weir and Cockerham, 1984) i la seva significació es va determinar amb el programa Fstat (Goudet, 1995) amb la correcció seqüencial de Bonferroni. Després es van comparar els valors d' F_{ST} per totes les parelles de comparacions entre ordenaments de la mateixa població i entre poblacions. Es va comparar: (i) el mateix ordenament a les diferents poblacions, (ii) els diferents ordenaments dins d'una mateixa població i (iii) els diferents ordenaments a les diferents poblacions. Aquestes comparacions es varen fer considerant les dues regions del cromosoma per separat.

Desequilibri de lligament entre loci microtasèl·lit i ordenaments

El desequilibri de lligament (LD) entre els marcadors i les inversions a cada població es va determinar amb la versió multialèl·lica de la D' de Lewontin, D'm = $\sum_{ij} p_i\, q_i \left|D'_{ij}\right|$ (Lewontin, 1964), utilitzant el programa PowerMarker versió 3.25 (Liu and Muse, 2005). La significació estadística es va determinar amb el test exacte de Fisher implantat en el programa, amb el p-valor obtingut després de 10000 permutacions i corregit per comparacions múltiples mitjançat

el mètode del *False Discovery Rate* (FDR; Benjamini and Hochberg, (1995). Els patrons específics de LD entre els al·lels microsatèl·lits i els ordenaments cromosòmics es va calcular amb la medició de LD interal·lèlic entre marcadors implementat en el programa MIDAS (Gaunt *et al.*, 2006). La significació estadística es va calcular amb una khi-quadrat (χ^2) i la correcció de Yates. Per evitar patrons erronis, es van considerar significatius només aquelles D' on els al·lels apareixien més de tres cops associats amb la inversió quan es van analitzar les poblacions per separat i per aquells que apareixien més de 15 cops quan es van agrupar les poblacions.

Per determinar si les diferències en diversitat entre els diferents ordenaments estava influenciada per la mida dels al·lels microsatèl·lits atrapats en el moment de la formació de la inversió es va analitzar l'existència de diferències significatives entre la mida dels al·lels que conté cada ordenament mitjançant el test de Kruskal-Wallis per cada *locus* per separat.

3.4. *Gens candidats a l'adaptació tèrmica.*

3.4.1. *Gens escollits*

De tots els gens que mostraven diferències significatives en el patró d'expressió a les diferents temperatures en el treball de (Laayouni *et al.*, 2007) es van triar 5 d'ells segons la seva localització citològica en el cromosoma O (Figura 3.6). Així, s'han triat els gens *Fst* (Frost), situat a prop del punt de trencament proximal de la inversió O_7; *Sqd* (Squid) situat dins de la inversió O_7 a prop del punt de trencament distal; *Yrt* (Yurt) i *Atpα* (Na pump α subunit), que es troben fóra de la inversió O_7 però en la regió d'influència d'aquesta (Pegueroles *et al.*,, 2010b); i el gen *hsp70* (heat shock protein 70), que es troba dins de la regió de l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$, prop del punt de trencament proximal d'aquesta (Figura 3.6). Les localitzacions dels gens *Sqd*, *Yrt* i *Atpα* es van obtenir de Pegueroles *et al.,* submitted); la del gen *Fst* d'Arboleda, (2008) i la del *hsp70* de Moltó *et al.* (1992). Per a cadascun dels gens, es van seqüenciar una mitjana de 10 individus per cadascun dels dos ordenaments a les poblacions de Màlaga, València i Barcelona.

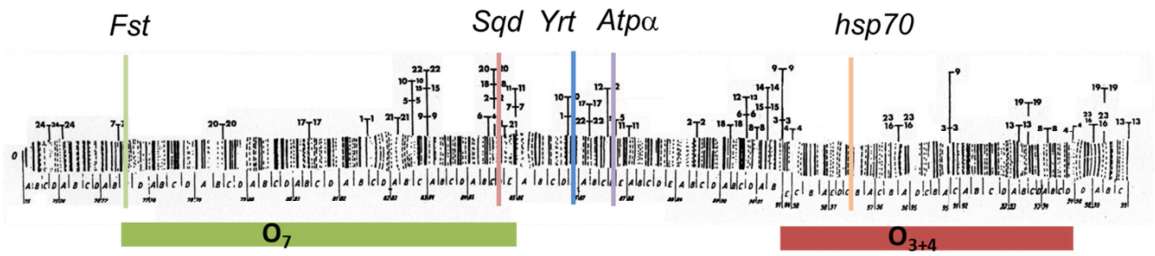


Figura 3.6: Localització dels 5 gens candidats escollits per a l'estudi en relació a l'ordenament O_{ST}. A sota, representació dels ordenaments estudiats. Les caixes de color representen el fragment invertit en relació a l'ordenament O_{ST} de la figura.

3.4.2. *Seqüenciació*

Encebadors

Per a seqüenciar els gens *Atpα*, *Yrt* i *Sqd* es van utilitzar els mateixos encebadors i condicions que els descrits a Pegueroles *et al.,* (*submitted*). Per als altres dos gens es van haver de dissenyar encebadors. Així doncs, es van descarregar les seqüències dels gens *Fst* i *Hsp70* de *D. pseudobscura* i *D. melanogaster* de la base de dades Flybase (www.flybase.org) i es va realitzar un BLAST contra el genoma preliminar de *D. subobscura* (Barcelona Subobscura Initiative). El genoma encara no està del tot assamblat, però per sort les seqüències homòlogues dels gens *Fst* i *Hsp70* a *D. subobscura* estaven situades dins de contigs grans del genoma. Finalment, es van alinear les seqüències de les 3 espècies per tal de localitzar l'inici de la regió codificadora dels gens i es van dissenyar encebadors amb el programa Primer Designer v1.01 (1990 Scientific and Educational Software) a banda i banda per tal d'obtenir també les regions reguladores 5' i 3'. Els encebadors utilitzats per a amplificar i seqüenciar els gens, així com la mida del fragment amplificat i la localització citològica es troben a la Taula 3.4. Degut a problemes en la seqüenciació del gen *Hsp70*, aquest no surt a la taula. Els resultats per a aquest gen es tractaran en l'apartat 4.5.2.)

Reacció d'amplificació i obtenció de les seqüències

Les reaccions d'amplificació es van dur a terme en un volum final de 15µl. Cada reacció contenia 3 µl de buffer 10x, 3 µl de dNTPs (1 mM), 0.45 µl de DMSO (un estabilitzador de la PCR), 0.3 µl de Phire Hot Start DNA Polymerase (Finnzymes), 0.75 µl de primer *forward* (10 µM), de 0.75 µl primer *reverse* (10 µM), 5.75 µl d' aigua i 1 µl de DNA. Les condicions

d'amplificació en el termociclador foren: 1 primer pas de 30 segons a 98°C per a la desnaturalització inicial, seguits de 35 cicles amb 5s a 98°C, 5s a temperatura d'anellament adient i 90s a 72°C; acabant amb un cicle d'extensió final de 7 min a 72°C.

Els productes de PCR es van visualitzar en un gel d'agarosa a l'1% per tal de comprovar que la reacció havia funcionat i que el fragment amplificat era el correcte, abans de seqüenciar. Posteriorment, el producte de la PCR es purificava amb el protocol de la ExoSap (Tebu bio-Promega), un protocol molt senzill en el qual s'afegeixen als 10µl de l'amplificació 1'7µl d' exonucleasa I (20U/µl)que degrada l'excés d'encebadors i 3'3µl de fosfatasa alcalina (1U/µl) que degrada els dNTPs sobrants.

Taula 3.4: Gens utilitzats en l'estudi amb els seus corresponents encebadors. a: encebadors utilitzats per a l'amplificació de les seqüències. b: encebadors utilitzats per a seqüenciar.

Gen	Localització	Mida (bp)	T°C	Encebadors		
CG9434 (Fst)	77A	2028	55°C	Fst_L	5'-GCTCGAATGATTTGGTGCGT-3'	a
				Fst_R1	5'-TCCATCAATGCACAGAGCTG-3'	b
				Fst_F	5'-CGCTTAGTATATTCTACAAC-3'	b
				Fst_R2	5'-TCGTGACTATTGTCATGATG-3'	b
				Fst_R	5'-AATGCAATAAACCTGCGGCT-3'	a
CG16901 (Sqd)	85D	1436	50°C	SqdL	5'-AACTAACCTTGTTCCTCTCC-3'	a
				SqdR	5'-TTACACACGCTTCGTCAGTT-3'	a, b
				Sqd_RI	5'-CATTATAGTAGCCACCAGGA-3'	b
				Sqd_M	5'-TCTTGGTGGTTGTTGCTGTG-3'	b
CG9764 (Yrt)	86E	911	55°C	YrtL	5'-CTGGACATCATCGAGAAGGA-3'	a
				YrtR	5'-ACATTGGCCAGCTTCACTTG-3'	a
				YrtFC	5'-AACTGGAGTCTGGCTGGCGT-3'	b
				YrtFS	5'-TACGCCGGATCATCGTTGCT-3'	b
CG5670 (Atpα)	87C	1490	60°C	AtpL	5'-TCATAAGATCTCTCCTGAGG-3'	a, b
				AtpR	5'-GCAATATCCTCAACGGTCTC-3'	a, b
				AtpFC	5'-CATCATTGAGGCGCGCAGCT-3'	b
				AtpRI	5'-CCAGGGCTAGTTCTATCGTA-3'	b

El fragment amplificat es va seqüenciar amb els encebadors interns de seqüenciació. Les reaccions de seqüenciació es van dur a terme amb el kit comercial BigDye 3.1 (AppliedBiosystems) tot seguint les instruccions de la companyia i van ser analitzats en un seqüenciador automàtic ABI 3730 dels Serveis Cientifico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Les seqüències obtingudes es van assemblar amb el programa SeqMan II (DNASTAR) i es van alinear amb el programa Clustal W (Thompson *et al.,* 1994) implementat en el programa BioEdit v7 (Hall, 1999).

3.4.3. *Anàlisi de les dades*

Amb les seqüències alineades, les regions exòniques i intròniques (Figura 3.7) dels gens *Sqd*, *Yrt* i *Atpα* es van assignar seguint el treball de Pegueroles *et al.* (*submitted*), mentre que l'exó del gen *Fst* es va determinar per comparació amb les seqüències disponibles a la pàgina dels 12 genomes, però sobretot amb *D. pseudoobscura*, ja que aquesta és l'espècie més propera de les que es disposa el genoma complert. Un cop anotat l'exó, es va comprovar que la notació fos correcta tot fent un blast de la nostra seqüència contra la base de dades de proteïna UniProt (http://www.uniprot.org/).

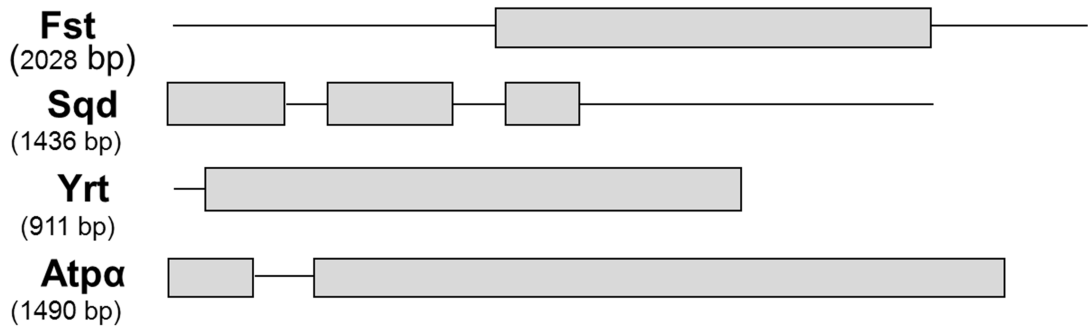


Figura 3.7: Estructura dels fragments amplificats. La mida total del fragment es dóna en parells de bases sota el nom de cada gen. La línia simbolitza els introns, mentre que les caixes grises representen els exons.

Com a primera aproximació, es van calcular tot un seguit de paràmetres per determinar la variabilitat dels ordenaments i les poblacions. Es va estimar per a cada *locus* el nombre d'haplotips a la població (*h*), el nombre de posicions polimòrfiques o segregants (*S*) i el nombre de singletons o canvis únics de nucleòtid. A més, es va estimar la diversitat nucleotídica (π) global i la de les posicions sinònimes i no codificadores (π_{sil}) (Nei and Gojobori, 1986), i l'heterozigositat per nucleòtid, considerant posicions silencioses, donada la S observada (θ_{sil}). Les expressions matemàtiques per a calcular els paràmetres es poden consultar a Watterson, (1975) i Nei, (1987).

Amb un test de Mann-Whitney utilitzant la π_{sil} es va determinar si existeixen diferències entre la variabilitat dels ordenaments. Per a analitzar si hi ha diferències en la variabilitat entre les tres poblacions, es van comparar el nombre de posicions segregants de cada gen per a cada

població mitjançant una khi-quadrat. Com a valors esperats per a cada *locus* es va utilitzar la mitjana de les posicions segregants de les tres poblacions.

La diferenciació genètica entre els ordenaments es va calcular amb els F_{ST} de (Hudson *et al.* 1992) i la seva significació es va calcular a partir del paràmetre Snn de (Hudson, 2000), estimant el p-valor mitjançant simulacions de coalescència realitzades a partir de 10000 rèpliques. L'estadístic F_{ST} es basa en el nombre mitjà de diferències entre seqüències de la mateixa població i el nombre mitjà de diferències entre seqüències de dues poblacions diferents.

Per a estudiar possibles desviacions de la neutralitat es va calcular la D de Tajima (Tajima 1989), que correspon a la diferència normalitzada entre la mitjana del nombre observat de diferències nucleotídiques entre seqüències i el nombre observat tenint en compte el nombre de posicions segregants per a mutacions neutres en una població en equilibri mutació-deriva. Sota la teoria neutralista, les dues estimes han de ser iguals. Per tant, si les mutacions presents a les seqüències són neutres esperem que D=0. Així doncs, l'estadístic D indica la possible desviació del neutralisme en favor a la selecció. Per altra banda es va dur a terme el test de McDonald i Kreitman (1991), que es basa en la comparació entre la relació de canvis sinònims i no sinònims fixats entre espècies i la relació de polimorfisme sinònim i no sinònim dins d'una mateixa espècie. Sota la hipòtesi de neutralitat, la proporció de canvis sinònims entre espècies hauria de ser la mateixa que la proporció de canvis sinònims dins de la mateixa espècie.

Es va analitzar si les diferents inversions i poblacions havien patit canvis de mida recent mitjançant l'estadístic R_2 (Ramos-Onsins and Rozas, 2002). La significació d'aquest paràmetre es va calcular a partir de simulacions de coalescència amb 1000 rèpliques considerant dues situacions diferents, que a la població no hi ha recombinació o bé que hi ha recombinació lliure. Per a calcular tots els altres paràmetres es va utilitzar el programari DnaSP, versió 5 (Librado and Rozas, 2009). En tots els casos, els gaps varen ser exclosos en les anàlisis.

També es va dur a terme una anàlisi del desequilibri de lligament, on es varen estudiar les associacions entre posicions informatives. Es va calcular el percentatge d'associacions significatives segons el test exacte de Fisher i el percentatge que restava després d'aplicar la correcció de Bonferroni. A més, el valor global de desequilibri de lligament es va calcular mitjançant l'estadístic ZnS (Kelly, 1997), que és el promig del valor de R^2 (Hill and Robertson, 1968) per a totes les comparacions. Les xarxes de recombinació es van generar amb el programa Splitstree4 (Huson and Bryant, 2006), la taxa de recombinació (ρ) amb el programa

RDP3 (Martin *et al.*, 2010) i els fragments de conversió gènica es van obtenir utilitzant el mètode de Betrán *et al.* (1997) implementat en el programari DnaSP v5.

Totes les anàlisis es van dur a terme amb els 4 gens per separat, però a més, el desequilibri de lligament i les xarxes de recombinació també és van analitzar per al conjunt de gens concatenats. La concatenació es va realitzar amb el programa Concatenator v1 (Pina-Martins and Paulo, 2008).

3.5. Aclimatació Tèrmica

Com que s'ha trobat que entre els ordenaments càlid ($O_{\underline{3+4}}$) i fred (O_{ST}) es dóna una gran diferenciació gènica en la regió de la inversió 3+4 (Munté *et al.*, 2005), l'experiment següent va ser plantejat per avaluar si aquestes diferències també s'observen a nivell de la termotolerància i l'expressió d'Hsps.

3.5.1. *Obtenció del material d'estudi*

Per a aquest estudi es van utilitzar les línies homocariotípiques de Barcelona ja que al tenir el fons genètic uniformitzat, el cromosoma O és l'únic factor que varia entre les diferents línies. Es van utilitzar 6 línies de cadascun dels 3 ordenaments més freqüents estudiats en aquesta població i que difereixen en la regió I: $O_{\underline{3+4}}$, O_{ST} i $O_{\underline{3+4+8}}$. Amb aquestes línies, es van obtenir individus homocariotípics no consanguinis per a cada combinació d'acord amb el següent esquema:

- Encreuaments homocariotípics no consanguinis:

♀x♂

ST(1) x ST(2)	3+4 (1) x 3+4 (2)	3+4+8 (1) x 3+4+8 (2)
ST(2) x ST(3)	3+4 (2) x 3+4 (3)	3+4+8 (2) x 3+4+8 (3)
ST(3) x ST(4)	3+4 (3) x 3+4 (4)	3+4+8 (3) x 3+4+8 (4)
ST(4) x ST(5)	3+4 (4) x 3+4 (5)	3+4+8 (4) x 3+4+8 (5)
ST(5) x ST(6)	3+4 (5) x 3+4 (6)	3+4+8 (5) x 3+4+8 (6)
ST(6) x ST(1)	3+4 (6) x 3+4 (1)	3+4+8 (6) x 3+4+8 (1)
O_{ST}	O_{3+4}	O_{3+4+8}

Per a tots els encreuaments no consanguinis es van dur a terme els dos encreuaments recíprocs per evitar efectes materns. Al cap de 6 dies de fer els encreuaments els mascles es van descartar i les femelles es van posar en cambres de posta (barrejant el mateix nombre

d'un encreuament i el seu recíproc) amb medi complementat amb carbó per a poder veure i recol·lectar els ous. Els ous es van transferir a vials a baixa densitat (45 ous/vial amb 6 ml de medi de cultiu) i a mida que els descendents van anar emergint es van transferir a ampolles a baixa densitat. La manipulació de les mosques es va fer sempre a temperatura ambient i només es va fer servir CO_2 en el moment de barrejar i posar les femelles a les cambres de posta.

3.5.2. *Inducció de la resposta tèrmica*

Per a induir la resposta al xoc tèrmic, mosques adultes (~ 7 dies després d'emergir) de cadascun dels encreuaments es van transferir a vials buits de vidre, tancats amb taps d'escuma humitejats per evitar la dessecació i es van introduir en un bany humit a 32°C durant una hora. Posteriorment, els individus es van traspassar a vials amb medi fresc i es van deixar recuperar durant 2h o 6h, segons es volgués quantificar l'expressió d'Hsp70 o determinar la termotolerància induïda, respectivament. Per a la quantificació de l'expressió, al cap de les dues hores, els individus es van congelar amb nitrogen líquid i es van guardar a -80°C fins a la seva quantificació. A més, individus que no havien patit el xoc tèrmic també es van congelar per tal d'obtenir els valors basals d'Hsp70.

Per determinar el temps de recuperació, es va dur a terme una prova preliminar amb individus dels tres ordenaments als quals se'l va realitzar el xoc tèrmic i es van deixar recuperar diferents intervals de temps: 2, 4, 6 i 24h. Amb la quantificació d'Hsp70 present, es va poder determinar que en general el pic màxim de concentració es donava a les 2 hores i a partir d'aquell moment decreixia fins a assolir els mateixos valors que els control al cap de 6 hores (Figura .38).

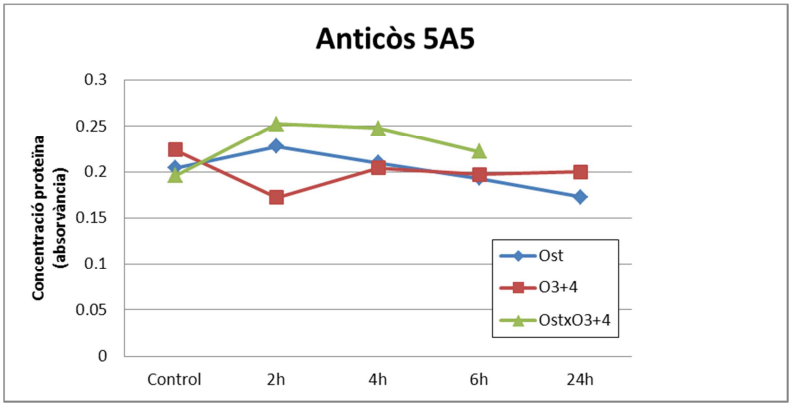


Figura 3.8: Nivells de HSP70 en individus control i en individus després de 2, 4, 6 i 24h de recuperació.

Una altra prova preliminar es va dur a terme per determinar quina era la millor temperatura de xoc tèrmic, utilitzant dues línies a l'atzar. Per a cadascun dels dos encreuaments, es va determinar el temps de *knockdown* en 30 femelles. Les mosques es van posar individualment en vials estancs de vidre de 5ml i van ser submergides en un bany a una temperatura constant de 36°C i 38°C. Cada bany té capacitat per a 60 vials, per tant les dues línies es varen testar alhora. La temperatura de l'aigua dels banys es controla mitjançant una unitat escalfadora d'aigua (JULABO ED, JULABO LabortechnikGmbH, Seelbach, Germany) que, a més, fa circular l'aigua dins del bany fent que la temperatura sigui uniforme. Per evitar errors de mesura, els dos assajos van ser gravats amb una vídeo càmera digital HD (SONY HDR-CX110E) i els temps de *knockdown* es van estimar a partir de la visualització del vídeo. Els resultats van mostrar clarament que 38°C era una temperatura molt propera a la temperatura crítica màxima (CT_{max}) ja que totes les mosques queien en 4.8 minuts. A 36°C, les mosques van aguantar fins a 16 min (Figura 3.9). Com que una pre-exposició a una temperatura 5-6°C menor a la CT_{max} normalment és suficient per a desencadenar la resposta tèrmica (Hoffmann *et al.*, 2003), la temperatura de 32°C va ser la triada per fer el xoc tèrmic.

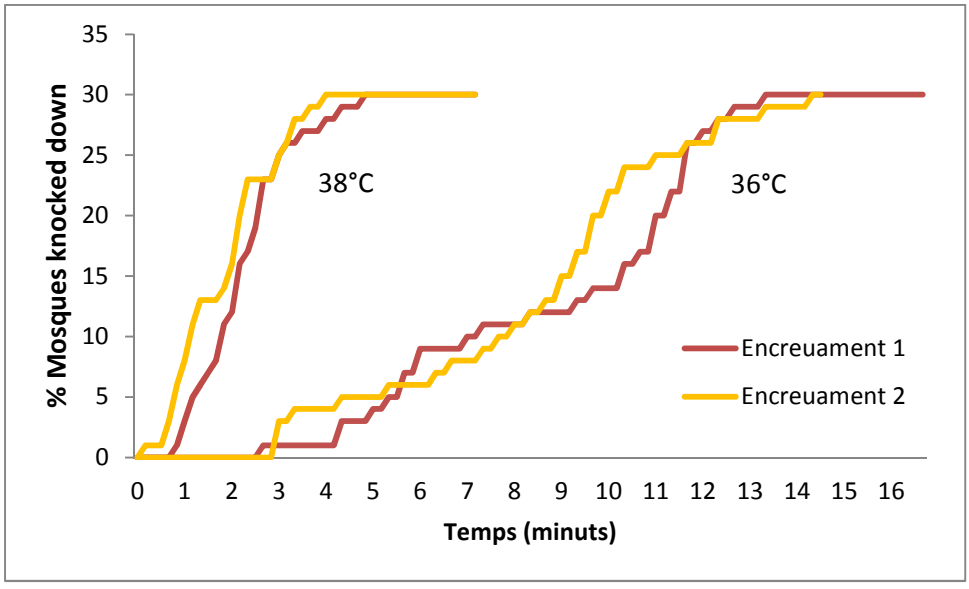


Figura 3.9: Corba de supervivència per a les probes per determinar la millor temperatura de knockdown.

3.5.3. *Termotolerància*

Es va determinar la termotolerància dels ordenaments mitjançant la T_{KO} que es defineix com la temperatura a la que l'individu cau en coma degut a la temperatura en un assaig dinàmic, on la temperatura s'incrementa a un ritme constant fins a arribar a una temperatura límit. Tot i això, la temperatura de *knockdown* per a una mateixa espècie pot variar dramàticament depenent

de la metodologia utilitzada per a calcular-la (Terblanche *et al.*, 2007; Chown *et al.*, 2009). Aquesta variabilitat es pot atribuir a la barreja d'efectes que pateixen les mosques quan se les posa en vials estancs dins d'un bany durant diferents períodes de temps, com ara l'estrès fisiològic, deshidratació, etc...

L'objectiu d'aquesta prova era determinar si la metodologia emprada per determinar la T_{KO} influeix en el valor d'aquesta ja que en un treball anterior del nostre grup (Dolgova *et al.*, 2010) no es van trobar diferències significatives entre ordenaments càlids i freds. En l'estudi es va determinar la temperatura mitjançant la T_{KO} en un assaig dinàmic on la temperatura augmentava a un ritme de 0,1°C cada minut. En aquests experiments, la temperatura augmenta molt lentament, l'experiment acaba essent molt llarg i pot ser que doni lloc a la inducció de la resposta tèrmica, o bé que els individus morin abans degut a altres factors com ara deshidratació, fatiga o desgast. Per tant, en el nostre estudi vam comparar l'assaig dinàmic amb l'increment de la temperatura lent amb un assaig on l'increment de la temperatura és molt més ràpid, utilitzant individus dels mateixos creuaments.

Així doncs, vam utilitzar dos protocols diferents per a calcular la termotolerància basal i induïda: un protocol d'increment lent amb una temperatura inicial T_0 = 24°C i un ritme d'increment de temperatura ΔT = 0.1°C min^{-1}, com al treball de Dolgova *et al.* (2010), i un protocol d'increment ràpid amb temperatura inicial T_0 = 24°C i un ritme d'increment de temperatura ΔT = 0.6°C min^{-1}. En tots dos casos, el protocol va començar amb 10 minuts d'equilibrament de les mosques al bany abans d'iniciar l'increment de temperatura.

La termotolerància es va analitzar en els ordenaments O_{ST} i $O_{\underline{3+4}}$ ja que són els que presenten clines latitudinals més marcades a Europa i a més, oposades. I donat que els individus no consanguinis són els més representatius a la natura, només es van analitzar els individus homocariotípics no consanguinis. La termotolerància basal i induïda es va determinar per a 6 mascles i 6 femelles de cadascun dels encreuaments.

En l'experiment, les mosques es van introduir individualment en vials estancs i van ser submergits en banys d'aigua a 24°C (Figura 3.10). Degut a que cada bany té una capacitat per a 60 vials, només 5 dels encreuaments van ser testats per a cada ordenament, amb 3 mascles i 3 femelles situats a l'atzar en cadascun dels dos banys per evitar efectes de posició i bany. La diferència entre els dos mètodes que vam testar resideix en la velocitat de l'increment de temperatura. En l'assaig d'increment lent, vam repetir les condicions de l'estudi de Dolgova *et al.* (2010) incrementant 1°C cada 10 minuts. En el moment de l'increment de la temperatura,

es comprovava la mobilitat de les mosques en els vials, i en el cas que alguna hagués caigut, s'apuntava. Per contra, en l'assaig d'increment ràpid, per evitar errors en la determinació de la temperatura a que la mosca queia, tot l'assaig va ser gravat amb una video càmera HD ja que s'arribava a la temperatura màxima en aproximadament 23 min. Per tant, vam introduir una termopar en els banys i vam estimar la temperatura de knockdown de cada mosca a partir del moment en que la mosca cau utilitzant la interpolació $T = T_i + \Delta T \times t_k$. En aquesta expressió, Tés la temperatura de *knockdown* estimada, Ti és la temperatura que marca el termopar en el temps ti just abans que la mosca caigui, i t_k és el moment de la gravació en què la mosca cau. Els vídeos es van revisar dues vegades i l'error de mesura es va estimar com 1 menys la correlació intraclasse (repetibilitat) de l'ANOVA. En tots dos casos, l'assaig va durar fins que la última mosca queia. A més, com que també volíem analitzar si la inducció d'Hsps afecta la termotolerància, els dos assajos es van dur a terme amb mosques control per determinar la termotolerància basal i amb mosques que havien patit un xoc tèrmic per tal d'analitzar la termotolerància induïda. Per tant, es van realitzar un total de 8 banys.

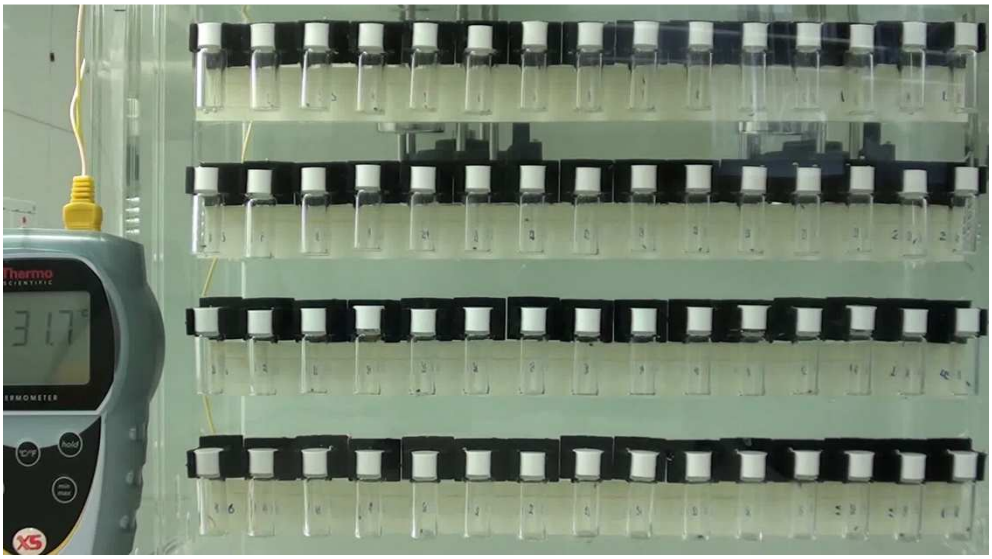


Figura 3.10: Imatge d'un dels experiments de termotolerància. En ella es poden apreciar els seixanta vials i el termopar que controla la temperatura del bany.

3.5.4. *Quantificació de proteïnes*

En aquest estudi, la quantificació de proteïna es va dur a terme amb la tècnica inmunoenzimàtica anomenada Enzime Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Figura 3.11). L'ELISA és una tècnica bioquímica que es basa en la detecció d'un antigen (la Hsp70) en una mostra. Es tracta d'un procés en el qual primerament fixem la mostra en un substrat i

segrestem la proteïna amb un anticòs primari específic. Posteriorment, s'utilitza un anticòs secundari que detecta el primari i que, a més, porta conjugat un enzim que ens ajudarà a detectar el senyal. La detecció es fa afegint el substrat necessari per l'enzim, que produeix un canvi de color en la placa. La intensitat de color o absorbància és el que mesura l' ELISA, per tant, per obtenir els resultats es necessita un estàndard o bé una sèrie de mostres de concentració coneguda per tal de poder calcular la concentració de proteïna present en la mostra.

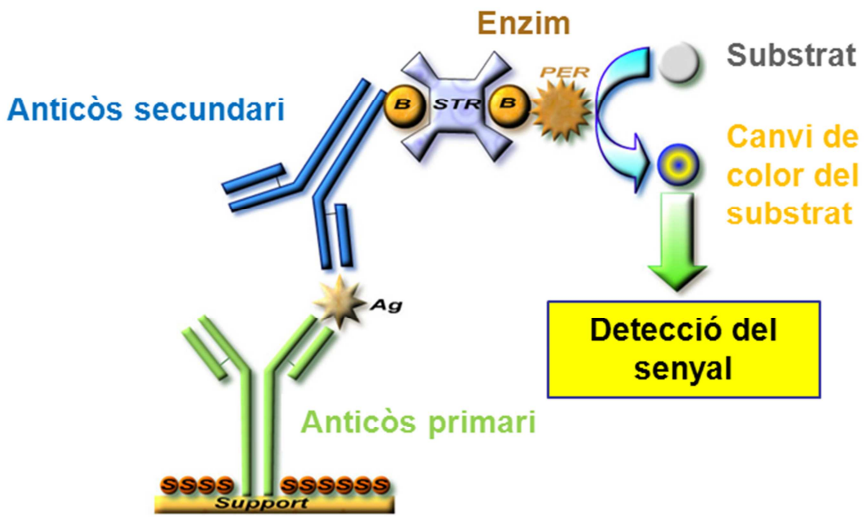


Figura 3.11: Representació esquemàtica de la tècnica ELISA.

Quantificació de la HSP70

Per a cadascun dels encreuaments descrits en l'apartat 3.5.1., es van tractar un total de 3 rèpliques d'uns 10 individus cadascuna, per ambdós sexes. Després del xoc tèrmic i les dues hores de recuperació, les mosques es van passar a microtubs d'1.5ml i es van submergir en nitrogen líquid per tal de congelar-les immediatament. A mode de control i per a obtenir els valors basals de proteïna, per a cada grup tractat es van congelar 10 mosques més que no havien patit cap xoc tèrmic.

Un cop al laboratori, les 3 rèpliques es van barrejar per tal d'evitar efectes de bloc de tractament en les mostres i van ser distribuïdes a l'atzar de nou en 3 microtubs. Cada grup de mosques es va homogeneïtzar en 1ml d'*homogenizing mix* (SIGMA) en un lisador de teixits (TissueLyserII, Qiagen). Aquesta és una homogeneïtzació mecànica, portada a terme per agitació a gran velocitat amb una bola d'acer, que colpeja i disgrega les mostres. Per tant, permet l'alliberament d'alta qualitat del DNA, RNA i proteïnes, per a la seva posterior

purificació i anàlisi. Els lisats resultants es van centrifugar durant 30min a 13.000 rpm, en una centrífuga prèviament refrigerada a 4°C i el sobrenedant es va transferir a dos microtubs de 0.5ml.

El contingut de proteïna total de les mostres es va calcular mitjançant un assaig BCA (SIGMA). Amb aquesta metodologia, la concentració total de proteïna es mostra com a resultat d'un canvi de color, de verd a lila, en proporció a la concentració de proteïna i que es mesura utilitzant tècniques colorimètriques. La quantitat de proteïna en solució es pot calcular tot mesurant l'espectre d'absorció i comparant-lo amb solucions de proteïna de concentració coneguda. Així, es carrega en una microplaca 10µl de cada mostra i li afegim 200µl de BCA-mix (0.5µl de solució A i 24.5µl de solució B). S'incuba la placa 1h a 37°C i es llegeix l'absorbància amb un lector espectrofotomètric (PowerWave XS2 Biotek) a una longitud d'ona de 562nm. Els estàndards d'albúmina de sèrum boví són de concentració coneguda i s'utilitzen per tenir una mostra de referència amb la que es construeix una corba de concentració per estandarditzar i obtenir els valors de les nostres mostres. Un cop sabem la concentració de les mostres, es dilueixen amb *coating buffer*, fins a obtenir una concentració de 25ng/ml per a cada mostra en un volum final d'1ml.

Per començar amb el protocol de l'ELISA, afegim 120µl a cada pouet de la microplaca (per quadruplicat) i ho incubem tota la nit a RT (temperatura ambient) o bé 1h a 37°C. Posteriorment s'afegeixen 100µl de *blocking buffer* a cada pouet. Es posa 1min a l'agitador i s'incuba 1h a 37°C. Després es buida la microplaca, s'eixuga bé i es fan 4 rentats amb 200µl de PBS-Tween posant, entre rentats, la placa 2 min a l'agitador. Es buida la placa i s'afegeix 100µl l'anticòs primari (clon 5A5, ThermoFisher en concentració 1:1000 diluït en *blocking buffer*) a tres de les rèpliques (en la quarta rèplica no posem anticòs per mantenir el pouet com a *blank* o pou cec; Figura 3.12). S'agita 1min i s'incuba 1h a 37°C. Abans de posar l'anticòs secundari, la placa es renta 4 vegades amb 200µl de PBS-Tween i entre rentats, es posa 2 min a l'agitador. Es buida la placa i afegim 100µl de l'anticòs secundari (HRP antimouseIgG, ThermoFisher en concentració 1:1000 diluït en PBS) a tots els pouets i incubem 1h a 37°C.Es torna a rentar 4 cops amb 200µl de PBS-Tween i es fan 3 rentats més amb 200µl de PBS, sempre posant entre rentat i rentat, la placa 2 min a l'agitador. L'anticòs secundari està conjugat amb una peroxidasa que ens facilitarà la detecció de la proteïna. Per últim, afegim 100µl d'OPD (substrat per a la peroxidasa que porta conjugat l'anticòs) i incubem a temperatura ambient i en foscor fins que es doni el canvi de color (20-30 min). La reacció es para amb 100µl d'àcid sulfúric (H_2SO_4) i es llegeix la placa a l'espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 490nm.

El pou cec de cada mostra es va incloure per tal de corregir les mesures per a senyals no específics. L'estàndard per a Hsp70 es va derivar d'una barreja de mosques provinents de tots els encreuaments que van ser tractats tal i com s'ha descrit prèviament. Es va incloure a totes les plaques per tal de poder-les comparar. A l'atzar, es va triar una de les plaques com placa de referència i el valor de l'estàndard d'aquella placa es va utilitzar per obtenir un valor de correcció per a la resta de plaques.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	bk	2	2	2	bk	3	3	3	bk
B	4	4	4	bk	5	5	5	bk	6	6	6	bk
C	7	7	7	bk	8	8	8	bk	9	9	9	bk
D	10	10	10	bk	11	11	11	bk	12	12	12	bk
E	13	13	13	bk	14	14	14	bk	15	15	15	bk
F	16	16	16	bk	17	17	17	bk	18	18	18	bk
G	19	19	19	bk	20	20	20	bk	21	21	21	bk
H	22	22	22	bk	23	23	23	bk	ST	ST	ST	bk

Figura 3.12: Esquema de com es distribuïen les mostres a les plaques ELISA. Cada placa contenia 23 mostres (tractada o control, mascles o femelles) distribuïdes aleatòriament i un estàndard en 4 rèpliques. (bk= blank o pou cec; ST= estàndard de Hsp70)

3.5.5. Anàlisi de les dades

Es va testar per a la normalitat de les variàncies amb el test de Levene. Els nivells de proteïna HSP70, transformats a logaritme, es van analitzar utilitzant el següent model lineal:

$$y_{ijklm} = \mu + K_i + c_{j(i)} + S_k + T_l + KS_{ik} + KT_{il} + ST_{kl} + KSL_{ikl} + \varepsilon_{ijklm}$$

on μ és la mitjana total, $K_i$és l'efecte fix del cariotip *i* ($O_{\underline{3+4}}$/ $O_{\underline{3+4}}$, $O_{\underline{3+4+8}}$/ $O_{\underline{3+4+8}}$ i O_{ST}/O_{ST}), $c_{j(i)}$ és l'efecte a l'atzar de l'encreuament *j* (*j* = 1,2,...,6) dins del cariotip *i,* S_k és el factor fixat per sexe, T_l és el factor fix de tractament (basal o induït), i ε_{ijklm} és l'error residual*.* Els nivells de HSP70 entre homocariotips càlids (O_{3+4}/ O_{3+4}) i freds (O_{ST}/O_{ST}) per aquells ordenaments que presenten clines latitudinals oposades es van comparar amb un contrast linear (cada comparació o contrasts entre dues mitjanes té un grau de llibertat).

Un model lineal similar es va utilitzar per analitzar la tolerància tèrmica. Donat que la variància en la temperatura de caiguda va ser significativament major en l'assaig d'increment de temperatura lent (Levene's $F = 21.26,\ P < 0.001$), les dades dels diferents assajos es van

tractar per separat. Una raó addicional per separar els anàlisis recau en que les fonts d'error per a estimar la tolerància tèrmica són majors en l'assaig més llarg (sota increment de temperatura lent, (Rezende, *et al.*, 2011). Totes les anàlisis es van dur a terme utilitzant el paquet estadístic STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK) i SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. COMPOSICIÓ DE DROSOFÍLIDS A LES LOCALITATS MOSTREJADES

A la taula 4.1 es mostren les localitats mostrejades i per a cadascuna d'elles, les espècies de *Drosophila* que es van capturar. Per a cada població es dóna la freqüència relativa de les espècies trobades, excepte per a les espècies bessones *D. melanogaster* i *D. simulans* que, degut a la dificultat d'identificar correctament les femelles d'aquestes dues espècies per la seva morfologia, es presenten les freqüències combinades de les dues. El nombre total d'individus capturats (n), varia entre els 120 individus capturats a València i els 3196 capturats a Málaga. *Drosophila subobscura* és l'espècie més abundant en 4 de les 7 poblacions analitzades, on la seva freqüència varia des del 38.58% de Rasquera al 79.17% de València. A les poblacions on l'espècie més abundant no és *D. subobscura*, ho és l'agrupació de *D. melanogaster/D. simulans*.

Taula 4.1: Dates de captura i freqüències de distribució dels drosofílids presents a cadascuna de les poblacions. A sota es mostra el nombre total d'individus capturats (n) i els índexs de diversitat de cada població: Nombre d'espècies (*S*), Índex de diversitat de Shannon (*H'*) i índex d'uniformitat de Shannon (*J*).

Població	**Málaga**	**València**	**Rasquera**	**Barcelona**	**Montpellier**	**Dijon**	**Groningen**
Latitud	36° 43'	39° 32'	40° 57'	41° 25'	43° 35'	47° 18'	53° 13'
Data de captura	20 Oct. 2008	23 Oct 2008	25 Oct 2008	23,24,29 Oct 2007	1 Set 2009	27 Ago2009	30 Ago2009
D. suzukii			**4,57**		**0,32**		
D. subobscura	5,29	79,17	38,58	34,54	69,72	28,41	69,07
D. helvetica				0,48	0,32	1,82	4,66
D. obscura						0,33	
D. melanogaster / D. simulans	94,49	20,83	29,44	65,22	29,02	48,72	5,93
D. immigrans			1,27	1,09		9,74	17,16
D. kuntzei						7,18	
D. hydei			9,64		0,63		
D. cameraria			16,50	4,95			0,21
D. phalerata				0,48		3,14	2,97
D. repleta	0,21						
D. testacea						0,66	
n	3196	120	394	828	317	1211	472
S	3	2	6	6	5	8	6
H'	0,222	0,512	1,447	0,904	0,679	1,357	0,986
J	0,202	0,738	0,807	0,505	0,422	0,653	0,550

A part de *D. subobscura*, l'única espècie present a totes les poblacions és el grup *D. melanogaster/D. simulans*, cosa que està relacionada tant amb la seva distribució (són dues espècies típicament cosmopolites) com a l'època de captura, ja que aquestes dues espècies bessones són força termòfiles.

També podem observar que les poblacions mediterrànies presenten una riquesa d'espècies menor, sobretot a València i Màlaga. A València el baix nombre pot estar relacionat amb les condicions climàtiques adverses durant la captura. Pel que fa a Málaga, el nombre d'individus capturat va ser molt alt, però bàsicament del grup *D. melanogaster/ D. simulans* cosa que podem relacionar amb l'alt grau d'antropització del lloc de captura, un viver al costat d'un aeroport. En general, es pot dir que cada població presenta una composició d'espècies i freqüències diferent.

A la taula també es pot observar el nombre d'espècies de cada població i els índexs de diversitat associats. La població amb més espècies detectades és Dijon, amb 8 espècies. A València, per contra, només es van detectar 2 espècies (*D. subobscura* i el grup *melanogaster/simulans*).

L'índex de diversitat de Shannon (*H'*) no només té en compte el nombre d'espècies sino també la seva freqüència. Un valor alt en aquest índex ens indica que tenim una mostra amb un nombre elevat d'espècies equifreqüents, mentre que valors baixos corresponen a mostres amb poques espècies distribuïdes irregularment. Les poblacions de Rasquera i Dijon són les que presenten els valors majors d'aquest índex. Dijon és la que presenta també un nombre major d'espècies però el seu valor d'*H'* és una mica menor que el de Rasquera ja que una de les espècies presents té una freqüència molt propera al 50%. Els valors més baixos de diversitat corresponen a les poblacions de Málaga i València, que són també les que presenten menor nombre d'espècies. D'aquestes dues poblacions, el valor és més baix a Málaga, tot i tenir més espècies que València, ja que la freqüència del grup *D. melanogaster*/*D. simulans* arriba al 94.49%.

L'última fila de la taula dóna els valors d'uniformitat de Shannon (*J*), que corregeix el valor de l'index de Shannon pel logaritme neperià de la riquesa d'espècies, de manera que les poblacions amb freqüències més equitatives obtindran valors més alts. Així doncs, veiem que la població més uniforme és Rasquera, on cap espècie arriba al 40%, seguida de València i Dijon.

Cal destacar que durant la segona campanya de captures l'any 2008, es va detectar a Rasquera una espècie mai abans descrita a Europa, *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931), i durant l'any 2009 es va trobar a altres localitats Europees (Calabria *et al.* 2012; veure apèndix). *D. suzukii* és una espècie asiàtica que, a diferència de la resta de drosofílids, oviposita i s'alimenta de fruits

sans, causant danys al cultiu de cireres, pel que ha estat bastant estudiada i anomenada "mosca de la cirera".

El mateix any 2008, *D. suzukii* també es va trobar per primer cop a Califòrnia, Nord Amèrica. Un any després s'havia estès per tota la costa oest dels Estats Units i també havia estat detectada a Florida. La introducció d'aquesta espècie als Estats Units ha estat acompanyada d'un gran dany econòmic en l'agricultura (Hauser *et al.*, 2009; Steck *et al.,* 2009). El dany als fruits es dóna per les larves que es desenvolupen a dins, però també hi ha danys secundaris per infestació de fongs o bacteris. Als Estats Units rep el nom comú de *Drosophila* d'ales puntejades (*Spotted Wing Drosophila*).

La colonització d'Europa per part de *D. suzukii* és, per tant, simultània a la de Nord Amèrica. La gran diferència és que mentre que als EEUU els danys en l'agricultura es varen donar des l'inici de la introducció, a Europa no es van detectar els primers danys fins l'any 2011 (Dra. Escudero (IRTA), comunicació personal). Tanmateix, els danys es podrien agreujar si *D.suzukii* envaeix les àrees temperades d'Europa, ja que en simulacions ecològiques fetes per Hauser *et al.* (2009) s'ha vist que el clima Mediterrani no és l'idoni per aquesta espècie. Les nostres dades semblen confirmar aquesta tendència ja que l'espècie s'està expandint cap al Nord d'Europa (Calabria *et al.* 2012) on els estius són més suaus, amb temperatures més baixes i humitats més elevades. Per tant, cal un monitoreig d'aquesta espècie per tal de controlar l'expansió i/o possible establiment a Europa. A més seria molt interessant encetar tot un seguit d'estudis genètics amb diferents marcadors moleculars per tal de determinar l'origen de la colonització, la via d'introducció a les noves àrees i la seva relació amb la colonització del Nord d'Amèrica.

4.2. POLIMORFISME CROMOSÒMIC DE DROSOPHILA SUBOBSCURA

4.2.1. *Polimorfisme per inversions poblacional*

A la taula 4.2 es presenten les freqüències dels diferents ordenaments del cromosoma O detectats a cadascuna de les poblacions analitzades. Com que en estudis anteriors no es van detectar diferències significatives entre el polimorfisme cromosòmic del cromosoma O obtingut dels mascles salvatges i el de mascles descendents de femelles salvatges (Solé, 2002; Araúz, 2009), en el present estudi es considera el polimorfisme global. Tenint en compte totes les poblacions, s'han trobat un total de 14 ordenaments diferents dels més de 40 descrits per al cromosoma O a la regió Paleàrtica (Krimbas, 1992). No s'ha trobat cap ordenació no descrita anteriorment.

Els ordenaments O_{ST}, $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+8}}$ s'han trobat a totes les poblacions. L'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$, que és un ordenament típic del Sud d'Europa, es troba en molt baixa freqüència al nord dels Pirineus però només manca a la població de Groningen. Per altra banda, els següents ordenaments només es van trobar en una de les poblacions:

- O_6 i $O_{\underline{3+4+12}}$ a la població de Groningen
- $O_{\underline{3+4+6}}$ i $O_{\underline{3+4+13}}$ a la població de Barcelona
- $O_{\underline{3+4+17}}$ a la població de Rasquera

Pel que fa a la diversitat cromosòmica, veiem que Rasquera és la població més polimòrfica ja que presenta fins a 10 ordenaments cromosòmics diferents, tot i que sembla que, en general, les poblacions mediterrànies tenen un polimorfisme cromosòmic major que la resta de poblacions, sobretot València, Rasquera, Barcelona i Montpellier. A la taula 4.2 es poden veure els valors de riquesa al·lèlica (considerant el mateix número d'individus analitzat a totes les poblacions, n=93) i d'heterozigositat esperada.

A la població de Barcelona les freqüències cromosòmiques obtingudes van ser una mica diferents a les esperades atenent la seva localització al sud d'Europa (Krimbas, 1992). Contràriament al que es podria esperar, l'ordenament O_{ST} va resultar ser el segon més freqüent (26.87%) mentre que l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ gairebé no va arribar a un 5% de freqüència. Aquest fet ens va plantejar la necessitat de comparar el polimorfisme cromosòmic de les nostres poblacions amb el polimorfisme descrit en captures anteriors. Així, el polimorfisme de les poblacions de Málaga, València, Montpellier i Groningen es van comparar

amb les captures "noves" de l'estudi de Solé (2002), mentre que el de Barcelona es va comparar amb l'obtingut en l'estudi d'Araúz (2009). En Araúz (2009) el polimorfisme es va analitzar en línies homocariotípiques, i per tant després de dues generacions d'encreuaments amb *chcu*. Per això, la comparació del polimorfisme en aquest cas s'ha dut a terme amb les freqüències cromosòmiques obtingudes en les nostres línies homocariotípiques de Barcelona, ja que en el procés d'extracció dels cromosomes en homozigosi es poden perdre per atzar en el primer encreuament amb *chcu* alguns dels ordenaments minoritaris. Les poblacions de Rasquera i Dijon no havien estat capturades amb anterioritat i, per tant, no es van poder fer comparacions.

Taula 4.2: Polimorfisme cromosòmic de les 7 poblacions estudiades. A les darreres files, trobem el número d'individus analitzats a cada població (n), el valor d'heterozigositat esperada (H_e) i el de riquesa al·lèlica (R. A.).

	Málaga	**València**	**Rasquera**	**Barcelona**	**Montpellier**	**Dijon**	**Groningen**
O_{ST}	4,95	2,15	7,38	26,87	23,65	52,35	54,61
O_6	-	-	-	-	-	-	0,66
O_7	-	1,08	0,82	0,50	-	-	-
O_{3+4}	31,68	32,26	43,44	32,34	34,46	24,16	21,71
O_{3+4+1}	0,99	-	4,92	3,98	2,03	-	-
O_{3+4+2}	2,97	2,15	1,64	1,99	-	-	-
O_{3+4+6}	-	-	-	0,50	-	-	-
O_{3+4+7}	52,48	46,24	22,13	4,98	1,35	0,67	-
O_{3+4+8}	6,93	11,83	16,39	26,37	36,49	22,82	21,05
O_{3+4+12}	-	-	-	-	-	-	1,97
O_{3+4+13}	-	-	-	0,50	-	-	-
O_{3+4+17}	-	-	0,82	-	-	-	-
O_{3+4+22}	-	3,23	1,64	0,50	0,68	-	-
$O_{3+4+23+2}$	-	1,08	0,82	1,49	1,35	-	-
n	101	93	122	201	148	149	152
H_e	0,622	0,673	0,733	0,752	0,696	0,621	0,609
R.A	5,994	8,000	9,827	9,111	7,567	3,856	4,832

Les dates de captura de les poblacions amb les que vam comparar els nostres resultats així com les dades de polimorfisme cromosòmic, es mostren a la taula 4.3. Al comparar el polimorfisme entre les dues dates estudiades, trobem diferències significatives en la composició per a les poblacions de València, Barcelona i Montpellier.

Les diferències a la població de València (χ^2 = 24,30; p-valor = 0,0038; g.d.l. = 9) són degudes a un dèficit de l'ordenament O_{ST} a la població del 2008, en detriment de les ordenacions O_{3+4} iO_{3+4+7}. Aquestes diferències es podrien per processos de microdiferenciació descrits a *D.*

subobscura (Krimbas, 1993), ja que les dues zones de captura estan físicament allunyades. Com s'ha comentat a Material i Mètodes, la zona on es va capturar l'any 1998 estava destrossada per les pluges i vam mostrejar en una àrea de bosc de pins situada a uns 9 km de Riba-Roja. Una altra explicació podria ser el fet que les dues captures es van realitzar en estacions diferents, la població antiga a la primavera i la població del 2008 a la tardor. Canvis estacionals de polimorfisme cromosòmic ja s'han estudiat i observat per a aquesta espècie (Fontdevila *et al.*, 1983; Rodriguez-Trelles *et al*., 1996; Zivanovic, 2007) i on s'han registrat canvis en la freqüència d'alguns ordenaments cromosòmics. Fontdevila *et al.*, (1983) van estudiar la població d'El Pedroso (Galícia) i van detectar canvis estacionals pels ordenaments O_{ST} i $O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$, on el darrer presentava un pic a l'estiu i la seva freqüència disminuïa a la primavera i tardor, mentre que O_{ST} presentava el comportament oposat. A més, per a la mateixa població, Rodriguez-Trelles *et al* (1996), van trobar una forta associació entre els canvis estacionals i diversos factors climàtics (temperatura, humitat, etc.).

Taula 4.3: Comparació del polimorfisme cromosòmic de 5 de les poblacions estudiades. Tret de Barcelona, on la captura prèvia va ser fa 4 anys, la resta de poblacions es mostrejaren 10 anys enrere.

	Málaga		**València**		**Barcelona**		**Montpellier**		**Groningen**	
	Maig	**Octubre**	**Març**	**Octubre**	**Octubre**	**Octubre**	**Octubre**	**Setembre**	**Juliol**	**Agost**
	1998	**2008**	**1998**	**2008**	**2004**	**2007**	**1998**	**2009**	**1999**	**2009**
O_{ST}	8,00	4,95	14,80	2,15	11,30	27,41	36,20	23,65	50,20	54,61
O_{6}	-	-	-	-	0,87	-	0,30	-	1,90	0,66
O_{7}	2,00	-	2,80	1,08	-	-	-	-	-	-
O_{11}	0,70	-	-	-	-	-	-	-	0,90	
$O_{\underline{3+4}}$	34,00	31,68	24,40	32,26	32,17	27,92	31,50	34,46	17,90	21,71
$O_{\underline{3+4}+\underline{1}}$	5,30	0,99	6,80	-	4,35	3,05	2,10	2,03	0,90	-
$O_{\underline{3+4}+\underline{2}}$	2,00	2,97	3,20	2,15	1,74	3,55	2,10	-	-	-
$O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$	38,00	52,48	34,80	46,24	17,39	3,05	0,90	1,35	-	-
$O_{\underline{3+4+8}}$	6,70	6,93	8,00	11,83	27,83	31,98	24,20	36,49	22,60	21,05
$O_{\underline{3+4}+\underline{12}}$	-	-	-	-	-	0,51	-	-	3,80	1,97
$O_{\underline{3+4}+\underline{17}}$	0,70	-	2,00	-	-	-	-	-	-	-
$O_{\underline{3+4}+\underline{22}}$	1,30	-	2,00	3,23	3,48	0,51	1,50	0,68	0,90	-
$O_{\underline{3+4+13}+\underline{12}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	0,90	-
$O_{\underline{3+4+23}+\underline{2}}$	1,30	-	1,20	1,08	0,87	2,03	1,20	1,35	-	-
n	150	101	250	93	115	201	339	148	106	152

El punt de mostreig sí que va ser el mateix en el cas de les dues mostres de la població de Barcelona, i tot i així es van trobar diferències significatives entre les dues captures (χ^2 = 35,64; p-valor ≤0,0001; g.d.ll. = 9). A la captura del 2007 l'ordenament més freqüent va ser l'$O_{\underline{3+4+8}}$

(31.96%); els ordenaments O_{ST}, $O_{\underline{3+4}}$ presentaren freqüències semblants (27.84% i 27.32%, respectivament) i l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ va aparèixer a baixa freqüència (3,55%). Aquest resultat va ser força sorprenent, sobretot pel que fa a l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ ja que aquest és un ordenament típic del Sud d'Europa i esperaríem trobar una freqüència major. Comparant amb els resultats d'Araúz *et al.* (2009), veiem que la captura de l'any 2004 mostra una composició del polimorfisme cromosòmic més típica per al cromosoma O en aquesta població, on l'ordenament més freqüent fou el $O_{\underline{3+4}}$ (31.62%) i l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ va representar un 17.09% del total, mentre que l'O_{ST} només representava un 11,30%. Al contrari del que trobem a València, aquestes diferències no s'explicarien pels canvis de freqüència a llarg termini, relacionats amb l'increment de temperatura global, ja que el temps transcorregut entre les dues mostres és molt curt i en canvi si es podria relacionar en canvis a curt termini associats a la climatologia. Val a dir que la mostra de Barcelona va ser bastant complicada d'aconseguir degut a les condicions climàtiques, ja que la tardor de 2007 va ser molt freda i per obtenir la població va ser necessari mostrejar durant tres dies. En comparar les temperatures mitjanes del mes d'octubre (dades de l'observatori Fabra, situat a 1'5km del lloc de captura) dels dos anys s'observa que difereixen en 2'5 graus, sent més freda durant el 2007. Aquestes condicions climàtiques adverses es podrien relacionar amb les majors freqüències de l'ordenament O_{ST}.

Finalment, també es van trobar diferències significatives per a la població de Montpellier (χ^2 = 14.55; p-valor = 0,024; g.d.ll.= 6). En aquest cas, aquestes diferències van ser degudes a un excés de l'ordenament $O_{\underline{3+4+8}}$ en la població del 2009, que passa a ser el més freqüent, i a la baixada de freqüència de l'O_{ST}, que era l'ordenament més freqüent de la captura de 1998. L'explicació en aquest cas podria ser el canvi de polimorfisme a llarg termini que ja s'ha observat per a aquesta espècie (Balanyà *et al.,* 2004, 2006) on s'han registrat canvis en la freqüència de molts ordenaments cromosòmics en el sentit que s'esperaria si aquest polimorfisme estigués responent al canvi climàtic. Així doncs, l'ordenament càlid $O_{\underline{3+4+8}}$ està augmentant mentre que l'ordenament fred O_{ST} està disminuint la seva freqüència en totes les poblacions europees (Solé *et al.,* 2002, Balanyà *et al.,* 2004). No es pot descartar que les diferències s'expliquin per l'estacionalitat del polimorfisme ja que les captures és van fer en mesos diferents. La mostra nova es va realitzar l'1 de Setembre (quan encara és estiu) i l'antiga és va dur a terme a finals d'Octubre (quan ja és la tardor), això podria explicar la major freqüència de l'ordenament càlid a la mostra agafada a finals de l'estiu que a la mostra de principis de la tardor.

4.2.2. *Clines latitudinals d'inversions*

A la figura 4.1, es poden observar els diagrames de barres de les freqüències dels ordenaments majoritaris del cromosoma O. És a dir, que només s'han analitzat els que estaven presents almenys en 6 de les mostres. Per saber si els ordenaments es distribuïen segons una clina latitudinal, es va calcular la regressió entre la freqüència transformada de l'ordenament ($\arcsin\sqrt{p}$) a cada població amb la latitud (O_{ST}: *b* =0,893, p-valor = 0,007; $O_{\underline{3+4}}$: *b* = -0,698, p-valor = 0,081; $O_{\underline{3+4+8}}$: *b* = 0,487, p-valor = 0,267; $O_{\underline{3+4+7}}$: *b* = -0.892;p-valor = 0,017). A les gràfiques, les poblacions s'han ordenat de menor a major latitud per tal de reflectir la distribució clinal dels ordenaments.

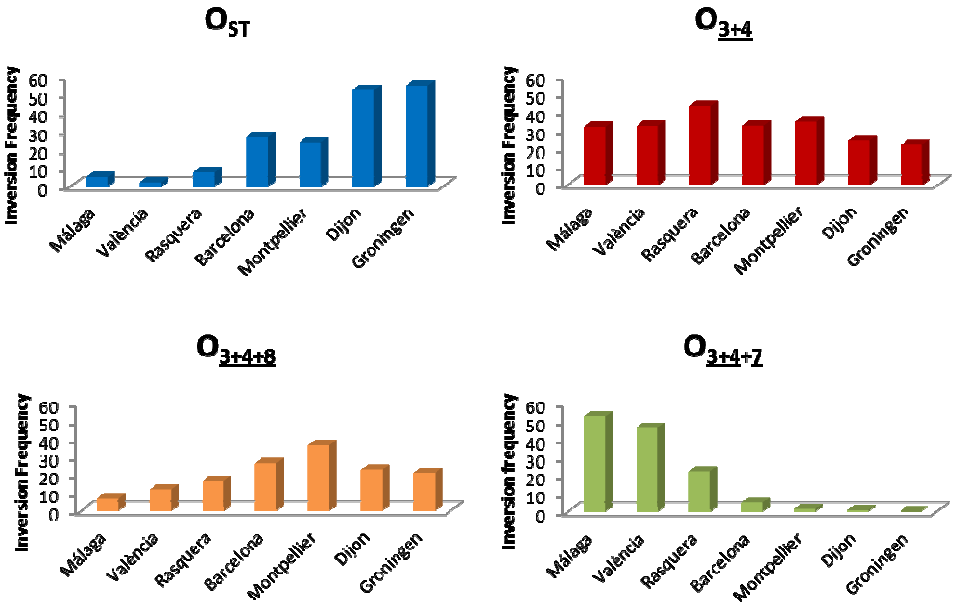


Figura 4.1: Freqüències dels ordenaments O_{ST}, $O_{\underline{3+4}}$, $O_{\underline{3+4+8}}$ i $O_{\underline{3+4+7}}$ en les 7 poblacions analitzades.

Podem observar que els ordenaments O_{ST}, i $O_{\underline{3+4+7}}$ mostren una marcada clina latitudinal de freqüència i de signe oposats: l'ordenament O_{ST} és més freqüent al Nord i disminueix de freqüència a mesura que la població se situa més al sud, mentre que a l'$O_{\underline{3+4+7}}$ la clina es dóna en la direcció oposada, de Sud a Nord. A més, comparant les freqüències noves amb les antigues, es veu que l'O_{ST} disminueix de freqüència a València i Montpellier, tot i que augmenta a Barcelona.

Per contra, l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ presenta una regressió negativa amb la latitud tot i que no significativa. A les mostres de Solé (2002) analitzant un total de 13 poblacions europees aquest ordenament presenta un valor del coeficient de regressió *b* = -0'496, i una P<0.05. En canvi

aquest ordenament no presenta cap clina latitudinal significativa a la regió colonitzada (Balanyà *et al.,* 2003).

Una tendència sorprenent s'observa per l'ordenament O_{3+4+8}. Aquest, tradicionalment s'havia considerat de distribució típicament mediterrània, amb valors de freqüència propers al 100% al Nord d'Àfrica (Krimbas and Loukas, 1980) i correlació significativa amb la latitud (Menozzi and Krimbas, 1992). En canvi, en estudis més recents la correlació deixa de ser significativa i, a més, el signe de la regressió canvia, ja que es troba al Nord d'Europa amb una freqüència de fins el 20% (Solé, 2002). En el present estudi, la regressió amb la latitud es manté positiva (tot i que no significativa). Això és degut sobretot a que la seva freqüència a la mostra del 2009 ha augmentat a Montpellier, en comparar-la amb la mostra de l'any 1999.

Tenint en compte el treball de Menozzi and Krimbas (1992) els ordenaments cromosòmics es poden dividir en 3 grans grups: els que correlacionen positivament amb la latitud, els que correlacionen negativament i els que no presenten correlació significativa amb la latitud. Segons aquesta divisió, podem considerar que l'ordenament O_{ST} és un ordenament típicament fred (és a dir, correlacionat positivament amb la latitud), mentre que els altres tres ordenaments analitzats en aquest treball es consideren càlids. En estudiar els canvis al llarg del temps del polimorfisme cromosòmic de *D. subobscura*, Solé (2002), seguint la mateixa agrupació, va concloure que els ordenaments típics de latituds càlides tenen una clara tendència a augmentar de freqüència mentre que els ordenaments típics de latituds fredes estan disminuint, relacionant els canvis amb canvis en la temperatura o en d'altres factors climàtics relacionats probablement amb l'escalfament global del planeta. Els nostres resultats suggereixen que l'ordenament O_{ST} ha disminuït de freqüència a localitats mediterrànies alhora que ha augmentat la freqüència d'O_{3+4+7}, en concordança amb el descrit prèviament.

El fet que els nostres resultats no mostrin una clina latitudinal pels ordenaments O_{3+4} i O_{3+4+8}.no vol dir que aquesta no es doni. De fet, si es representa la freqüència dels ordenaments separant el cromosoma per regions, els resultats per a l'ordenament O_{3+4} varien una mica (Figura 4.2) i es pot veure més clarament la tendència d'aquest ordenament a disminuir de freqüència cap al nord d'Europa, amb un coeficient de regressió *b*= -0.93 i un p-valor= 0'003. D'aquesta manera, pot ser que l'ordenament O_{3+4} sigui adaptatiu a ambients més càlids, però l'ordenament O_{3+4+7} deu aportar algun avantatge extra, i per això és molt més freqüent al Sud d'Europa.

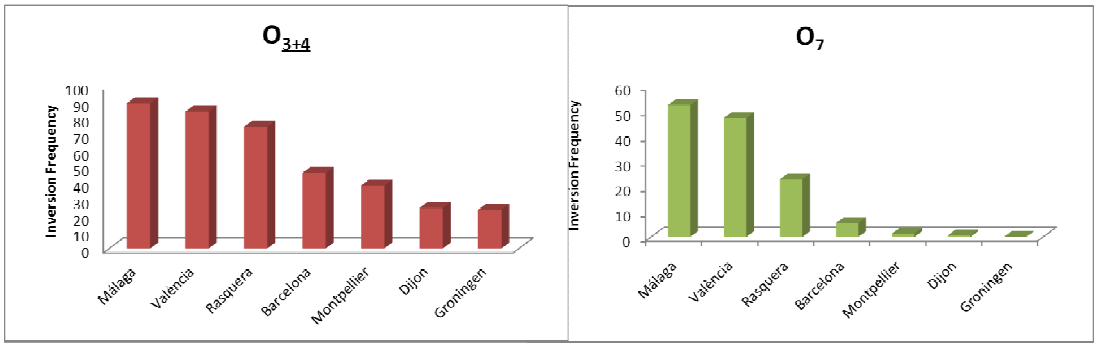


Figura 4.2: Freqüències dels ordenaments per regió. A la regió I es representa la freqüència de l'ordenament O_{3+4}, i a la regió II la freqüència de la inversió O_7 en les 7 poblacions analitzades.

Pel que fa a l'ordenament O_{3+4+8}, el fet que no presenti clina no vol dir que no sigui adaptatiu. Aquest ordenament ha patit un gran increment en els darrers anys (Balanyà *et al.*, 2004; Rezende *et al.*, 2010), per tant alguna avantatge ha de donar als seus portadors. A les poblacions del Sud d'Europa potser és poc freqüent per competència amb el més freqüent O_{3+4+7}, però a partir dels Pirineus, en quant la freqüència de l'O_{3+4+7} disminueix, aquest ordenament és el que més ha augmentat.

Els ordenaments cromosòmics són adaptatius, però les seves clines no tenen perquè ser fixes en el temps, sinó que pot ser que es comportin com a estructures dinàmiques al llarg del temps. S'ha estat assumint que el motor de l'adaptació era la temperatura, però potser no és el factor que més afecta en la formació de les clines com ja es va intuir als treballs de Santos *et al.* (2004, 2005), sinó que molts altres factors poden ser determinants per la seva distribució com ara la humitat, la densitat o el fotoperíode entre altres.

4.3. DETECCIÓ DE MUTANTS ESTRUCTURALS

A l'obtenir les línies homocariotípiques, si el cromosoma O del camp conté mutacions recessives, aquestes passen a estar en homozigosi i, per tant, es veurà el seu fenotip. S'ha de tenir en compte que amb el patró d'encreuaments, altres cromosomes o fragments de cromosomes també poden quedar en condició homocariotípica. Per tant, una mutació que aparegui en alguns descendents i en d'altres no, segurament serà una mutació no localitzada en el cromosoma O.

Al realitzar el patró d'encreuaments descrits a Material i Mètodes, es van obtenir 3 mutants morfològics a la població de Málaga (Calabria *et al.* 2009; Calabria and Mestres 2009; veure apèndix). Totes elles varen ser mutants que afectaren la morfologia de l'ala, per tant, molt fàcilment observables i per això es van classificar dins del rang RK1 (Lindsley and Grell, 1968). Dels tres mutants, només un havia esta descrit anteriorment a *Drosophila subobscura*.
A la línia MAm17 vam trobar el mutant que vam anomenar *aa* (al*es* al*terades*) degut a que presentava una reducció de la llargada i alteracions en el patró de venes de les ales, amb noves venes transversals. A més, com que la presentaven tots els individus no *Varicose*, es va determinar que estava localitzada en el cromosoma O. La línia MAf39 també portava un mutant de l'ala, aquesta caracteritzada per la disposició anormal de les ales, que semblava que estaven caigudes. El mutant es va anomenar al*es caigudes* (*ac*). De la mateixa manera que el mutant anterior, es va determinar que es localitzava en el cromosoma O. Finalment, la línia MAf30 també va presentar anomalies en l'ala. En aquest cas en forma de lobulacions de l'àrea distal de l'ala, semblant al mutant *dumpy* (*dp*) de *Drosophila melanogaster*. Com que es van obtenir individus de fenotip salvatge, mutants *dumpy* i dobles mutants *Varicose-dumpy*, es va concloure que era una mutació recessiva no localitzada al cromosoma O. Aquest mutant ja havia estat descrit amb anterioritat (Krimbas, 1993). La descripció dels tres mutants amb les seves fotos corresponents es poden consultar a l'apèndix.

4.4. ANÀLISI GENÒMIC DE LES INVERSIONS DEL CROMOSOMA O UTILITZANT LOCI MICROSATÈL·LITS.

1. Variabilitat genètica de les poblacions

La diversitat genètica amb els loci microsatèl·lit va ser molt elevada a totes les poblacions analitzades. A la Taula 4.4 es donen els valors de diversitat genètica per a l'He (heterozigositat esperada) i la A.R. (riquesa al·lèlica). La AR va ser estimada a partir de 10 cromosomes que és el nombre mínim de cromosomes en tots els ordenaments i poblacions, a excepció de l'O_{ST} a València, que no es va utilitzar.

Taula 4.4: Valors de diversitat genètica en els diferents ordenaments i poblacions. Els valors de riquesa al·lèlica es van obtenir a partir d'un nombre mínim de 10 cromosomes.

	He				Riquesa al·lèlica			
	O_{ST}	$O_{\underline{3+4}}$	$O_{\underline{3+4+8}}$	$O_{\underline{3+4+7}}$	O_{ST}	$O_{\underline{3+4}}$	$O_{\underline{3+4+8}}$	$O_{\underline{3+4+7}}$
Groningen	0,834	0,869	0,870	-	6,972	7,637	7,597	-
Dijon	0,836	0,882	0,880	-	7,082	7,736	7,578	-
Montpellier	0,813	0,869	0,858	-	6,537	7,544	7,334	-
Barcelona	0,842	0,872	0,866	0,853	6,965	7,560	7,473	6,654
Rasquera	0,796	0,873	0,895	0,852	5,798	7,378	7,700	7,012
València	0,7000	0,887	0,860	0,878	-	7,896	6,571	7,539
Málaga	0,839	0,874	0,888	0,871	5,651	7,699	6,306	7,310

La normalitat de les dades (freqüències de les inversions a les poblacions, i riquesa al·lèlica) es va testar amb el test de Kolmogorov-Smirnov. Cap dels tests va donar significatiu, per tant, acceptem distribució normal de les dades i per a totes les anàlisis es fa ver servir l'estadística paramètrica. En primer lloc es va analitzar si existeixen diferències significatives entre els diferents ordenaments amb un t-test (Taula 4.5). Els resultats varen ser iguals per als dos paràmetres de diversitat. Tant en el cas de l'heterozigositat esperada com per la riquesa al·lèlica, es troben diferències significatives entre els ordenaments quan la comparació inclou l'ordenament O_{ST} (Taula 4.5), que a més és l'ordenament que presenta menys variabilitat a totes les poblacions (Taula 4.4).

Taula 4.5: Valors de t i la seva significació en la comparació entre ordenaments dels valors de diversitat genètica (He: Heterozigositat esperada i AR: riquesa al·lèlica).

	He			AR		
	t	df	p-valor	t	df	p-valor
O_{ST} x $O_{\underline{3+4}}$	4,479	5	**0,007**	4,479	5	**0,007**
O_{ST} x $O_{\underline{3+4+8}}$	3,792	5	**0,013**	3,792	5	**0,013**
$O_{\underline{3+4}}$ x $O_{\underline{3+4+8}}$	1,633	6	0,154	1,633	6	0,154

Per comprovar si existeix alguna relació entre la riquesa al·lèlica i la freqüència de la inversió a la població, s'ha calculat la regressió de l'AR sobre la freqüència de l'ordenació sota els models lineal, quadràtic i sigmoïdal (S, un cas especial de la funció logística que presenta forma de S). L'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ no s'ha inclòs en l'anàlisi ja que només s'ha pogut analitzar en 4 poblacions degut a la seva baixa freqüència en les poblacions al nord dels Pirineus (Figura 4.1). L'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ no s'ajusta a cap dels models, ni considerant el cromosoma sencer ni separant-lo per regions (Taula 4.6). Els models de regressió quadràtica i S (o funció sigmoïdal, que és un cas especial de la funció logística que presenta forma d'S), són els que millor s'ajusten a les dades dels ordenaments restants. Quan s'analitza la relació per regions, tots els models ajusten bé les dades de la regió I de l'ordenament $O_{\underline{3+4+8}}$, mentre que la distribució de les dades de l' O_{ST} s'ajusta als models lineal i S. Pel que fa a la regió II, només l'ordenament O_{ST} presenta relacions significatives entre la variabilitat i la freqüència de l'ordenament. El model S presenta en tots els casos (excepte l'O_{ST} de la regió I) el menor p-valor (Taula 4.6).

En canvi, quan s'analitza si hi ha alguna relació entre la variabilitat i la localització geogràfica de la població (latitud), en cap cas trobem relacions significatives.

Efecte llindar en la variabilitat genètica de les poblacions.

Mitjançant una anàlisi de la variància es va estudiar si el menor nombre d'individus d'alguns ordenaments a les poblacions del sud d'Europa pot afectar la variabilitat. Es van establir dos grups per a cada ordenament en funció de si la seva freqüència en la població era inferior o superior al 15%. Per a determinar aquest valor de freqüència, per a cada ordenament es va calcular la mitjana de les riqueses al·lèliques de la població i es va mirar en quin punt el valor resultant tallava la distribució S.

Taula 4.6: Valors d'R^2 pels diferents models d'ajustament testats (L: regressió lineal; Q: regressió quadràtica; S: regressió S) amb la seva significació associada.

		Global			Regió I			Regió II		
		R^2	F	p-valor	R^2	F	p-valor	R^2	F	p-valor
$O_{\underline{3+4}}$	L	0,301	2,150	0,202	0,017	0	0,781	0,348	2,674	0,163
	Q	0,553	2,476	0,2	0,574	2,695	0,181	0,372	1,184	0,395
	S	0,231	1,503	0,275	0,055	0	0,613	0,323	2,386	0,183
$O_{\underline{3+4+8}}$	L	0,479	4,590	0,085	0,706	12,015	**0,018**	0,346	2,646	0,165
	Q	0,833	9,997	**0,028**	0,908	19,729	**0,008**	0,719	5,120	0,079
	S	0,689	11,096	**0,021**	0,875	34,959	**0,002**	0,543	5,936	0,059
O_{ST}	L	0,859	24,405	**0,008**	0,772	13,565	**0,021**	0,831	19,691	**0,011**
	Q	0,965	41,790	**0,006**	0,778	5,245	0,105	0,984	92,702	**0,002**
	S	0,954	82,431	**0,001**	0,728	10,698	**0,031**	0,963	105,248	**0,001**

Pels tres ordenaments s'observa una caiguda en la riquesa al·lèlica si la freqüència de l'ordenament és menor del 15% (F=11'378, p < 0.0001; Figura 4.3) però no es van trobar diferències significatives entre els ordenaments (F=2'848, p = 0'06) ni en la interacció entre els dos factors (F=0'281, p = 0'755). L'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ no es va incloure ja que la seva freqüència és superior al 15% en totes les poblacions.

Si analitzem l'AR *locus* per *locus* també s'observa una menor variabilitat quan l'ordenament és poc freqüent en tots els *loci* excepte en els menys variables (Figura 4.4). En aquest cas es van trobar diferències significatives entre *loci* (F= 24'546, p < 0.000), diferències significatives segons la freqüència de l'ordenament a la població (F= 41'282, p < 0.000) però no en la interacció entre els dos factors (F= 1'481, p = 0'133). A més, a la figura es pot observar que les diferències entre els dos grups de freqüència es donen en gairebé tots els *loci*, excepte en alguns loci, incloent els dos que són menys polimòrfics.

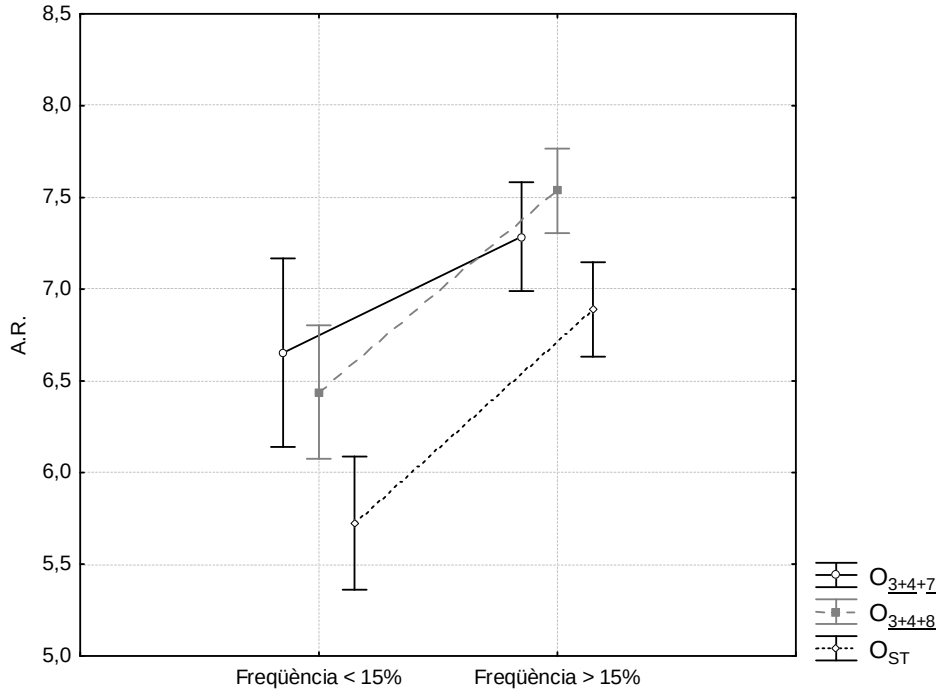


Figura 4.3: Comparació de la riquesa al·lèlica entre els grups de poblacions en funció de la freqüència de l'ordenament. Les barres verticals corresponen a l'error estàndard.

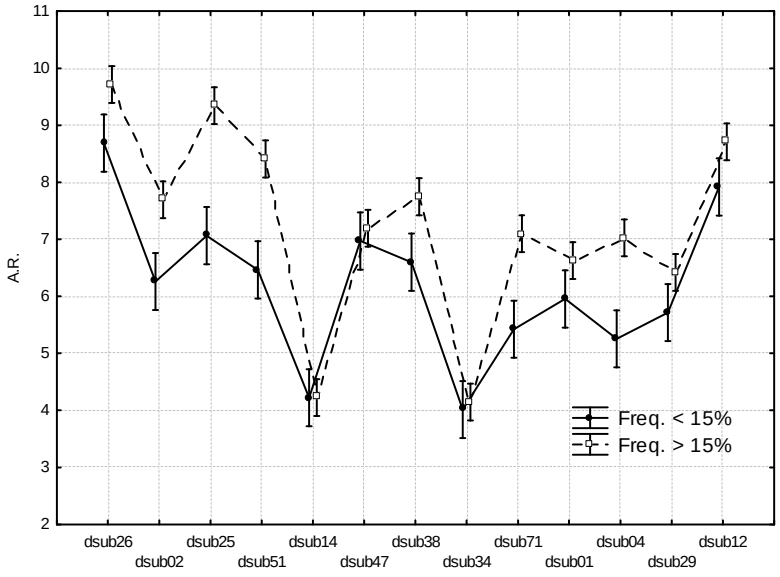


Figura 4.4: Riquesa al·lèlica *locus* a *locus* comparant-la en el cas que la freqüència sigui baixa. Es pot observar que només en els *loci* poc variables no disminueix la riquesa al·lèlica.

Existeixen diferències de variabilitat entre ordenaments?

Existeixen diferències significatives en la diversitat genètica a nivell de població, ordenament i *locus*, així com en les interaccions Població x Ordenament i Ordenament x *Locus* (Taula 4.7). Així doncs, de les interaccions obtingudes en els resultats podem concloure que: (i) el mateix ordenament no té la mateixa riquesa al·lèlica a totes les poblacions, ja que pot ser més o menys divers en una població en funció de la freqüència del mateix en la població, seguint un efecte llindar. I (ii) que els *loci* microsatèl·lit presenten diferent riquesa al·lèlica depenent de l'ordenament considerat.

Taula 4.7: Resultats del *mixed model*. En negreta es mostren els valors significatius.

Font de variació	g.ll.	Quadrats Mitjans	*F*	p-valor
Població	6	0,107	3,492	**0,004**
Ordenament	3	0,726	4,986	**0,005**
locus	12	2,412	14,736	**0,000**
Pobl x Ord	14	0,104	4,588	**0,000**
Pobl x Loc	72	0,031	1,203	0,161
Ord x Loc	36	0,146	6,403	**0,000**

Per tal de saber si tots els *loci* es comporten de la mateixa manera o si la diversitat genètica depèn de la seva localització en el cromosoma, a la Figura 4.5 es representen els valors de riquesa al·lèlica de cada ordenament per a cada *locus*, i a la Taula 4.8 es mostren els valors de les ANOVAs realitzades *locus* a *locus*. Es pot observar que, en general els valors de riquesa al·lèlica en tots els ordenaments mostren un patró similar, sobretot pel que fa a la regió II del cromosoma. L'excepció en aquesta regió l'aporta el *locus* dsub25, que presenta una riquesa al·lèlica significativament menor en l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$. L'explicació a aquest succés pot estar en la localització d'aquest *locus*, dins de la inversió O_7 i prop del punt de trencament proximal. Dels quatre ordenaments analitzats, aquest és l'únic que conté una inversió en la regió II. Els altres tres ordenaments tenen la configuració estàndard en aquesta regió i per tant poden recombinar lliurament. Així doncs, com que la inversió O_7 inhibeix la recombinació amb els altres ordenaments, podríem esperar una menor variabilitat en ella. Dins d'aquesta inversió hi ha localitzats 4 *loci* més, i en cap d'ells s'aprecia una baixada de variabilitat tan clara. Per tant, més que una baixada de variabilitat associada a un coll d'ampolla al formar-se una inversió, sembla més aviat que prop d'aquest *locus* hi hagi un gen sota l'efecte de la selecció. Tampoc es pot considerar que sigui un efecte del mal aparellament de les cromàtides en el punt de

trencament de la inversió ja que en el *locus* dsub2, situat més a prop del punt de trencament, la variabilitat dels 4 ordenaments no es significativament diferent.

En canvi, a la regió I l'ordenament O_{ST} presenta una pronunciada menor riquesa al·lèlica en la major part dels *loci* situats a la zona afectada per les inversions respecte als altres ordenaments. Això pot ser degut al fet que és l'ordenament més recent o bé a que ha estat seleccionat recentment. En aquesta regió l'excepció és el *locus* dsub12, que està prop del punt de trencament distal de la inversió O_4, en el qual la variabilitat de l'ordenament O_{ST} no és significativament diferent a la resta d'ordenaments.

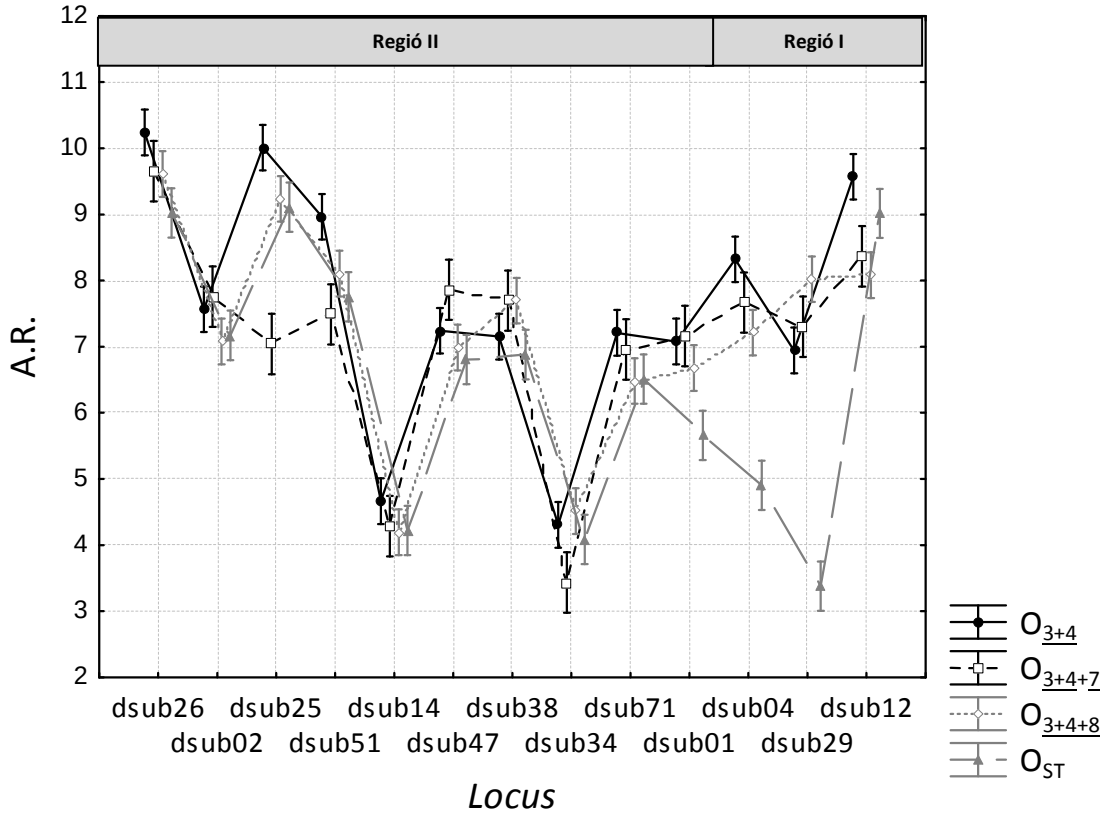


Figura 4.5: Representació de la riquesa al·lèlica mitjana de cada *loci* i ordenament.

Com que cadascun dels 13 *loci* microsatèl·lits presenta un nombre d'al·lels diferents, és normal que es detectin diferències significatives en considerar només el factor *locus*. Per veure amb detall a què és deguda la significació de la interacció entre població i ordenament es va fer una ANOVA. Així, es pot veure que els marcadors que presenten més diferències en la seva diversitat són els que estan localitzats dins o a prop de la regió I del cromosoma (Taula 4.8) i que les diferències són degudes principalment al factor ordenament, ja que l'O_{ST} presenta valors significativament més baixos que els altres tres (Figura 4.5).

Taula 4.8: Valors de la F resultant de l'ANOVA factorial amb els factors fixos població i ordenament. L'ombrejat indica els *loci* situats a la regió I del cromosoma. En negreta es mostren els resultats significatius (*= p-valor < 0.05; ***= p-valor<0.001).

Loci	Població	Ordenament
dsub26	0,937	**3,367***
dsub02	1,572	0,748
dsub25	0,958	**3,773***
dsub51	0,580	1,296
dsub14	1,949	1,547
dsub47	1,438	1,103
dsub38	1,103	1,858
dsub34	0,409	0,991
dsub71	**3,224***	1,500
dsub01	1,269	**4,530***
dsub04	0,549	**13,767*****
dsub29	2,150	**77,73*****
dsub12	0,668	**4,275***

La diversitat dels *loci* de la regió I és força menor per l'ordenament O_{ST}, sobretot pels *loci* dsub04 i dsub29. L'explicació a això podria estar en el fet que l'ordenament O_{ST} és derivat de la inversió O_3, i la menor variabilitat estaria relacionada amb la formació de la inversió. Però tenint en compte que l'edat dels ordenaments O_{ST} i $O_{\underline{3+4}}$ és similar (Pegueroles *et al.*, *submitted*) i que en aquest últim la variabilitat és més alta, la menor variabilitat en l'ordenament O_{ST} ha de ser deguda a un procés de selecció. Aquest raonament es pot aplicar també al *locus* dsub01, que es troba localitzat a la regió II però a la zona d'inhibició de la recombinació entre els ordenaments de la regió I (Pegueroles *et al.*, 2010b) i que la seva diversitat genètica és també menor en l'O_{ST}.

Pel que fa al *locus* dsub12, la significació ve donada per un valor de riquesa al·lèlica significativament menor en l'ordenament $O_{\underline{3+4+8}}$ quan es compara amb l'$O_{\underline{3+4}}$. Això pot ser degut a que aquest *locus* es troba prop del punt de trencament de la inversió O_4 (a uns 410Kb, seguint les distàncies genètiques inferides per Pegueroles *et al.*, (2010) i, per tant, la recombinació en aquest punt podria estar fortament inhibida. La baixada de diversitat entre $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+8}}$ no és evident per als altres dos *loci* presents dins de la inversió O_8 que diferencia aquests dos ordenaments (Figura 4.6), ja que es troben localitzats més centrals a la nansa d'inversió sobretot el locus dusb29, i es poden donar successos de recombinació o de conversió gènica com ja ha estat descrit per a inversions de mida gran.

En termes generals, veiem que els ordenaments portadors de la inversió $O_{\underline{3+4}}$ ($O_{\underline{3+4}}$, $O_{\underline{3+4+7}}$ i $O_{\underline{3+4+8}}$) presenten una variabilitat major que no pas l'ordenament O_{ST}. A més, la diferència de variabilitat és molt més acusada si ens centrem només en la regió I del cromosoma. Per tal de determinar si la baixada de variabilitat en l'ordenament O_{ST} es deguda a selecció, recombinació o bé només a factors històrics, ens hem de fixar si tots els loci es comporten de la mateixa manera o no. Si els resultats obtinguts són deguts a factors històrics associats amb la formació de la inversió, esperaríem que la baixada de variabilitat degut al coll d'ampolla fos generalitzat. A més, si tenim en compte també quina és l'edat de les inversions, esperaríem que els ordenaments més antics mostrin una variabilitat major que els més recents. Ja que tindrien més temps per a que la recombinació actuï. En el cas de *D. subobscura* sabem que la inversió ancestral per a aquesta regió és l'O_3 (Krimbas, 1993) ja que aquesta encara és present a l'espècie germana *D. madeirensis* (Krimbas, 1993). D'aquesta inversió van derivar els ordenaments $O_{\underline{3+4}}$ i O_{ST} i finalment es va formar l'$O_{\underline{3+4+8}}$ a partir de l'$O_{\underline{3+4}}$. Per tant, segons això, els ordenaments O_{ST} i $O_{\underline{3+4}}$ amb una edat semblant (Pegueroles *et al. submitted*) haurien de presentar nivells equivalents de variabilitat i majors que per l' $O_{\underline{3+4+8}}$ en els tres loci de la regió I i això no és el que trobem. La diferència entre $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+8}}$ és més petita per tant pot ser que la recombinació sigui més gran i això augmenti la variabilitat. Aquests dos ordenaments difereixen per la inversió O_8 que té una mida d'aproximadament 7'8Mb (mida calculada a partir del nombre de bandes entre els dos punts de trencament seguint la metodologia emprada a Pegueroles et al. (2010a). Tenint en compte que aquesta mida correspon, seguint als mateixos autors a uns 40 cM, el valor obtingut és superior als 20 cM mínims que ha de tenir una inversió per a que es puguin donar un doble entrecreuament (Navarro *et al.*, 1997). Podem pensar que la recombinació entre aquests dos ordenaments serà elevada.

Quan es crea una inversió, aquesta captura 1 al·lel. Per tant, els nivells de variabilitat presents en l'actualitat seran deguts a tres mecanismes: ja sigui per conversió gènica, mutació o bé mitjançant entrecreuaments entre homocariotips i entre heterocariotips. Com s'ha comentat anteriorment, per la regió I del cromosoma O trobem 3 ordenaments cromosòmics diferents: $O_{\underline{3+4}}$, $O_{\underline{3+4+8}}$ i O_{ST}. Per tant, en els individus heterozigots per a aquestes inversions la recombinació estarà inhibida en major o menor grau , depenent de les inversions involucrades (Figura 4.12). Per exemple, en els individus heterozigots $O_{ST}/O_{\underline{3+4}}$ la recombinació estarà fortament inhibida ja que els dos ordenaments es diferencien per dos inversions imbricades i els loci microsatèl·lit se situen o bé dins de les petites nanses d'inversió (dsub04, dsub29) o bé en el punt de trencament, on les cromàtides no queden ben sinapsades (dsub12). Si l'heterozigot és $O_{ST}/O_{\underline{3+4+8}}$ el locus dsub29 quedaria situat enmig de la nansa de la inversió O_8,

permetent tant la conversió gènica com l'entrecreuament d'ordre parell. En canvi, el locus dsub12 es localitza en un àrea que pot quedar desinapsada i el dsub04 dins d'una petita nansa d'inversió. Així doncs, el dsub29 podria recuperar la variabilitat genètica, però això no s'observa, la qual cosa fa pensar en que aquest locus està prop d'un locus fortament sotmès a selecció. Finalment, els heterozigots $O_{\underline{3+4}}/O_{\underline{3+4+8}}$ es diferencien només per la inversió O_8. En aquest cas, el loci dsub29 queda localitzat al centre de la nansa d'inversió, mentre que els loci dsub04 i dsub12 queden situats a ambdós extrems de la nansa, tot i que sembla que el dsub04 es localitza dins d'una petita nansa que queda ben sinapsada, mentre que el dsub12 no.

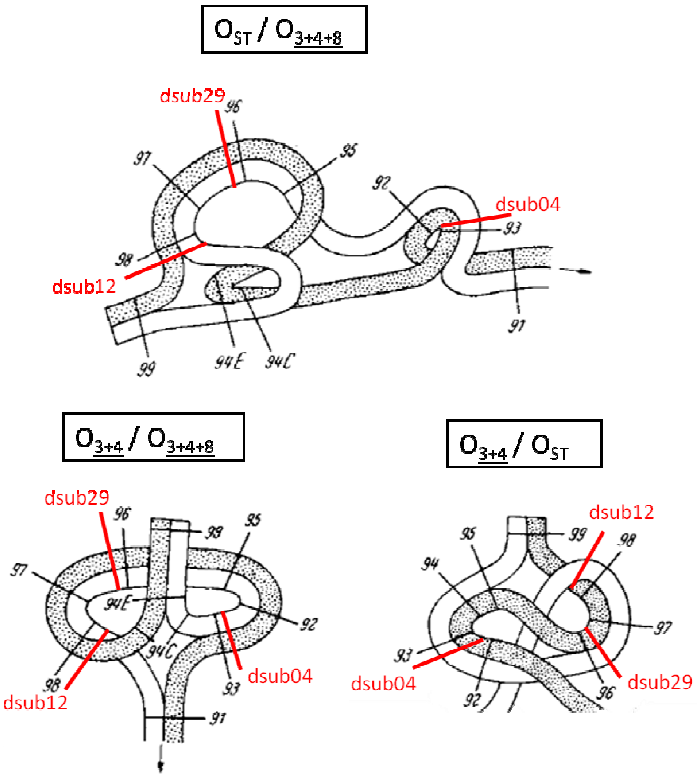


Figura 4.6: Representació esquemàtica de l'aparellament dels cromosomes homòlegs dels individus heterocariotips per als diferents ordenaments cromosòmics de la regió I del cromosoma O considerats en aquest estudi. En vermell es mostra la localització dels 3 loci microsatèl·lits d'aquesta regió.

Per tant, sembla que la menor variabilitat dels loci dsub04 i dsub29 en l'ordenament O_{ST} no es poden explicar només per factors relacionats amb la inhibició de la recombinació o la conversió gènica ja que el dsub29, que és el que mostra menor variabilitat, mai queda situat prop del punt de trencament de la inversió, ni dins d'inversions molt petites. Per contra, els nivells de variabilitat de dsub12, semblants a tots els ordenaments, tampoc s'expliquen ni per recombinació ni per conversió gènica, ja que sempre queda molt a prop del punt de trencament de les inversions, zones on l'intercanvi genètic pot estar altament restringit

(Navarro *et al.,* 1997). De totes maneres, en mirar nivells de recombinació Pegueroles *et al.*, (2010b) van observar individus doble recombinants afectant el locus dsub12 en descendents de femelles heterocariotípiques $O_{\underline{3+4}}/O_{\underline{3+4+8}}$. Així doncs els nostres resultats, on els nivells de variabilitat pel locus dsub12 són alts en poblacions naturals independentment de l'ordenament analitzat, i els de Pegueroles *et al*. (2010b) suggereixen dues possibles hipòtesis: la regió on està localitzat el locus dsub12 és un punt calent de recombinació o els dobles entrecreuaments prop dels punts de trencament no estan tant inhibits com prèviament s'havia considerat (Navarro *et al.*, 2000).

Per a la regió II la variabilitat genètica és similar pels 4 ordenaments analitzats. En aquest cas, per a aquest fragment només tenim dos ordenaments: $O_{\underline{3+4+7}}$ i la resta. Per tant, per a aquesta regió els tres ordenaments $O_{\underline{3+4}}$, $O_{\underline{3+4+8}}$ i O_{ST} poden recombinar lliurement i és per això que la seva variabilitat genètica és similar. En canvi, la recombinació amb l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ estaria inhibida i esperaríem una menor variabilitat en aquest ordenament, però això només s'observa pel *locus* dsub25. En aquest *locus*, a més, presenta al·lels de mida menors que la resta d'ordenaments i s'observa una forta associació amb l'al·lel 251 (molt menor que la mitjana de mida d'al·lels). Per tant, aquesta baixada de variabilitat tan localitzada podria ser deguda a un procés de selecció d'un gen localitzat prop d'aquest microsatèl·lit.

2. Quantes poblacions genèticament diferenciades hi ha?

Per determinar quantes poblacions genèticament diferenciades tenim, es va utilitzar el programa STRUCTURE considerant cada inversió com una subpoblació dins de cada població natural i, per tant, es va treballar amb un total de 24 subpoblacions. A més, es va analitzar tant el contingut genètic global dels cromosomes (els 13 *loci* microsatèl·lits) com separant-lo per regions. Amb el conjunt de simulacions es va calcular la mitjana del logaritme neperià de la probabilitat i la desviació estàndard i es va visualitzar el nombre de K (poblacions) de major probabilitat i menor variància. Paral·lelament, les 24 subpoblacions es van analitzar amb una anàlisi de coordenades principals (PcoA) per veure com s'agrupen les poblacions en un espai bidimensional. Els resultats de les PCoA i els gràfics del logaritme de la probabilitat de k es mostren a la Figura 4.7. A la Figura 4.8, es mostren els resultats del programa STRUCTURE per a les K més probables.

Quan es considera el cromosoma globalment, la gràfica del logaritme neperià de la probabilitat posterior per a cada K ens dóna que el nombre de poblacions ha de ser K=2 i per tant la visualització dels resultats es va fer per a aquest nombre. Tant amb el programa STRUCTURE

com amb la PCoA, veiem que es formen dos grups, un dels quals format per totes les subpoblacions portadores de l'ordenament O_{ST} i l'altre amb la resta d'ordenaments.

Si en comptes d'utilitzar els 13 *loci* microsatèl·lits per realitzar les simulacions, els dividim segons la seva localització en les dues regions del cromosoma i repetim l'anàlisi, els resultats són una mica diferents. Quan s'analitza la regió I podríem dir que K pot ser igual a 2 o 3. Per això, en aquest cas la visualització dels resultats es va fer per a K=2 i K=3. D'aquesta manera, si es considera que K=2 s'observen les mateixes poblacions que ja s'havien vist en considerar el cromosoma sencer, però en visualitzar K=3, apareix, una tercera població formada per tots els ordenaments $O_{\underline{3+4+8}}$. Pel que fa a la PCoA, la primera component separa una altra vegada les poblacions portadores de l'ordenament O_{ST} de la resta i la segona component, separa les poblacions portadores de l'ordenament $O_{\underline{3+4+8}}$. Així doncs, les subpoblacions s'agrupen en relació als ordenaments presents en aquesta regió.

Pel que fa a la regió II, el major valor de la gràfica de ln(K) és per a K=1. Però també podria ser que K=2 ó K=3 ja que aquest últim presenta un valor de logaritme major, tot i que la desviació també sigui més gran. Per tant, en aquest cas es varen visualitzar les dues opcions (Figura 4.8). En el cas de la visualització de K=2, no és possible determinar quines són les dues poblacions. Però al visualitzar K=3, podem veure que s'identifica de manera diferencial una població formada pels individus portadors de l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$. Finalment, la combinació de les dues components principals de la PCoA (Figura 4.7), permet que se separin les poblacions portadores de l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$. A més, amb la PCoA es poden veure clarament quins són els 3 grups que considera el programa STRUCTURE, que corresponen als individus portadors de l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ per una banda, la resta de poblacions per l'altra i el tercer grup seria la subpoblació formada pels individus $O_{\underline{3+4+8}}$ de Málaga, que és molt diferent a la resta.

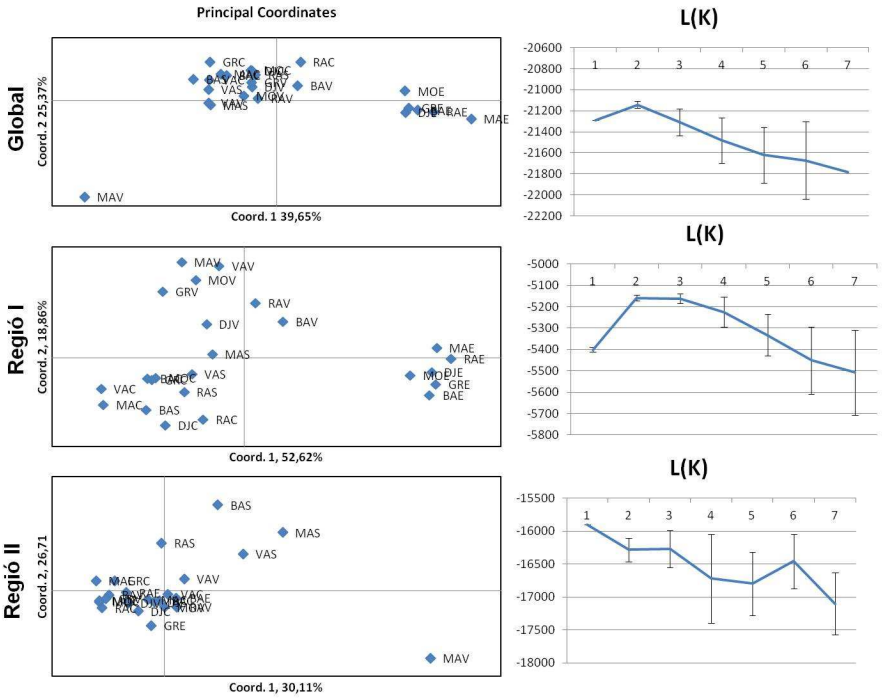


Figura 4.7: Anàlisi de coordenades principals basada en les distàncies de Nei calculada per a cada parella de poblacions (MA: Málaga, VA: València, RA: Rasquera, BA: Barcelona, MO: Montpellier, DJ: Dijon i GR: Groningen) i ordenaments (C: $O_{\underline{3+4}}$, S: $O_{\underline{3+4+7}}$, V: $O_{\underline{3+4+8}}$ i E: O_{ST}).

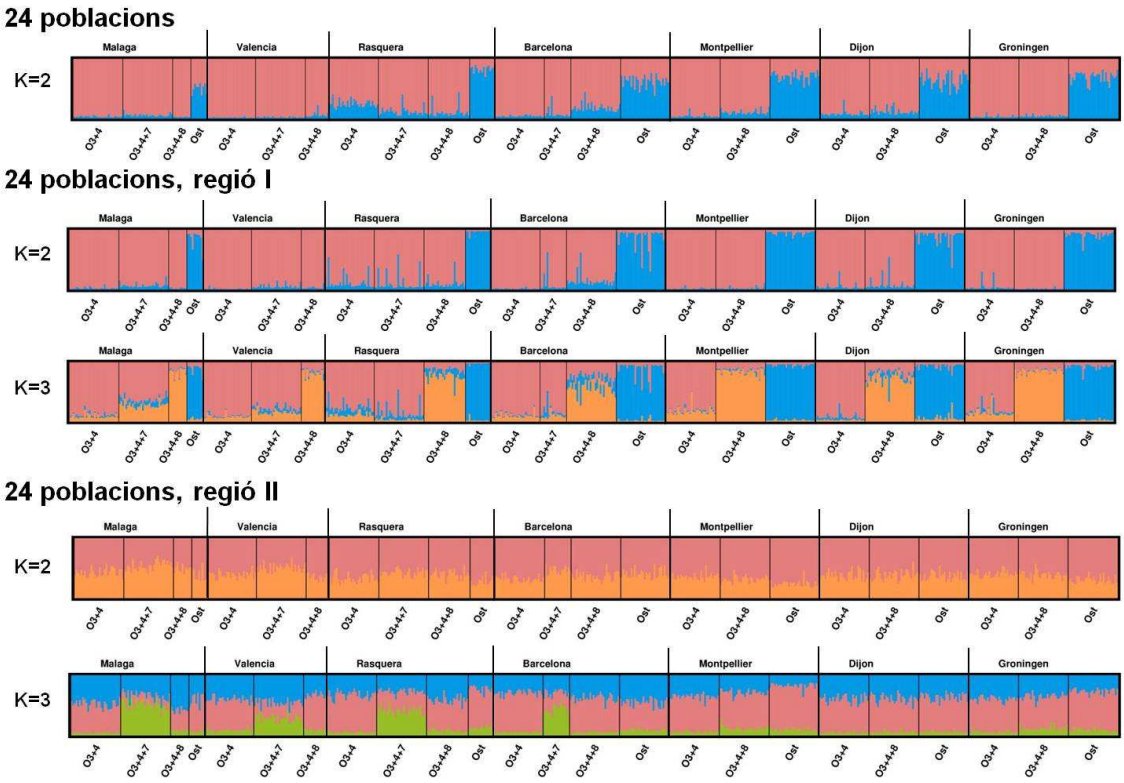


Figura 4.8: Visualització dels resultats de l'STRUCTURE.

Amb els resultats obtinguts, es pot considerar que encara que partim de 7 poblacions naturals, tan sols en tenim 4 grups genèticament diferenciats, que correspondrien als 4 ordenaments analitzats. A més a més, es pot considerar que les dues regions del cromosoma es comporten de manera diferent en relació a les inversions que porten. És a dir, per a la regió I només es troben 3 grups i no 4, ja que els individus $O_{\underline{3+4+7}}$ són en realitat $O_{\underline{3+4}}$ en aquesta regió. De la mateixa manera, per a la regió II només es donen 2 grups, que són els individus que presenten una inversió en aquesta regió ($O_{\underline{3+4+7}}$) contra tots els altres, que són estàndards per a aquest fragment del cromosoma.

3. És el contingut genètic de les inversions constant al llarg de la clina? (F_{ST})

El contingut genètic dels diferents ordenaments entre les diferents poblacions es va mesurar mitjançant els valors de diferenciació genètica. Els resultats de les comparacions dels valors d'F_{ST} i les seves significacions van ser calculats amb el programa Fstat (Goudet, 1995) i es poden observar a la Figura 4.9. Les comparacions es van dur a terme considerant el mateix ordenament a les diferents poblacions, i comparant els diferents ordenaments a la mateixa població i entre les diferents poblacions. En tots els casos, la comparació es va fer considerant les dues regions per separat. Analitzem les dues regions per separat perquè cada regió, com s'ha vist a l'apartat anterior, es comporta de manera diferent degut a que trobem diferents inversions que determinen els patrons de recombinació entre els ordenaments.

Quan s'analitza el mateix ordenament a les set poblacions (Figura 4.9, gràfic A) es pot veure que no hi ha diferències significatives. És a dir, que el contingut genètic d'un ordenament és pràcticament el mateix al llarg de la clina, tant per la regió I com per la regió II. Tan sols s'observa un 4% de comparacions significatives a la regió I a l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ que correspon a que les poblacions de Montpellier i Dijon són diferents. La manca de diferenciació entre poblacions és consistent amb estudis previs on també s'ha trobat que no es donen diferències a nivell de població dins d'un ordenament però si entre els diferents ordenaments cromosòmics a *D. subobscura*. Per exemple, els estudis de Rozas *et al*., (1995, 1999) van comparar el gen *rp49* en tres i dos poblacions, respectivament i no van trobar diferenciació entre les poblacions per a diferents ordenaments de la regió I. A més, aquest patró també s'ha trobat en altres cromosomes de *D. subobscura* (Simões *et al.*, *submitted*,) analitzats a les mateixes poblacions utilitzades en el present estudi, Així com en altres *drosofílids*, com ara *D. pseudoobscura*, on estudiant 4 poblacions, van determinar que no hi havia diferències entre poblacions pels 6 ordenaments analitzats (Schaeffer *et al.*, 2003), o a *D. melanogaster*

(Kennington *et al.*, 2006). Per tant, podríem dir que a D. subobscura cada ordenament té la seva pròpia "identitat" a tot arreu d'Europa. Aquesta gran uniformitat podria ser deguda a les altres taxes de dispersió que presenta aquesta espècie (Serra *et al.*, 1987; Ayala, 1989).

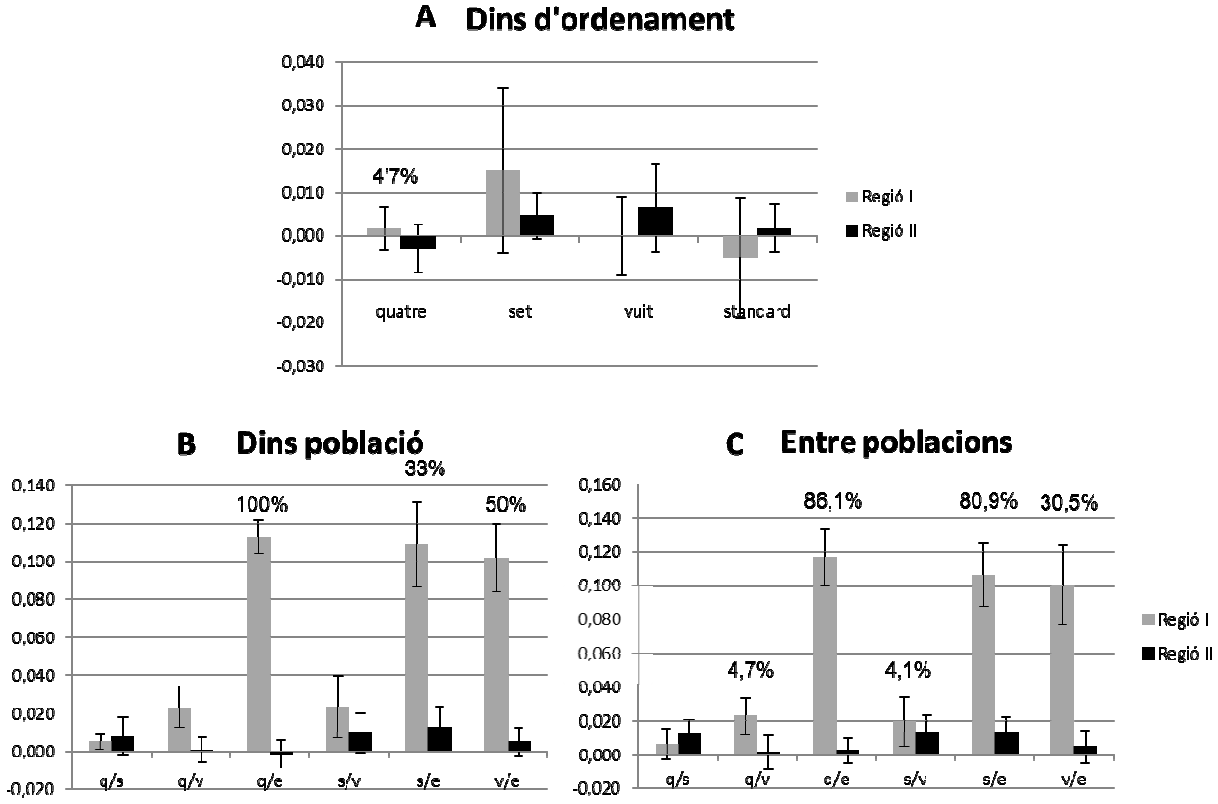


Figura 4.9: Diferenciació genètica (F_{ST}) dels *loci* microsatèl·lit per a cada comparació. (A) Comparant el mateix ordenament en les diferents poblacions, (B) comparant els ordenaments de la mateixa població i (C) comparant ordenaments de les diferents poblacions. Els ordenaments comparats s'anomenen: q/s ($O_{\underline{3+4}}$ amb $O_{\underline{3+4+7}}$), q/v ($O_{\underline{3+4}}$ amb $O_{\underline{3+4+8}}$), q/e ($O_{\underline{3+4}}$ amb O_{ST}), s/v ($O_{\underline{3+4+7}}$ amb $O_{\underline{3+4+8}}$), s/e ($O_{\underline{3+4+7}}$ amb O_{ST}) i v/e ($O_{\underline{3+4+8}}$ amb O_{ST}). Els percentatges sobre les barres indiquen el percentatge de comparacions que mostraven diferències significatives.

Quan s'analitzen les diferències entre els diferents ordenaments dins de la mateixa població (gràfic B de la figura 4.9), veiem que el resultat és diferent si considerem la regió I o II del cromosoma. No es troben diferències significatives per a cap de les comparacions entre ordenaments quan es considera la regió II. En canvi, quan es considera la regió I, veiem que hi ha moltes diferències significatives en les comparacions en les que hi ha involucrat l'ordenament O_{ST}. Això es podria deure a que dins d'una mateixa població els diferents ordenaments estan en contacte i en els individus heterozigots, es poden donar esdeveniments de recombinació en les regions lliures d'inversió. D'aquesta manera s'explica que la diferenciació sigui molt més evident en la regió I ja que aquesta és la regió on es troben la

majoria d'inversions dels ordenaments estudiats. En el cas de la regió II, a efecte d'inversions estaríem considerant la inversió O_7 (de l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$) en front de la regió sense invertir, que és com es troba en els altres 3 ordenaments. El fet de no trobar diferenciació genètica entre ordenaments per a la regió II, sobretot en la comparació dels diferents ordenaments dins de la mateixa població, por ser degut a que per aquesta regió tan sols un dels *loci* presenta associacions amb un dels ordenaments (l'$O_{\underline{3+4+7}}$) i pot quedar emmascarat per la semblança que mostren la resta de *loci* d'aquesta regió. A més, si tenim en compte que l'O_7 és una inversió de mida gran, la inhibició de la recombinació no seria total i podria uniformitzar el contingut genètic dins de població.

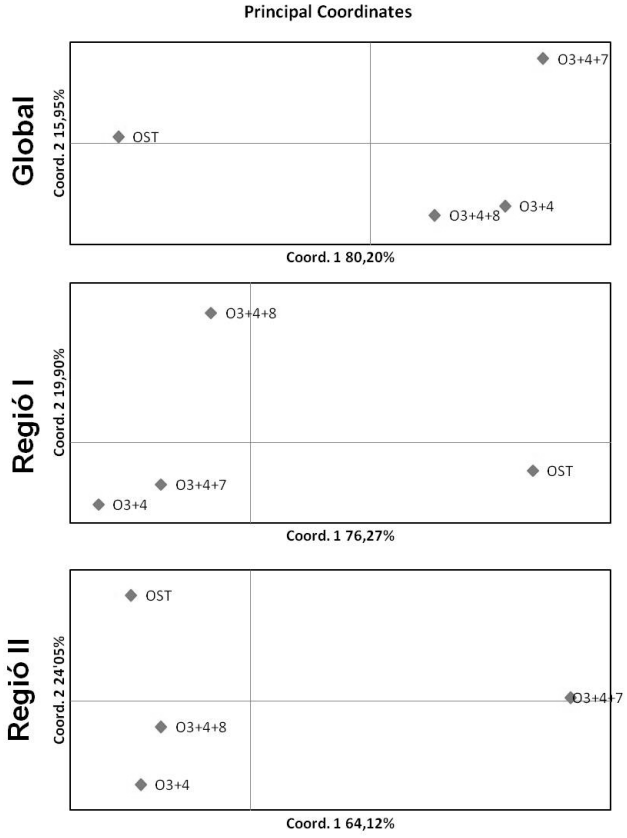


Figura 4.10: Visualització de les relacions en 2 dimensions considerant que només hi ha 4 grups genèticament diferenciats que corresponen als 4 ordenaments estudiats.

El patró és el mateix a l'analitzar els F_{ST} entre ordenaments de diferents poblacions (gràfic C de la figura 4.9) però amb valors de diferenciació lleugerament superiors. En ambdós casos trobem que hi ha una gran diferenciació en aquelles comparacions on està involucrat l'ordenament O_{ST} i aquestes diferències venen donades principalment per la regió I del cromosoma. De nou, la regió I és la que conté les inversions i per tant, la regió en la que no es

pot donar recombinació entre els ordenaments. Per tant, sembla que els *loci* de dins dels ordenaments estan fortament afectats per la inhibició de la recombinació, sobretot pel cas de l'O_{ST}, que conté dues inversions imbricades en la comparació amb els altres dos ordenaments. Els nostres resultats concorden amb altres estudis on s'ha trobat una gran diferenciació genètica entre els ordenaments $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{ST}}$ (Rozas *et al.*, 1995, 1999; Munté *et al.*, 2005) de *D. subobscura*, com amb estudis fets per a altres drosofílids com ara *D. pseudoobscura* o *D. melanogaster* (Schaeffer *et al.*, 2003; Kennington *et al.*, 2006).

Si agrupem tots els individus que presenten la mateixa inversió independentment del seu origen i visualitzem les relacions que presenten els 4 ordenaments mitjançant la PCoA utilitzant la distància de Nei, veiem que aquesta discrimina molt bé tres grups (Figura 4.10). La primera component separa clarament l'ordenament O_{ST} dels altres tres. Però en afegir la segona component, l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ queda separat de l' $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+8}}$. Si en comptes de considerar el cromosoma sencer, ho fem separant-lo per regions, veiem que els resultats varien una mica. En considerar la regió I, es separa l'ordenament O_{ST} de la resta. I segons la segona component se'ns separa un l'ordenament l'$O_{\underline{3+4+8}}$. Així es formen 3 grups que són equivalents als tres ordenaments que es localitzen en aquesta regió: l'O_{ST}, l'$O_{\underline{3+4+8}}$ i els portadors de l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$.($O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+7}}$). En canvi, si només es treballa amb la regió II, l'ordenament més diferent és l'$O_{\underline{3+4+7}}$, que és el que presenta una inversió en aquesta regió. A més, en afegir la segona component, també es separa l'ordenament O_{ST} de la resta.

4. Diferències de mida dels al·lels als diferents ordenaments

Per poder determinar si la mida de l'al·lel capturat en la formació de la inversió pot afectar els nivells de diversitat detectats entre els ordenaments es va analitzar amb un test de Kruskal-Wallis la existència de diferències significatives pel que fa a la mida dels al·lels (bp) en els diferents ordenaments (Taula 4.9).

Tan sols tres *loci* de la regió II mostren diferències significatives de mida entre els diferents ordenaments, el dsub02, el dsub25 i el dsub14. Els tres microsatèl·lits es troben localitzats dins de la regió que cobreix la inversió O_7 i presenten diferències de mida entre els al·lels de l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ i la resta (Figura 4.11). En el cas del locus dsub02, a la Taula 4.12 es pot observar que es troba en desequilibri de lligament amb l'al·lel 232, però a la Figura 4.11 es veu que de mitjana, els al·lels d'aquesta inversió tenen de mitjana una mida de 236bp, amb una

diferència de 4 repeticions superior amb la mitjana de mida dels al·lels dels altres ordenaments. Per tant, encara que conté al·lels de mida major, sembla que a l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ l'al·lel 232 podria estar sota selecció. En canvi, pels altres dos *loci*, l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ és el que presenta al·lels de menor mida encara que el número de repeticions no és molt diferent, sent, de l'ordre de dues repeticions en el cas de dsub25 i només d'una repetició en el cas del dsub14. Comparant-los amb els resultats de la Taula 4.12 veiem que el locus dsub25 presenta una forta associació amb l'al·lel 251, un al·lel encara menor al de la mitjana (Figura 4.11). Per tant, sembla que les diferències de mida observades no s'expliquen per diferències en la variabilitat, ja que les diferències són degudes a molt poques repeticions.

Taula 4.9: Valors i significació del test de Kruskal-Wallis analitzant les diferències en les mides dels al·lels en bp de cadascun dels 13 *loci* comparant els diferents ordenaments. En negreta es mostren els valors significatius.

Loci	**H**	**p-valor**
dsub26	5,137	0,162
dsub02	79,414	**0,000**
dsub25	27,474	**0,000**
dsub51	3,689	0,297
dsub14	10,942	**0,012**
dsub47	6,892	0,075
dsub38	5,310	0,150
dsub34	0,673	0,879
dsub71	4,622	0,201
dsub01	0,374	0,945
dsub04	33,357	**0,000**
dsub29	66,371	**0,000**
dsub12	47,115	**0,000**

Pel que fa a la regió I, trobem diferències de mida en els 3 loci. A més, en aquest cas els 3 loci es comporten de la mateixa manera. L'ordenament O_{ST} presenta al·lels de mida significativament menor que la resta d'ordenaments. A més, en els tres casos l'ordenament $O_{\underline{3+4+8}}$ és el que té al·lels de mida major. Si comparem aquests dos ordenaments, els al·lels dels tres *loci* presenten de mitjana 3 repeticions menys en l'O_{ST}. Això es podria explicar si quan es va formar l'ordenament O_{ST} a partir de l'O_3, aquest va capturar un al·lel petit. Com que la taxa de mutació és menor, els al·lels d'aquesta inversió seran menors. Si a més comparem aquests resultats amb els obtinguts a la taula 4.12, veiem que els al·lels que presenten associació amb l'ordenament O_{ST} són menors als al·lels mitjans. Aquest patró no es pot explicar tan sols amb patrons històrics. Si en el moment de formar-se la inversió O_{ST} aquesta hagués capturat un

al·lel petit (per exemple el 196, que és amb el que presenta una major associació), la seva taxa de mutació, al dependre de la mida de l'al·lel, també seria petita i, per tant, es trobarien grans diferències entre els ordenaments.

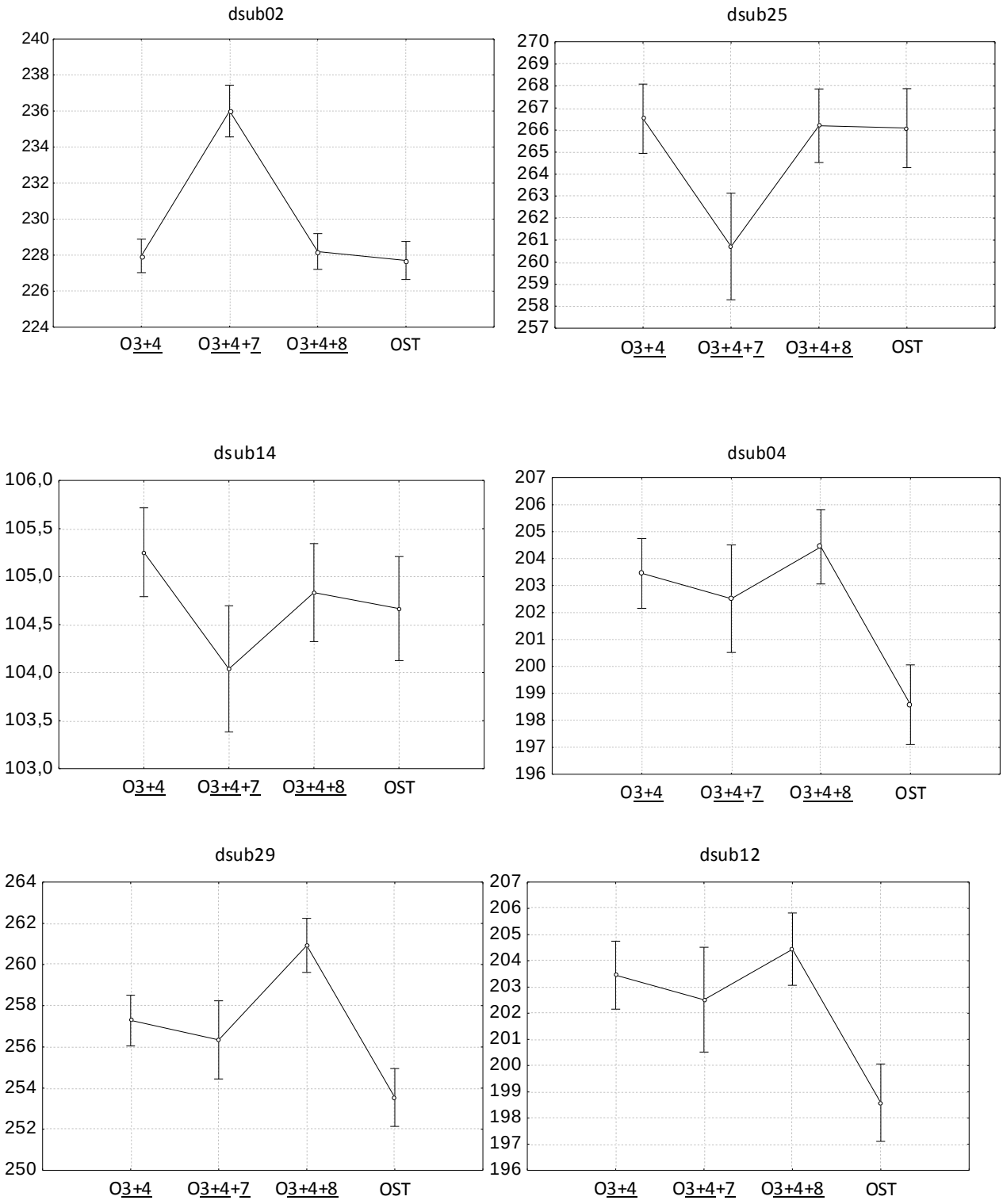


Figura 4.11: Diferències de mida entre els al·lels dels quatre ordenaments. En el gràfic està representada la mitjana i les barres indiquen els intervals de confiança dels 95%.

En canvi, tot i que es troben diferències de mida entre els ordenaments, aquestes són degudes a poques repeticions i per tant les diferències entre ordenaments no es poden atribuir a possibles diferències en les taxes de mutació associades a la mida dels al·lels capturats en la formació de la inversió.

5. Desequilibri de Lligament entre *loci* microsatèl·lits i ordenaments

L'anàlisi del desequilibri de lligament entre els *loci* microsatèl·lits i els ordenaments cromosòmics es va dur a terme per tal de conèixer millor el contingut genètic de les inversions, i poder detectar zones sota selecció. Les possibles associacions entre els *loci* i els ordenaments es varen estudiar mitjançant la D'm de Lewontin (1964). Els resultats es mostren a la taula 4.10, on s'observa que a la regió I del cromosoma és on es dóna un major desequilibri de lligament en totes o la majoria de les poblacions. En el cas de la regió II, es dóna un desequilibri de lligament significatiu únicament en *loci* situats dins la inversió O_7 en la població de Málaga.

Taula 4.10: Valors globals (D'm) de Desequilibri de Lligament entre *loci* microsatèl·lit i els ordenaments cromosòmics. La zona ombrejada indica els *loci* situats a regions afectades per les inversions. Els asteriscs indiquen el nivell de significació del test exacte de Fisher: ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001. Es mostren els valors significatius després d'aplicar la correcció FDR.

	Loci	Málaga	València	Rasquera	Barcelona	Montpellier	Dijon	Groningen
Regió II	**dsub26**	0,5873	0,5186	0,5143	0,5136	0,4944	0,5500	0,5745
	dsub02	0,5565	0,4425	0,4214	0,3930	0,2667	0,3298	0,3611
	dsub25	**0,6291****	0,5277	0,5055	0,5352	0,4889	0,4551	0,3670
	dsub51	0,5094	0,4250	0,4482	0,4442	0,4432	0,4556	0,3444
	dsub14	0,3967	0,2311	0,2027	0,1907	0,2056	0,2379	0,2186
	dsub47	**0,4884****	0,3412	0,3447	0,3259	0,2667	0,2833	0,4000
	dsub38	0,3990	0,3975	0,4291	0,3890*	0,2620	0,2778	0,3111
	dsub34	0,1905	0,2317	0,2241	0,2571	0,1587	0,1867	0,1348
	dsub71	0,4251	0,3549	0,3100	0,2766	0,3258	0,2833	0,3722
	dsub01	0,3711	0,2744	0,3017	0,2549	0,2790	0,3167	0,4111
Regió I	**dsub04**	0,5296	0,4890	**0,4965*****	**0,4367****	**0,5898*****	**0,5389****	**0,4500****
	dsub29	**0,4929****	**0,5204*****	**0,4241****	**0,5533*****	**0,6072*****	**0,6056*****	**0,6500*****
	dsub12	0,5037	0,4810	**0,5357****	0,5328	0,5262	**0,5781****	**0,5778****

Per determinar si el LD a les diferents poblacions es deu a les associacions entre els mateixos al·lels microsatèl·lits i els mateixos ordenaments cromosòmics, es va calcular la D', una mesura del desequilibri interal·lèlic entre els al·lels microsatèl·lits i els ordenaments cromosòmics (Taula 4.11). Per a dos dels marcadors situats a la regió I s'observen valors significatius de desequilibri de lligament entre l'ordenament "estàndard" i el mateix al·lel a totes o quasi totes les poblacions. Així, trobem que l'O_{ST} presenta LD amb l'al·lel 252 del *locus* dsub29 a totes les poblacions i amb l'al·lel 196 del *locus* dsub04 a cinc de les set poblacions. En la resta de casos el LD és per al·lels diferents en poblacions diferents. No es detecta en cap cas LD amb l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$.

Taula 4.11: Desequilibri de Lligament interal·lèlic (D') entre al·lels microsatèl·lit i els ordenaments cromosòmics. La zona ombrejada indica els *loci* situats a regions afectades per les inversions. Només es mostren els al·lels (anomenats per la seva mida en bp) que presenten una D' significativa amb un ordenament cromosòmic (normal: $O_{\underline{3+4+7}}$; negreta: $\mathbf{O_{\underline{3+4+8}}}$; cursiva: O_{ST}).

	Málaga	**València**	**Rasquera**	**Barcelona**	**Montpellier**	**Dijon**	**Groningen**
dsub25	251			263			
dsub51			*402*				
dsub04		*196*	*196*	*196*	*196, 198*	*196*	*196, 198*
dsub29	*252*	*252 /* **272**	*252*	*252*	*252*	*252*	*252*
dsub12		*274*	*252*		**270**		

Com que els resultats anteriors suggereixen que els quatre ordenaments es poden considerar iguals a totes les poblacions, es van analitzar els patrons de LD ajuntant totes les poblacions. D'aquesta manera, augmentem la mostra i es poden visualitzar associacions que potser passaven desapercebudes degut a una mida mostral reduïda. El nombre de cromosomes per inversió oscil·la entre 209 per l'$O_{\underline{3+4}}$ i 106 per l'$O_{\underline{3+4+7}}$. Els resultats es mostren a la taula 4.12, on es pot observar de nou que la regió I del cromosoma és la que mostra un major desequilibri de lligament. En canvi, l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ és el que presenta LD amb més loci de la regió II del cromosoma. A més, dos d'ells són loci que es troben situats dins de la inversió O_7. El *locus* dsub71 que també presenta LD amb l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$, es localitza fóra de la inversió O_7 però en la regió d'inhibició de la recombinació i, a més a prop del gen *Atpα* (a 1 Mb aproximadament) que ha estat analitzat en el capítol posterior i presenta un patró de polimorfisme que s'ajusta al observat en el locus dsub71. A més, el locus dsub01, tot i pertànyer a la regió II del cromosoma presenta una forta associació entre l'al·lel 263 i l'ordenament O_{ST}.

Taula 4.12: Desequilibri de lligament interal·lèlic (D') entre al·lels microsatèl·lit i els ordenaments cromosòmics considerant conjuntament totes les poblacions. Només es mostren els al·lels (anomenats per la seva mida en bp) que presenten una D' significativa amb un ordenament cromosòmic, per evitar patrons erronis, tan sols es consideren aquells al·lels que presenten associació en més de 15 individus. En negreta es mostren els al·lels que són més freqüents dins de cada ordenament.

	O_{3+4}	O_{3+4+7}	O_{3+4+8}	O_{ST}
dsub02		**232**		
dsub25		**251**		
dsub51				**399**
dsub71		268		
dsub01				**263**
dsub04	**197** / 215			**196** / 198
dsub29	**254**	**254**	272	**252** /258
dsub12	273		**270**	**252** / 263
N	209	106	170	150

Si ens fixem en els *loci* de la regió I, podem veure que els diferents ordenaments presenten LD amb diferents al·lels. L'exemple més clar seria el cas del locus dsub29, en el que l'al·lel 254 és el més freqüent en els ordenaments O_{3+4} i O_{3+4+7} (iguals per a aquesta regió). En canvi, l'ordenament O_{3+4+8} presenta associació amb un al·lel diferent (272) i l'O_{ST} amb un altre de diferent (252).

En general, el desequilibri de lligament es dona sobretot en els *loci* situats a la regió I del cromosoma, tal i com s'havia trobat en estudis anteriors fets amb al·loenzims (Charlesworth *et al.*, 1979; Loukas *et al.*, 1979). A més, el fet de trobar el mateix al·lel a totes les poblacions al llarg de la clina en desequilibri amb l'ordenament O_{ST}, podria suggerir que el contingut genètic estaria mantingut per selecció. De la mateixa manera, en els estudis fets amb al·loenzims també es van trobar associacions entre alguns d'ells i l'ordenament estàndard del cromosoma O, com ara la Leucineaminopepsidasa (Lap) o la Peptidasa-1 (Pept-1) (Loukas *et al.*, 1979; Garcia and Prevosti, 1981; Fontdevila *et al.*, 1983). A més a més, aquests dos al·loenzims estan situats relativament a prop dels *loci* microsatèl·lits que presenten LD en el present treball; Lap es troba a prop del *locus* dsub01 i Pept-1 prop del *locus* dsub29.

6. Trobem algun al·lel que presenti clina independentment de la freqüència de la inversió?

Es va mirar si dins de cada inversió hi ha algun al·lel que presenti clina latitudinal de freqüència que ens permeti identificar variacions dins d'ordenament. Per poder dur això a terme, es van triar els dos al·lels més freqüents de cada ordenament, que es van transformar amb l'arcsinus, i es van calcular les regressions entre la latitud i les freqüències. Només es va trobar clina latitudinal en el cas de l'al·lel 104 del *locus* dsub14 en l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ (Figura 4.12), que es troba situat dins de la inversió O_7. La freqüència d'aquest al·lel augmenta amb la latitud, fent que sigui més freqüent a mida que disminueix la freqüència de l'ordenament a les poblacions. Però com que en aquest cas només es disposa de 5 poblacions, no es pot assegurar que si es disposés de més poblacions la clina seguiria present, i per tant, tampoc els factors que poden estar creant aquesta clina.

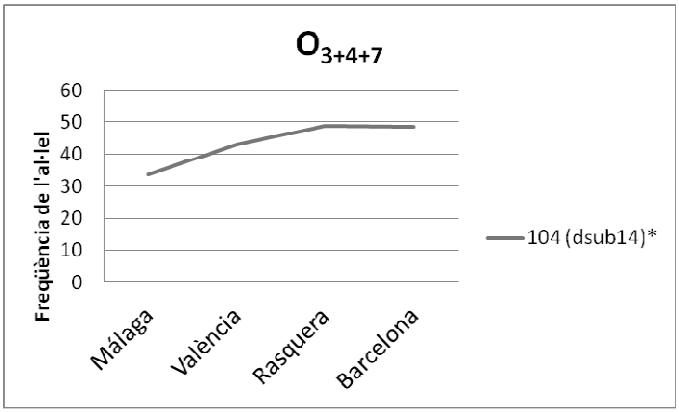


Figura 4.12: Representació de la freqüència de l'al·lel 104 a l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$.

El fet que no trobem cap clina per a la resta d'ordenaments, torna a confirmar l'alta uniformitat genètica de les diferents inversions al llarg de les poblacions europees.

En resum en aquest treball s'ha analitzat el contingut genètic de quatre dels ordenaments més freqüents a Europa pel cromosoma O. En general, vam trobar grans diferències entre l'ordenament O_{ST} i la resta d'ordenaments analitzats, sobretot quan es considera només la regió I del cromosoma, que és on es donen la majoria de les inversions considerades en aquest treball. Aquestes diferències s'han observat en tots els anàlisis duts a terme. La regió I de l'ordenament estàndard presenta una menor riquesa al·lèlica en dos dels loci situats dins d'aquesta regió. També s'han trobat diferències en el contingut genètic d'aquesta regió, confirmant que l'ordenament O_{ST} és el més diferent dels quatre analitzats. A més, si es té en

compte l'anàlisi del desequilibri de lligament, es veu que el contingut genètic d'aquesta regió és força uniforme en totes les poblacions, ja que tots els *loci* situats en ella presenten LD amb l' O_{ST} i, a més, en dos d'ells és a causa del mateix al·lel en les diferents poblacions. A més, quan s'ha analitzat si existeixen clines de freqüència dels al·lels als ordenaments estudiats, tant dins com fora de la inversió, en general no s'han trobat, confirmant l'alta uniformitat dels ordenaments. En l'únic cas que s'ha trobat clina ha estat per a un *locus* dins de l'ordenament $O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$. Però al disposar de pocs punts de mostreig per aquest ordenament, la possible clina ha de ser tractada amb precaució.

Per tant, tenint en compte els resultats obtinguts de l'anàlisi dels 13 loci microsatèl·lits, no podem considerar que el manteniment del polimorfisme d'inversions del cromosoma O de *D. subobscura* a les poblacions es doni sota la hipòtesi de la coadaptació de Dobzhansky. Això es degut a que hem trobat una alta uniformitat dins de les inversions al llarg de la clina, mentre que la hipòtesi de Dobzhansky prediu que un mateix ordenament tindria un contingut genètic específic a cada població. En canvi, el model adaptatiu de Kirkpatrick and Barton (2006), considera que la inversió en formar-se, segresta un determinat conjunt d'al·lels beneficiosos per a la població on s'ha format, sense que hagi d'haver interaccions epistàtiques entre ells. A més, a partir de la població on s'origina la inversió aquesta s'expandirà per migració. Per tant, el contingut uniforme dels ordenaments si que s'ajusta bé a aquesta teoria.

A més, dels resultats es desprèn que tot i que hi hagi unes altes taxes de flux gènic, les inversions cromosòmiques permeten mantenir diferents continguts genètics susceptibles d'estar sota selecció.

4.5. GENS CANDIDATS A L'ADAPTACIÓ TÈRMICA

4.5.1. Gens Fst, Sqd, Yrt i Atpα

1. Variabilitat genètica

A la taula 4.13 es mostren les estimes de variabilitat dels quatre gens per a cada ordenament ($O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+7}}$) i població. En tots els casos el nombre d'haplotips detectats és molt similar al nombre de seqüències analitzades. El nombre de posicions segregants (S) és en general força similar entre els diferents gens (Taula 4.14) a excepció del gen *Fst*, que presenta un valor molt més alt, degut probablement a que la regió seqüenciada conté un gran fragment no codificant gran (Figura 3.7). Per compensar això, els paràmetres de diversitat nucleotídica i heterozigositat per posició, es van calcular tenint en compte només les posicions sinònimes i no codificadores. De les comparacions realitzades, tan sols es van trobar diferències significatives entre les poblacions pel gen *Atpα*. En aquest cas, les tres poblacions difereixen en variabilitat per l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$, degut a una gran baixada de diversitat sobretot a la població de València (Taula 4.14). Aquesta menor variabilitat pot ser associada a la freqüència d'individus recombinants tal com es comenta més endavant ja que mentre que es troben recombinants a les poblacions de Màlaga i Barcelona entre els dos ordenaments, a València no se'n troben. En un estudi previ comparant el nivell de variabilitat d'aquest gen entre poblacions molt distants, Barcelona (Espanya) i Mont Parnes (Grècia) no es van trobar diferències significatives (Pegueroles, 2010).

A la taula 4.15 es donen els valors de la comparació de la π_{sil} entre els dos ordenaments amb el test de Mann-Whitney. Trobem diferències significatives entre la diversitat dels ordenaments en els gens que es troben dins de l'ordenament, i en el gen *Atpα*. A més, en aquests casos la diversitat de l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ és significativament inferior per tots els gens excepte pel *Yrt*. Aquesta baixada de variabilitat podria relacionar-se amb al coll d'ampolla associat a la formació de la inversió, o bé a un procés selectiu. Aquests resultats concorden amb les prediccions teòriques que diuen que dins del fragment invertit la variabilitat nucleotídica serà menor que en l'ordenament estàndard, sobretot al voltant dels punts de trencament (Navarro *et al.*, 1997). Finalment, en comparar els valors de π_{sil} i θ_{sil} es va veure que eren similars, essent els valors de θ_{sil} una mica majors ($Z= 3'47$; $p < 0'001$).

Taula 4.13: Valors de diversitat pels 4 gens a les tres poblacions estudiades, Barcelona (BCN), València (VAL) i Málaga (MAL). n nombre de seqüències; h, nombre d'haplotips; S nombre de llocs polimòrfics; π (JC), diversitat nucleotídica amb la correcció de Jukes-Cantor considerant totes les posicions; π_{sil} (JC), diversitat nucleotídica considerant només les posicions sinònimes i no codificadores.

	Fst			*Sqd*			*Yrt*			*Atp*		
O_{3+4}	BCN	VAL	MAL	BCN	VAL	MAL	BCN	VAL	MAL	BCN	VAL	MAL
n	12	10	10	11	10	10	13	9	10	14	10	10
h	11	10	10	10	10	10	12	9	10	12	10	10
S	115	112	113	21	24	19	35	28	29	26	26	26
π (JC)	0,0177	0,0171	0,0192	0,0044	0,0041	0,0046	0,0097	0,0106	0,0081	0,0044	0,0061	0,0054
π_{sil} (JC)	0,0205	0,0196	0,0219	0,0060	0,0055	0,0063	0,0349	0,0382	0,0280	0,0150	0,0170	0,0169
θ_{sil}	0,0230	0,0229	0,0259	0,0072	0,0085	0,0064	0,0447	0,0408	0,0405	0,0170	0,0145	0,0168
O_{3+4+7}	BCN	VAL	MAL	BCN	VAL	MAL	BCN	VAL	MAL	BCN	VAL	MAL
n	10	10	10	12	10	10	11	10	8	10	10	10
h	10	10	10	12	9	10	11	10	8	8	5	6
S	76	90	91	18	15	21	36	31	27	25	10	22
π (JC)	0,0127	0,0143	0,0149	0,0029	0,0025	0,0035	0,0114	0,0112	0,0104	0,0044	0,0020	0,0053
π_{sil} (JC)	0,0150	0,0165	0,0171	0,0040	0,0034	0,0048	0,0396	0,0404	0,0370	0,0080	0,0025	0,0115
θ_{sil}	0,0158	0,0182	0,0193	0,0058	0,0051	0,0071	0,0488	0,0420	0,0412	0,0114	0,0031	0,0107

Taula 4.14: Valors de χ^2 comparant entre les tres poblacions el numero de posicions segregants pels ordenaments $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+7}}$. En negreta es mostren els valors significatius.

	Fst	*Sqd*	*Yrt*	*Atp*
$O_{\underline{3+4}}$	0,041	0,806	0,935	0,000
$O_{\underline{3+4+7}}$	1,642	2,122	1,298	**6,632**

Taula 4.15: Comparació dels nivells diversitat nucleotídica entre ordenaments amb el test de Mann-Whitney. La regió ombrejada indica els gens inclosos dins de la inversió O7 que diferencia els dos ordenaments.

	π_{sil}	
	Z	p-valor
Fst	1,963	**0,049**
Sqd	1,963	**0,049**
Yrt	-1,527	0,127
Atp	1,963	**0,049**

2. Diferenciació genètica entre poblacions i entre ordenaments

Els valors d'F_{ST} es mostren en la taula 4.16. En general, no es van trobar diferències significatives en considerar el mateix ordenament a les diferents poblacions, a excepció del gen *Sqd* per a l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$. Quan s'analitza si aquestes diferències es troben a la regió codificadora o no codificadora, s'observen que es donen en aquesta última, on l'existència de 3 posicions polimòrfiques en l'intró, úniques de la població de Màlaga són les que produeixen aquesta diferenciació entre les tres poblacions (Annex 8.1). Tot i que en mirar les comparacions dos a dos, es va poder comprovar que les diferències venen donades a que els individus $O_{\underline{3+4}}$ de Màlaga són significativament diferents als de València, però no als de Barcelona.

Per altra banda, quan s'analitza la diferenciació entre els dos ordenaments analitzats, s'observen diferencies significatives pels gens situats dins de la regió invertida, tot i que el gen *Atpα*, localitzat fóra del fragment invertit, també mostra diferències significatives i, a més, és el que presenta una major diferenciació. Quan s'analitza on es dóna aquesta diferenciació, veiem que en els gens *Fst* i *Atpα* la diferenciació entre ordenaments afecta tant a la regió codificadora com no codificadora, mentre que pel gen *Sqd* només es troben diferències a la regió no codificadora. No es pot descartar que les diferències entre ordenaments per al gen *Fst* estiguin relacionades amb la formació de la inversió, ja que aquest gen es troba molt a prop

del punt de trencament proximal de la inversió O_7. En canvi, pel gen *Atpα* l'explicació més plausible per a explicar les diferències entre ordenaments és la de la selecció. Aquest gen es troba fóra de la inversió i dins de la regió on la recombinació està fortament inhibida, segons s'ha observat en estudis previs estimant la freqüència de recombinació al llarg del cromosoma en individus heterocariotípics per les mateixes dues inversions que s'estan estudiant (Pegueroles *et al.*, 2010b). Dins d'aquesta zona i fins i tot més proper al punt de trencament de la inversió es troba el gen *Yrt* que no presenta diferenciació entre ordenaments per tant aquest fet diferencial dels dos gens ens permet descartar que les diferències en la *Atpα* siguin degudes a un efecte històric relacionat amb la formació de la inversió O_7.

Taula 4.16: Valors d'F_{ST} dins d'ordenament i entre ordenaments per a cadascun dels quatre gens analitzats. Es va considerar el global i per separat les regions codificadores (Coding) i no codificadores (N.C.).

		$O_{\underline{3+4}}$		$O_{\underline{3+4+7}}$		$O_{\underline{3+4}}$ vs. $O_{\underline{3+4+7}}$	
		*F*st	*S*nn	*F*st	*S*nn	*F*st	*S*nn
Fst	Global	0,0064	n.s.	0,0076	n.s.	**0,1417**	***
	Coding	0,0179	n.s.	0,0205	n.s.	**0,1574**	***
	N.C.	0,0027	n.s.	0,0034	n.s.	**0,1363**	***
Sqd	Global	**0,1042**	*	-0,0144	n.s.	**0,0682**	*
	Coding	-0,0145	n.s.	0,0047	n.s.	-0,0088	n.s.
	N.C.	**0,1173**	*	-0,0171	n.s.	**0,0773**	*
Yrt	Global	0,0091	n.s.	-0,0311	n.s.	0,0122	n.s.
	Coding	-0,0308	n.s.	0,0119	n.s.	0,0132	n.s.
	N.C.	-0,0317	n.s.	-0,0353	n.s.	-0,0112	n.s.
Atpα	Global	-0,0116	n.s.	0,0035	n.s.	**0,4739**	***
	Coding	0,0189	n.s.	-0,0096	n.s.	**0,4884**	***
	N.C.	-0,0514	n.s.	0,0454	n.s.	**0,4447**	***

Aquests resultats ens diuen que, en general, no es troben diferències significatives entre poblacions per a una mateixa inversió, per als gens estudiats, independentment de la seva localització. Aquest resultat també va ser l'obtingut en l'estudi previ dut a terme per Pegueroles *et al.* (*submitted*), en el que varen comparar el contingut genètic dels ordenaments $O_{\underline{3+4}}$, i O_{ST} de les poblacions de Barcelona i Mont Parnes amb un total de 6 gens candidats a l'adaptació tèrmica (3 dels quals s'han utilitzat en el present treball). En altres estudis, en els que s'ha analitzat el contingut genètic amb altres marcadors, com ara loci microsatèl·lits, també s'ha pogut observar una gran uniformitat genètica entre diferents poblacions europees (Pascual *et al.*, 2001; Simões *et al.*, *submitted* i a la present tesi doctoral). De la mateixa manera, en estudis on s'han utilitzat altres marcadors com ara mapes de restricció (Rozas *et*

al., 1995) o gens localitzats en la regió I del cromosoma (Rozas *et al.,* 1999), tampoc s'ha detectat diferenciació genètica significativa. Aquesta manca de diferenciació entre poblacions suggereix que el flux gènic entre poblacions distants pot ser molt elevat. A més, el flux gènic pot estar associat a la gran capacitat activa dispersiva d'aqueta espècie (Begon, 1968; Serra *et al.*, 1987) o bé a la migració facilitada pel transport passiu (Pascual *et al*., 2007).

L'únic cas en el que es troba diferenciació entre poblacions és pel gen *Sqd*. Aquest gen es troba prop del punt de trencament distal de la inversió O_7, per tant en cas que es donessin diferències significatives entre poblacions, esperaríem que fossin per l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$, mentre que el que s'ha trobat no es així. S'han trobat que els individus de València portadors de l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ són diferents als individus $O_{\underline{3+4}}$ de Málaga. Com ja s'ha comentat abans, aquestes diferències es troben a la zona no codificadora del gen i per tant, les diferències no poden ser degudes a un procés de selecció. Una explicació alternativa seria que les diferències fossin degudes a esdeveniments de recombinació amb altres ordenaments de la regió II existents a les poblacions del Sud d'Europa, com per exemple $O_{\underline{3+4+1}}$ i $O_{\underline{3+4+2}}$, però que al ser poc freqüents no s'han considerat en el present estudi Pel gen *Sqd* s'han observat diferències significatives entre individus portadors de l'ordenament $O_{\underline{3+4+1}}$ i $O_{\underline{3+4}}$ de la població de Mont Parness (Pegueroles, 2010) i per tant recombinació entre aquests ordenaments podria explicar la diferenciació entre poblacions en aquest gen, sent més fàcilment observable en funció de la freqüència de l'ordenament a la població (Stevison *et al.,* 2011)

A més a més, pel conjunt de seqüències agrupades per ordenament es va estudiar com es distribueix la diversitat nucleotídica al llarg del fragment seqüenciat per l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+7}}$ així com la distribució de les diferències genètiques entre els dos ordenaments estimades amb el paràmetre Dxy, que indica el nombre mitjà de substitucions nucleotídiques per posició (Figura 4.13).

A les figures es pot observar que el gen *Fst*, presenta els majors nivells de diferenciació a la regió 5' (al voltant dels 1000bp-1300bp, que correspon a la regió 300bp abans que comenci la regió codificadora), en la qual hi ha diferents posicions que diferencien ordenaments. A la zona de l'exó la diferenciació cau, i torna a pujar a la regió 3' no codificadora 192bp després del codó de parada. Pel que fa al gen *Sqd*, es pot veure que els nivells de diferenciació són baixos, i s'observen tres pics que es corresponen als tres introns que presenta la regió amplificada. El gen *Yrt* no presenta diferències significatives entre els dos ordenaments. Finalment, el gen *Atpα* presenta els majors nivells de diferenciació entre ordenaments. La diferenciació entre els

dos ordenaments per aquest gen es dóna a l'inici de la regió seqüenciada, que correspon a l'exó 2 del gens que és el que conté tots els polimorfismes que diferencien entre ordenaments i que, a més són canvis no sinònims. A mes a més, també a l'intró es veu un nivell de diferenciació gran entre els dos ordenaments.

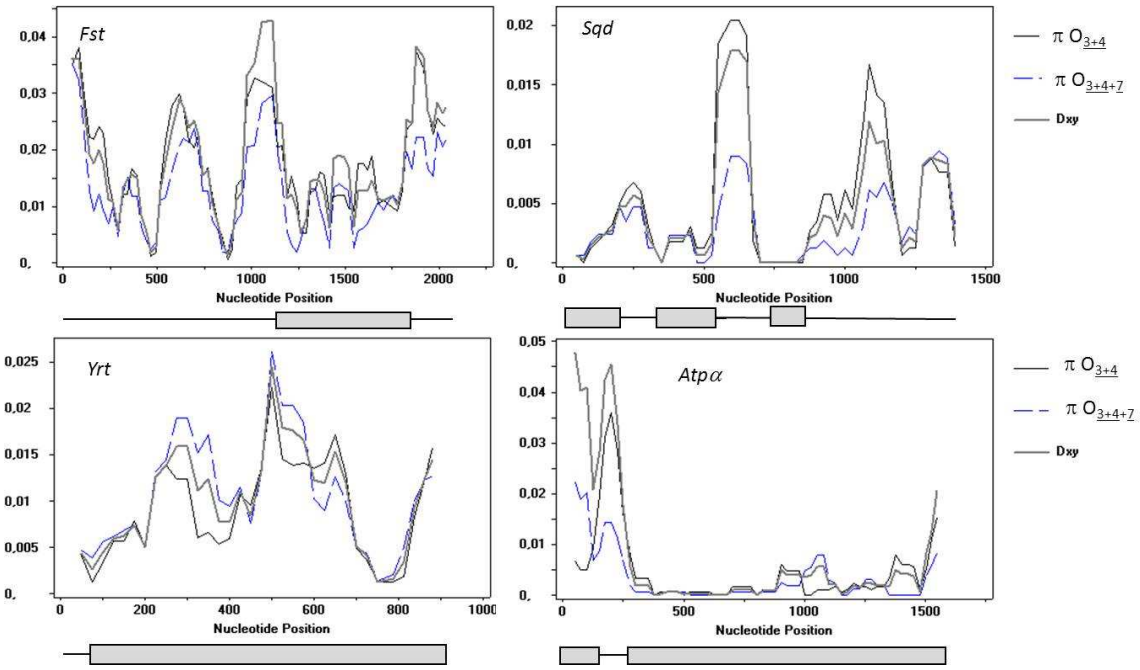


Figura 4.13: Variabilitat i diferenciació genètica al llarg de la regió seqüenciada dels 4 gens analitzats pels ordenaments O_{3+4} i O_{3+4+7}. A les gràfiques es pot observar la variabilitat nucleotídica de cada ordenament i el valor Dxy entre els dos ordenaments.

3. Tests de neutralisme

Els resultats per als tests de neutralismes es mostren a la (Taula 4.17). Els valors de la D de Tajima no varen ser significatius en cap cas encara que van ser majoritàriament negatius, cosa que correspon a un excés de polimorfismes (o al·lels) a baixa freqüència i que pot estar relacionat tant amb processos demogràfics (població en expansió demogràfica) com amb un procés de selecció. Es va calcular la R_2 de Ramos-Onsis i Rozas (2002), ja que s'ha observat que és un estimador més potent per a detectar desviacions del model neutral, i la seva significació es va calcular mitjançant simulacions de coalescència. En aquest cas es van considerar dues situacions possibles, ja que l'acceptació o no de la hipòtesi nul·la depèn dels valors de recombinació inclosos en el model. Per una banda es va calcular la significació sense

considerar la recombinació i per l'altre considerant recombinació lliure. Com que alguns dels gens analitzats són els mateixos que utilitza Pegueroles (2010), no es van estimar i utilitzar els nivells de recombinació real per a calcular la significació ja que va demostrar que la significació obtinguda a l'introduir la taxa de recombinació calculada a partir de les seqüències és equivalent als valors de significació obtinguts amb recombinació lliure. Els valors d'R_2 es mouen entre el 0,057 del gen *Sqd* i el 0,184 del gen *Atpα* tots dos de la població de Málaga. Pel que fa a la significació, al considerar recombinació lliure és quan la majoria de les condicions varen ser significatives, exceptuant el gen *Atpα* que no presenta valors significatius a cap de les poblacions, ni l'*Yrt* a València o l'*Sqd* per a l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ de Málaga. Quan el valor d'R_2 és significatiu, indica un escenari de creixement demogràfic (Figura 4.14). En general aquest és major en el cas de l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$, excepte pel gen *Yrt*, on l'ordenament que està en expansió és l'$O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$.

Taula 4.17: Valors dels tests de neutralisme duts a terme. En negreta es mostren els valors significatius. La significació d'R_2 es va calcular mitjançant coalescència considerant que (a) no es dóna recombinació o (b) considerant recombinació lliure.

		$O_{\underline{3+4}}$				$O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$			
		Tajima D	R_2	p-valor[a]	p-valor[b]	Tajima D	R_2	p-valor[a]	p-valor[b]
Barcelona	*Fst*	-0,411	0,108	0,082	**0,001**	-0,257	0,121	0,134	**0,043**
	Sqd	-0,762	0,102	**0,034**	**0,031**	-1,378	0,09	**0,011**	**0,01**
	Yrt	-0,983	0,094	**0,012**	**0,008**	-0,774	0,103	**0,043**	**0,036**
	Atpα	-0,601	0,11	0,148	0,051	-1,183	0,142	0,363	0,573
València	*Fst*	-0,748	0,088	**0,009**	**0,000**	-0,520	0,109	0,064	**0,007**
	Sqd	-1,660	0,106	**0,042**	**0,045**	-1,537	0,09	**0,006**	**0,011**
	Yrt	0,336	0,121	0,109	0,137	-0,372	0,121	0,122	0,182
	Atpα	0,224	0,155	0,501	0,844	-0,503	0,14	0,299	0,509
Málaga	*Fst*	-0,272	0,114	0,076	**0,004**	-0,460	0,108	0,052	**0,002**
	Sqd	-0,097	0,131	0,201	0,274	-1,539	0,057	**0,000**	**0,000**
	Yrt	-0,535	0,093	**0,018**	**0,005**	-0,535	0,109	**0,026**	**0,059**
	Atpα	-0,341	0,124	0,153	0,161	0,325	0,184	0,784	0,999

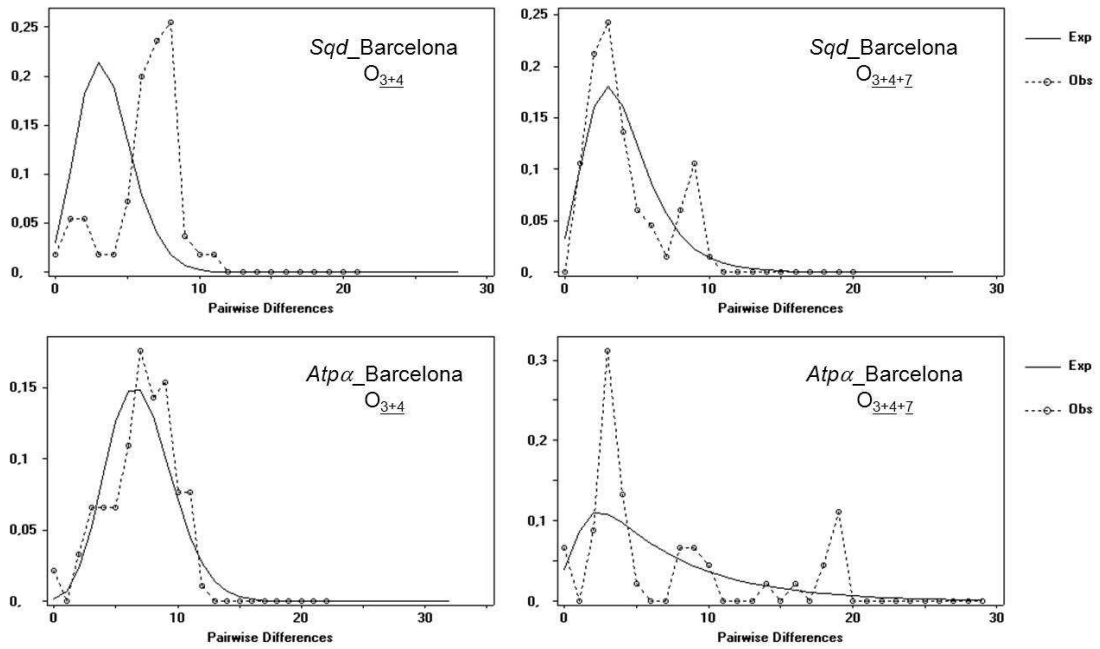


Figura 4.14: Representació gràfica de la distribució de les diferències observades entre parelles de seqüències pels diferents ordenaments (també anomenat *mismatch distribution*). Com a exemples es van triar, per a una mateixa població, un gen que presenta valors significatius de R2 (*Sqd*) i un que no (*Atpα*) pels dos ordenament a la població de Barcelona.

Pel conjunt de seqüències agrupades per ordenament es va dur a terme també el test de McDonald i Kreitman, utilitzant a *D. pseudoobscura* com a grup germà (a excepció del gen *Fst*, que degut a problemes per amplificar *D. pseudoobscura* es va utilitzar *D. madeirensis*). Només es van obtenir resultats positius en el cas del gen *Atpα*, per a ambdós ordenaments on és veu que la proporció de posicions polimòrfiques no sinònimes és molt més alta que la proporció de substitucions no sinònimes fixades en comparació a *D. pseudoobscura* (Taula 4.18). A més, en comparar els resultats dels dos ordenaments es va observar que l'O_{3+4+7} presenta una major significació del test de Fisher (amb un p-valor < 0,000) que l' O_{3+4} (p-valor=0,024). Això ens podria estar indicant que l'ordenament O_{3+4+7}, que és el més diferent a *D. pseudoobscura*, és el que més diferències no sinònimes està acumulant. A més, aquest ordenament presenta una menor variabilitat genètica, gairebé nul·la a l'intró, mentre que tots els canvis s'acumulen al primer exó amplificat, que a més comporten canvis d'aminoàcid la qual cosa podria indicar que són adaptatius i una possible selecció direccional adaptativa.

Taula 4.18: Valors obtinguts en el test McDonald i Kreitman per al gen *Atpα* als dos ordenaments analitzats en relació a *D. pseudoobscura*. Canvis Sil.= canvis silenciosos; Canvis N.S.= canvis no sinònims.

	O_{3+4+7}		O_{3+4}	
	Fixats	Polimòrfics	Fixats	Polimòrfics
Canvis Sil.	84	20	85	29
Canvis N.S.	6	13	6	8

4. Desequilibri de Lligament

A la taula 4.19 es mostren els resultats relacionats amb les anàlisis de desequilibri de lligament. Per a cada població, es donen els valors de les posicions informatives, el percentatge de les comparacions dos a dos entre les posicions informatives que són significatives abans i després d'aplicar la correcció de Bonferroni i el paràmetre de desequilibri global ZnS al comparar els dos ordenaments. A més, per tal d'analitzar si existeixen associacions entre els gens, també es va analitzar el desequilibri de lligament per als quatre gens concatenats per a les 3 poblacions per separat. També es va calcular el desequilibri de lligament total per ordenament agrupant les tres poblacions tant per a cada gen com pel concatenat dels 4 gens.

Taula 4.19: Nombre de posicions informatives per a cada gen (P.I.S.) i percentatge d'associacions significatives entre elles: LD^a és el percentatge d'associacions significatives segons el test exacte de Fisher i LD^b són les associacions significatives després d'aplicar la correcció de Bonferroni. El paràmetre Zns indica el valor global de desequilibri de lligament.. Ressaltat en gris es troben els gens que estan dins de la inversió O_7.

		Fst	*Sqd*	*Yrt*	*Atpα*	Concatenats
Barcelona	P.I.S.	73	11	30	25	120
	%LD^a	10,008	9,091	7,126	28,333	5,938
	%LD^b	0,685	5,455	1,609	8	0
	Zns	0,071	0,139	0,079	0,191	0,095
València	P.I.S.	73	8	22	23	119
	%LD^a	10,198	3,571	6,926	48,617	5,541
	%LD^b	0,342	0	3,463	13,043	0
	Zns	0,071	0,071	0,087	0,325	0,082
Málaga	P.I.S.	73	12	18	22	122
	%LD^a	7,763	15,152	10,458	63,203	4,701
	%LD^b	0,152	6,061	4,575	10,823	0
	Zns	0,065	0,144	0,126	0,364	0,083
Tots	P.I.S.	124	25	39	32	208
	%LD^a	4,852	8,667	5,263	34,879	5,356
	%LD^b	0,105	2,667	1,754	20,766	0,418
	Zns	0,024	0,042	0,035	0,143	0,029

Quan es consideren els 4 gens per separat, es pot veure que l'*Atpα* és el que mostra els majors percentatges d'associacions significatives i els majors valors de ZnS. En l'altre extrem, el gen que presenta els valors més petits de LD és el *Fst*, tot i ser el que presenta un major nombre de posicions informatives. Això podria ser degut al fragment seqüenciat del gen, ja que al tenir una regió no codificadora molt gran hi ha molta variabilitat, però les diferents variants no es troben clarament associades a un dels ordenaments.

Aquests resultats es repeteixen quan s'agrupen les tres poblacions per tal de comparar directament els dos ordenaments. L'agrupació de les seqüències permet incrementar la mostra que es compara i d'aquesta manera, les associacions que anteriorment no eren significatives perquè potser no tenien prou pes, puguin passar a ser significatives. Això només passa en el cas del gen *Atpα* en que un cop agrupades les seqüències, un 20% de les associacions es fan significatives.

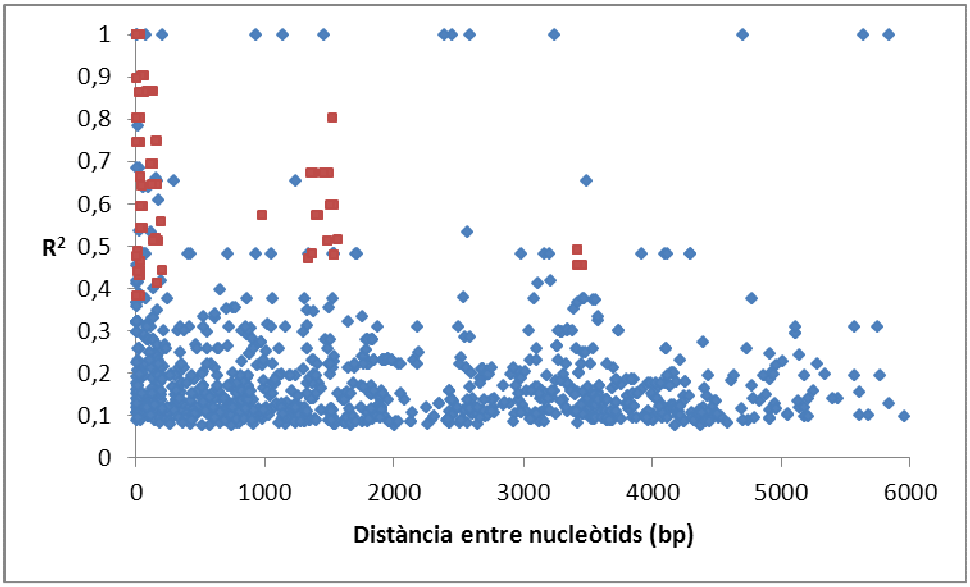


Figura 4.15: Representació dels valor de R^2 per a cadascuna de les associacions significatives entre posicions informatives segons el test exacte de Fisher. En vermell es mostren les significatives després d'aplicar la correcció de Bonferroni.

Pel que fa als resultats amb els 4 *loci* concatenats, només es van obtenir associacions significatives quan es van agrupar les tres poblacions. Per poder veure gràficament aquests associacions, es van representar tots els valors de l'estadístic R^2 (Hill and Robertson, 1968), ja que és menys dependent de les freqüències al·lèliques, contra la distància en parells de bases considerant que els fragments de cada gen amplificat són consecutius (Figura 4.15). Així la distància real entre nucleòtids de diferents gens en desequilibri de lligament està subestimada.

A la figura 4.15 només es mostren aquelles associacions que són significatives i les que resten significatives després d'aplicar la correcció de Bonferroni. Si ens centrem en aquestes, s'observa que la gran majoria correspon a associacions entre posicions molt properes entre elles, és a dir, entre diferents nucleòtids d'un mateix gen. D'aquestes, un 78'58% corresponen a associacions dins del gen *Atpα*, un 12'86 a l'*Yrt* i un 4'28% als gens *Fst* i *Sqd.* Però també es van trobar associacions entre posicions situades a distancies molt majors. Quan es van analitzar on es donaven les associacions d'aquest segon grup, es va veure que totes les que es troben a una distància d'entre 1000 i 1500 parells de bases es corresponen a associacions dins del gen l'*Atpα* entre els posicions polimòrfiques que clarament diferencien els dos ordenaments analitzats (veure haplotips a l'annex). En canvi, les associacions significatives entre nucleòtids que es troben a més de 3000bp de distància, corresponen a posicions de gens diferents. En concret, entre la posició 1023 de la regió no codificant del gen *Fst* i diferents posicions del primer exó del gen *Atpα*. A més, totes es donen entre nucleòtids que diferencien ordenaments. S'ha de tenir en compte que la distància entre els fragments dels diferents gens és en realitat molt més gran de manera que les posicions dels gens *Fst* i *Atpα* que presenten LD estan a unes 14 Mb, segons les distàncies estimades a partir del número de bandes entre les localitzacions citològiques d'aquests dos gens en relació a l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ Pegueroles *et al*., (2010a).

Malgrat la diferenciació genètica observada entre els dos ordenaments, els nivells moderats de desequilibri de lligament estarien indicant un cert grau d'intercanvi genètic entre ells. Entre dos inversions, l'intercanvi genètic es pot donar per entrecreuament d'ordre parell o bé per conversió gènica. Per tant, es va avaluar com contribueixen aquests dos mecanismes en els nostres gens analitzats. Primer es van calcular els nivells de recombinació, que no diferencia entre els dos mecanismes d'intercanvi cromosòmic possibles, tot estimant la ρ per a cada població i ordenament, però també agrupant els dos ordenaments per tal de tenir els valors globals de recombinació (Taula 4.20). Les estimes per a tots els gens van ser molt altes, tal i com ja es va trobar anteriorment (Pegueroles *et al.*, *submitted*). El gen que presenta nivells superior de recombinació és l'*Fst* i el que presenta els nivells més baixos és l' *Atpα*.

Taula 4.20: Estimes de rho (ρ) per a cada gen a cada població i pel total de seqüències agrupat.

		Fst	*Sqd*	*Yrt*	*Atp*
$O_{\underline{3+4+7}}$	BCN	>100	27,694	>100	1,57
	VAL	>100	0,464	>100	>100
	MAL	>100	7,825	57,651	0,44
	Tots	>100	>100	>100	4,403
$O_{\underline{3+4}}$	BCN	>100	20,738	40,179	21,653
	VAL	>100	0,0053	51,998	60,859
	MAL	>100	21,714	0,136	5,578
	Tots	>100	15,324	57,009	15,136
$O_{\underline{3+4+7}}$ *vs.* $O_{\underline{3+4}}$	BCN	>100	52,963	>100	6,247
	VAL	>100	4,544	>100	6,934
	MAL	>100	31,061	46,927	4,214
	Tots	>100	15,433	>100	5,578

Donat que les inversions cromosòmiques inhibeixen en certa manera la recombinació, esperaríem que els gens situats fóra de la inversió mostressin uns valors majors que els situats dins. A més, el nivell de recombinació dins de les inversions dependrà de la mida de la inversió. Segons Navarro *et al.*, 1997, que varen fer un estudi teòric, la longitud mínima per a que es pugui donar un doble entrecreuament a l'interior d'una inversió és de 20 cM. Tenint en compte que la longitud aproximada de l'O_7 és de 72,9 cM (11'8 Mb; Pegueroles *et al.*, 2010), aquesta és molt superior a la longitud mínima teòrica i per tant es podrien donar dobles entrecreuaments sovint.

Les xarxes de recombinació es varen calcular amb el total de seqüències agrupades per a cada gen, i per les seqüències concatenades (Figura 4.16). A les figures, els esdeveniments de recombinació es mostren amb línies blaves. Per als gens *Sqd* i *Yrt* aquestes xarxes mostren una barreja dels individus tant de les diferents poblacions com ordenaments, mostrant-se que es dóna una gran recombinació entre ells. En canvi, pels gens *Fst* i *Atpα*, a les figures es poden apreciar clarament dos grups que es corresponen als dos ordenaments, tot i que s'observen alguns individus recombinants. Però dins dels dos grups, els individus de les tres poblacions queden barrejats. Pel que fa als quatre gens concatenats, també es pot veure que tots els individus de cada ordenament queden ben agrupats segons el seu ordenament.

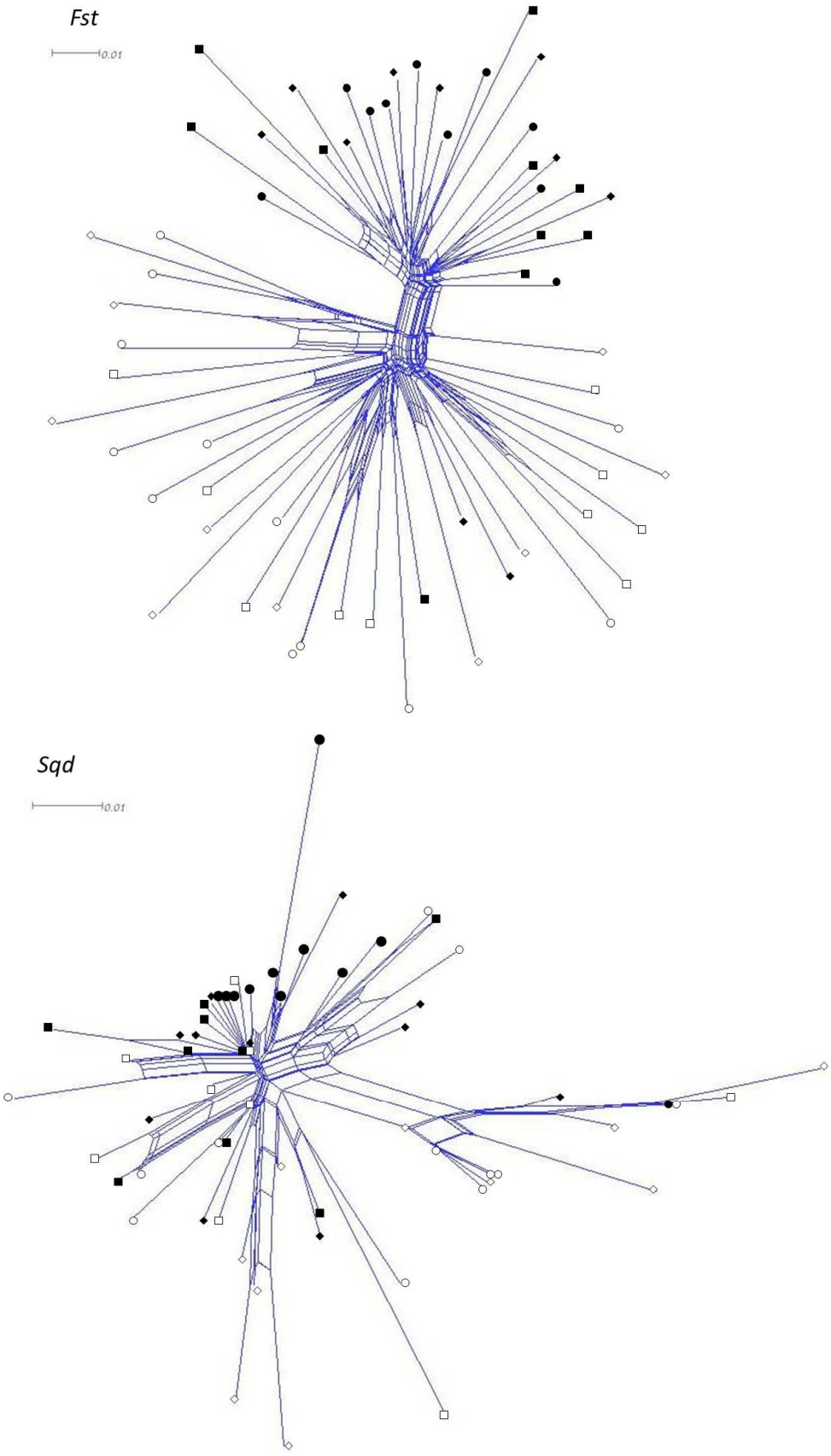


Figura 4.16: Xarxes de recombinació entre els dos ordenaments per a cada gen analitzat i pel conjunt concatenat. Els símbols blancs representen l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ i els símbols negres l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ (cercles: Barcelona; quadrats: València i rombes: Málaga).

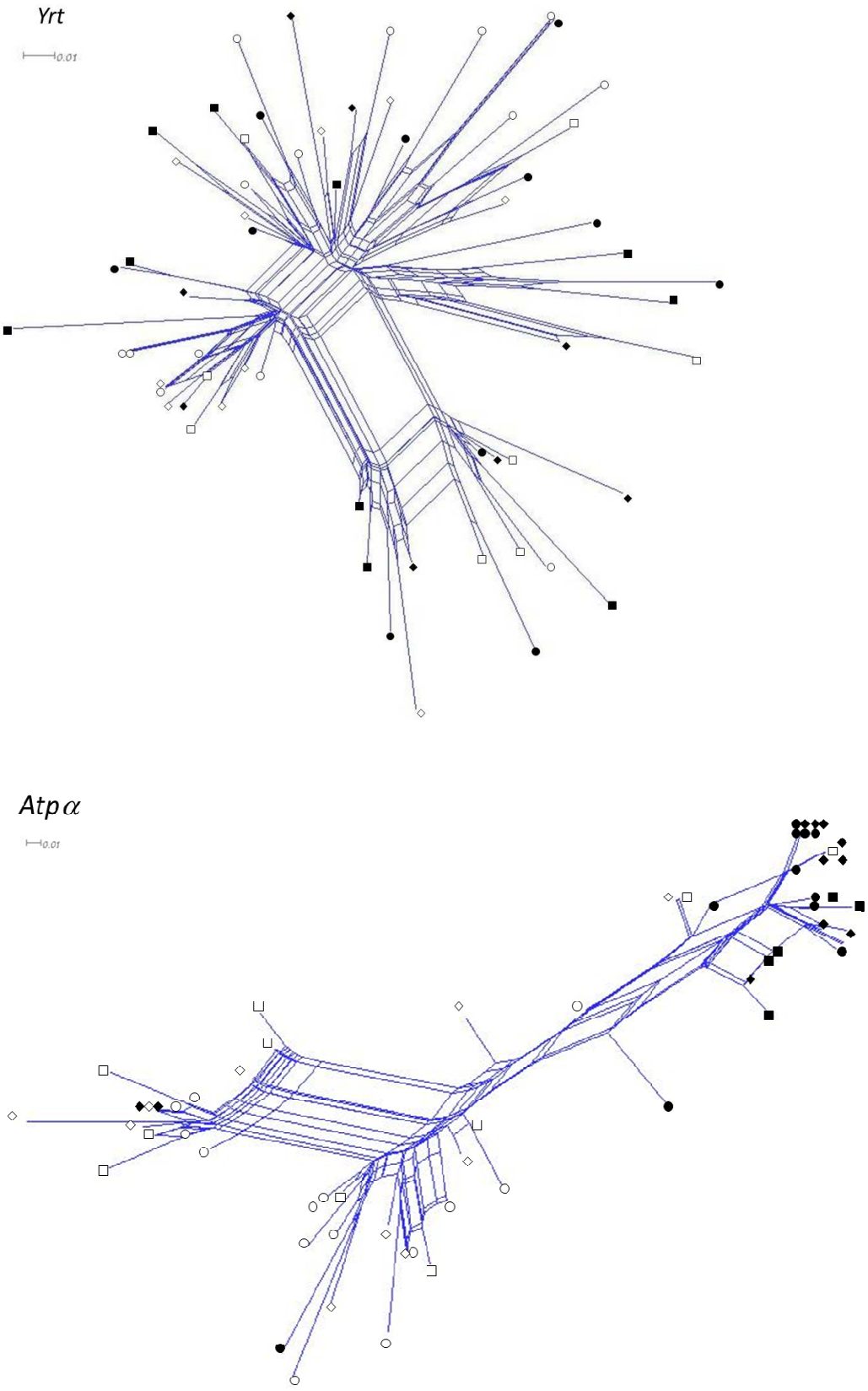


Figura 4.16 (continuació): Xarxes de recombinació per als gens *Yrt* i *Atp*α. Els símbols blancs representen l'ordenament O_{3+4} i els símbols negres l'ordenament O_{3+4+7} (cercles: Barcelona; quadrats: València i rombes: Málaga).

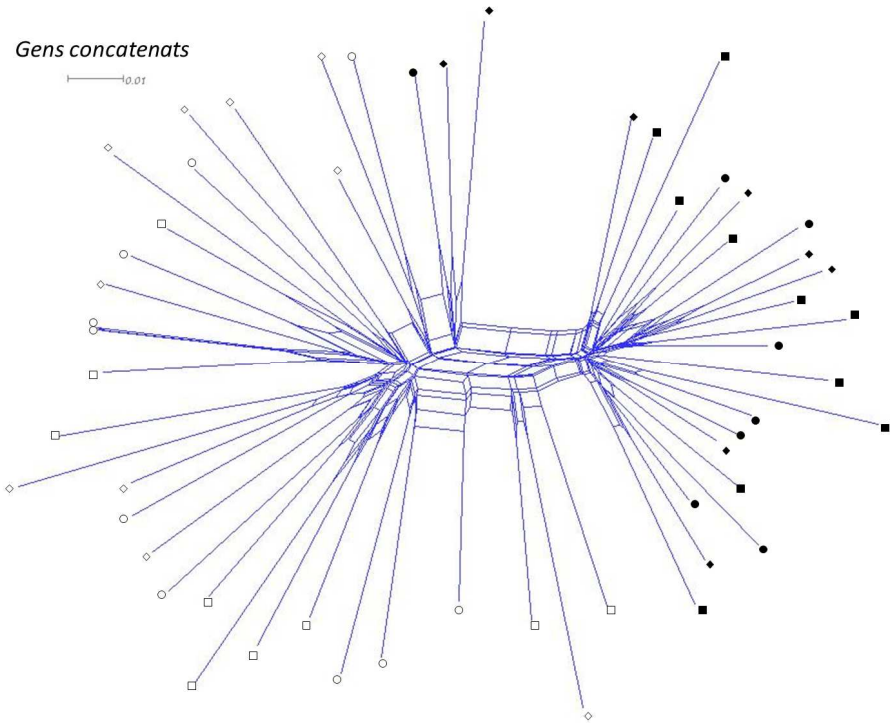


Figura 4.16 (continuació): Xarxes de recombinació entre els dos ordenaments pel conjunt de gens concatenats. Els símbols blancs representen l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ i els símbols negres l'ordenament $O_{\underline{3+4+7}}$ (cercles: Barcelona; quadrats: València i rombes: Málaga).

Els fragments de conversió gènica (GCT) entre ordenaments es van estimar amb la metodologia de Betrán *et al.*, (1997) implementada en el programari DnaSP (Taula 4.21). En ella es mostra també el paràmetre Ψ, que dóna la probabilitat per posició de detectar un esdeveniment de conversió gènica entre els dos ordenaments i que, a més, està relacionat amb la diferenciació entre seqüències. De manera que com més diferents siguin les seqüències analitzades, major serà el valor de Ψ i, per tant, més acurada serà el nombre i la mida dels GCT detectats.

Els valors obtinguts de Ψ són petits, amb valors majors per als gens *Fst* i *Atpα*, en concordança amb que són els dos gens que presenten més diferenciació genètica entre ordenaments. Tot i que els valors de Ψ són molt petits, s'han detectat alguns GCT molt grans, de més de 1000bp. En total, s'ha detectat un 10% d'individus recombinants entre ordenaments que poden ser explicats tant per conversió gènica (7,6%) com per dobles entrecreuaments. La població en la que s'han detectat més GCT és a Màlaga (12), seguit de Barcelona (8) i finalment València (5).

Taula 4.21: Fragments de conversió detectats entre els dos ordenaments estudiats a cada població. A ordenament s'indica l'ordenament de l'individu on s'ha trobat el fragment de conversió. Ψ és la probabilitat d'una posició de ser informativa d'un esdeveniment de conversió gènica.

Població	Gene	Ordenament	ψ	Informative sites	Lenght (bp)
Barcelona	*Fst*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0032	22	373
Barcelona	*Fst*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0032	22	3
Barcelona	*Fst*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0032	22	3
Barcelona	*Sqd*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0006	4	8
Barcelona	*Yrt*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0008	5	148
Barcelona	*Atpα*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0061	15	31
Barcelona	*Atpα*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0061	15	1573
Barcelona	*Atpα*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0061	15	1422
València	*Fst*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0029	17	655
València	*Yrt*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0005	2	10
València	*Atpα*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0062	18	170
València	*Atpα*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0062	18	31
València	*Atpα*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0062	18	101
Málaga	*Fst*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0024	16	470
Málaga	*Fst*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0024	16	3
Málaga	*Fst*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0024	16	371
Málaga	*Fst*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0024	16	1803
Málaga	*Fst*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0024	16	39
Málaga	*Fst*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0024	16	39
Málaga	*Sqd*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0012	6	8
Málaga	*Yrt*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0008	4	13
Málaga	*Atpα*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0052	13	1543
Málaga	*Atpα*	$O_{\underline{3+4+7}}$	0,0052	13	1543
Málaga	*Atpα*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0052	13	1528
Málaga	*Atpα*	$O_{\underline{3+4}}$	0,0052	13	19

Per gens, els gens en els que es donen més GCT són l'*Fst* (que a Málaga en presenta 6) i l'*Atpα* (que presenta més o menys el mateix nombre a les 3 poblacions). La mida dels GCT és variable, des dels 3 nucleòtids a 1803. A excepció del GCT de 1803, que és dóna pel gen *Fst* a la població de Màlaga, els fragments grans es troben pel gen *Atpα*. Però probablement aquests fragments grans en realitat marquen entrecreuaments més que no pas GCT, ja que aquests últims en teoria han de ser fragments petits (Betrán *et al.*, 1997). Així 6 dels 25 recombinants detectats són majors de 1000 bp i probablement resultat d'entrecreuaments. Per tant, tal i com van establir (Andolfatto and Nordborg, 1998) la conversió gènica és la força dominant a nivell intragènic que trenca les associacions entre les posicions de les diferents inversions, com ja s'ha trobat en altres espècies en estudis duts a terme en el locus *rosy* de *D. melanogaster* (Chovnic, 1993), el locus *rp49* de D. subobscura (Rozas and Aguadé, 1994) i el locus *amylase* de D.pseudobscura (Popadic and Anderson, 1995) entre d'altres.

Els valors obtinguts de Ψ en el present estudi per als gens *Sqd* i *Yrt* són similars als obtinguts en l'estudi de Peguelores (2010), però petits en comparació a les estimes dutes a terme en la comparació entre les inversions $O_{\underline{3+4}}/O_{ST}$ de *D. subobscura* que presenta valors d'un ordre de magnitud menor (Betrán *et al.*, 1997) o per a altres espècies, com ara *D. pseudoobscura* (valors compresos entre 0,002-0,059; Schaeffer and Anderson, 2005) o *D. buzzatti* (valors compresos entre 0,004-0,015; Laayouni *et al.*, 2003). En canvi, els valors del gens *Fst,* que es troba situat molt a prop del punt de trencament i en aquest cas podríem dir que la conversió genètica és el factor predominant en l'intercanvi genètic entre els ordenaments (Rozas and Aguadé, 1994) si que presenta valors equiparables als estudis citats. De la mateixa manera, el gen *Atpα*, tot i trobar-se molt lluny del punt de trencament, també presenta valors equiparables als esmentats. Els valors baixos obtinguts, juntament amb els baixos nivells de diferenciació (tot i que de vegades significatiu) entre ordenaments podria estar indicant que les nostres estimes de conversió gènica estarien subestimades ja que com estipulen Betrán *et al.*, (1997), la metodologia, subestima una mica el nombre, sobretot per a valors de Ψ menors de 0,01.

Patrons de selecció

La diferenciació entre ordenaments pels gens *Atpα* i *Fst*, podria estar indicant la possible existència de patrons de selecció per a aquests dos gens.

El gen *Atpα* codifica per la subunitat α de la proteïna ATPasa en *Drosophila*, i les seves funcions moleculars són les de bomba Na-K i transport de cations transmembrana. Per tant, és una molècula indispensable pel correcte funcionament del metabolisme cel·lular. A la

literatura trobem informació de la seva relació amb respostes a estímuls relacionats amb la temperatura. Sembla que a *Drosophila* el fenotip descrit sensible a la temperatura està relacionat amb mutacions causades als canals de ions o bé en proteïnes que regulen la funció dels canals (Feng *et al.*, 1997). Diverses observacions indiquen que el gen *Atpα* podria estar influenciat per la selecció relacionada amb els ordenaments O_{3+4+1} i O_{3+4+7} (Pegueroles *et al.*, *submitted*). Tot i que la localització d'aquest gen és en una àrea on no hi ha inversions (a la regió II), a l'ordenament O_{3+4+7} s'ha detectat una menor variabilitat que en l'O_{3+4}, una alta diferenciació genètica, un elevat desequilibri de lligament i menys recombinació entre seqüències de diferents ordenaments que entre seqüències del mateix ordenament. Quan s'exclouen els individus recombinants, s'observa que hi ha diferències fixades entre ordenaments que donen lloc a canvis aminoacídics, cosa que podria estar senyalant un procés selectiu en l'ordenament O_{3+4+7}. Sabem que ha de ser en aquest ordenament ja que quan es van comparar individus portadors dels ordenaments O_{ST} i O_{3+4} no es van observar diferències (Pegueroles, 2010) i moltes de les posicions no sinònimes de O_{3+4} són compartides amb *D. pseudoobscura* i *D. madeirensis*. Malgrat aquestes observacions, la D de Tajima per aquest gen no refuta la hipòtesi neutralista, tot i que podria ser conseqüència de la baixa potencia d'aquest test quan hi ha poques posicions polimòrfiques.

El gen *Fst* (*Frost*) és un dels gens candidats a la resposta a l'exposició al fred a *D. melanogaster*, ja que es troba sobreexpresada en adults després de l'exposició al fred (Reis *et al.*, 2011). Tot i que aquests autors van apuntar a que era una proteïna semblant a les mucines, sembla que la seqüència consens a *Drosophila* està formada per motius PEST (rics en prolines, serines, treonines i glutamines) i sense les hèlix transmembrana, i per tant, *Fst* no seria una proteïna semblant a les mucines (Bing *et al.*, 2012). Tot i que la seva funció molecular encara no és ben coneguda, hi ha forces evidències experimentals en les que es confirma que la seva funció està relacionada amb la resposta al fred en adults i en altres estadis del desenvolupament de diferents espècies de *Drosophila*. A més, la presència de motius PEST indicaria que el paper de *Frost* seria de proteïna senyal durant l'estrès greu i l'apoptosis (Bing *et al.*, 2012). A *D. subobscura* aquest gen està situat prop del punt de trencament de la inversió O_7 (Arboleda, 2008) i en comparar els ordenaments O_{3+4+7} i O_{3+4} s'ha pogut observat una menor variabilitat en l'ordenament O_{3+4+7}, a més d'una gran diferenciació entre ordenaments, donada per la presència de polimorfismes en la regió no codificadora que agrupen els dos ordenaments, així com unes diferències fixades en l'exò que comporten un canvi d'aminoàcid.

En resum, els nostres resultats mostren una menor variabilitat per l'ordenament O_{3+4+7}, deguda probablement a que és una inversió més recent que no pas l'O_{3+4} (Pegueroles *et al.*, 2010) encara que podria ser resultat d'un efecte selectiu recent. El fet que en menys de deu anys O_{3+4+7} hagi format clines latitudinals significatives a Nord America mentre que l' O_{3+4} no (Balanyà *et al.,* 2003), i que presenti variacions estacionals a Europa (Rodríguez-Trelles *et al.* 1996) recolza la hipòtesi selectiva per a explicar la baixa variabilitat en alguns dels gens estudiats. S'ha detectat diferenciació gènica significativa entre ordenaments, tot i que s'han trobat uns certs nivells de recombinació, però manca de diferenciació gènica entre poblacions pel mateix ordenament. A més, sembla que la recombinació entre ordenaments és menor pel gen *Fst*, situat a l'interior de la inversió, però també pel gen *Atpα*, malgrat que es troba situat a fora de la regió invertida. Per últim, quan es van realitzar les xarxes de recombinació per cadascun dels gens, es va trobar que gairebé per tots els nivells de recombinació eren molt elevats, excepte pels gens *Fst* i *Atpα*, on s'observaven dos grups clarament diferents donat que la recombinació entre individus d'ordenaments diferents és menor. A més, la presència de desequilibri de lligament entre posicions d'aquest dos gens que es troben localitzats a molta distància, podria explicar-se com a una possible interacció epistàtica entre aquests dos ordenaments.

Tenint en compte els nostres resultats, la teoria de la coadaptació entesa tal i com la va formular Dobzhansky, que implica la diferenciació del contingut genètic de les inversions entre diferents poblacions a més d'interaccions epistàtiques entre loci dins de la inversió (Dobzhansky, 1950) sembla que no s'aplica en *D. subobscura*, sinó que la hipòtesi més adient per a explicar el manteniment de les inversions a les poblacions seria la de l'adaptació local de (Kirkpatrick and Barton, 2006). A més, el fet de trobar una possible interacció epistàtica entre els gens *Fst* i *Atpα*, no refutaria la hipòtesi de l'adaptació local, ja que els autors d'aquesta teoria proposen que, tot i que no és indispensable, les interaccions epistàtiques ajudarien a mantenir el contingut genètic de les inversions.

4.5.2. Gen Hsp70

Com ja s'ha comentat anteriorment, en l'estudi de gens candidats a l'adaptació tèrmica es va incloure el gen *Hsp70* per la seva localització dins del fragment invertit de l'ordenament O_{3+4} i per la seva clara implicació en la resposta a l'estrès tèrmic. A més l'expressió d'aquest gen va ser analitzat entre diferents ordenaments com es descriu a l'últim apartat.

A *Drosophila melanogaster* la família gènica de les *Hsp70* està formada per gens induïbles per la calor i per gens que s'expressen constitutivament. Hi ha una altra famila de gens, 75-80% homòlegs a les *Hsp70*, anomenada *heat shock cognate genes* (hscs), que s'expressen regularment sota condicions normals de creixement (Palter *et al.*, 1986). En aquesta espècie, el gen *Hsp70* presenta 6 còpies, distribuïdes en dos *clústers* tal i com s'indica a la figura 4.17.

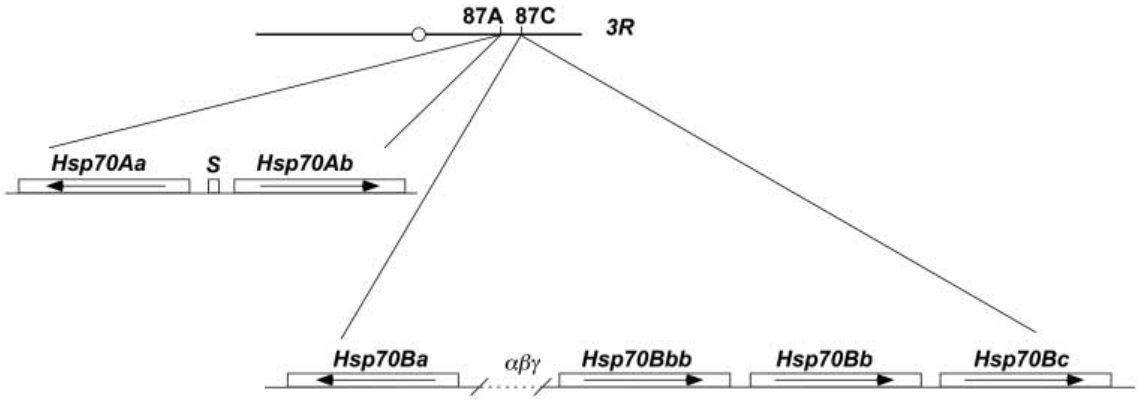


Figura 4.17: Disposició de les 6 còpies del gen *Hsp70* a *D. melanogaster*. (Gong and Golic, 2004b)

En canvi, el nombre de gens o còpies del gens *Hsp70*, així com la seva organització no es coneix per a moltes de les altres espècies de *Drosophila*. Sembla ser que la condició primitiva al gènere *Drosophila* és de dos còpies del gens *Hsp70* en posició invertida, formant un clúster (figura 4.18) i la seva localització citològica es dóna en l'element E de Muller (Bettencourt and Feder, 2001). Dins del grup *melanogaster*, sembla ser que la duplicació del clúster es va donar força recentment.

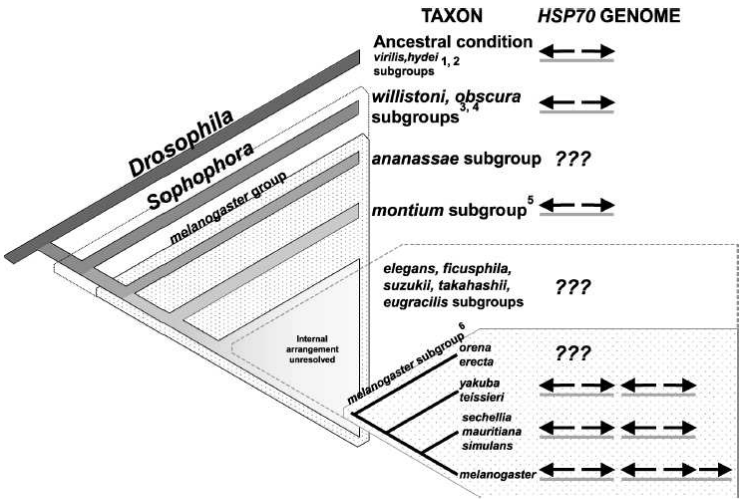


Figura 4.18: Nombre de còpies del gen *Hsp70* en relació a la filogènia de *Drosophila*.

Pel que fa al grup *obscura*, són pocs els estudis duts a terme amb aquest gen. A Moltó *et al.* (1992) es va analitzar la resposta al xoc tèrmic en les tres espècies del subgrup *subobscura* (*D. subobscura*, *D. madeirensis* i *D. guanche*) a través de l'estudi del patró de *puffs* en els cromosomes politènics després d'un xoc tèrmic. Van trobar que a les 3 espècies es formaven els mateixos *puffs*, però aquests presentaven diferent localització degut a les inversions paracèntriques que les separen. Es van descriure 8 *puffs* que van correspondre als gens d'Hsps descrits a *D. melanogaster* (*Hsp82*, *Hsp70*, *Hsp68*, i els gens codificadors per la familia de les Hsps petites). A més, van determinar que la Hsp70 és el producte majoritari sintetitzat després d'un xoc tèrmic en el subgrup *subobscura* (Moltó *et al*., 93).

Per tant, per tal de seqüenciar el gen de la *Hsp70* el primer pas fou localitzar el gen en el genoma de *D. subobscura*, que actualment està sent seqüenciat i assamblat (Barcelona Subobscura Initiative**)**. Per això, es van descarregar de la base de dades Flybase (www.flybase.org) les seqüències de nucleòtids de tots els gens de la familia *Hsp70* disponibles i es va realitzar un blast contra el genoma de *D. subobscura*. El resultat del blast va ser que totes les seqüències van donar el mateix *match* (contig 30615) que té una mida de 2405bp. També es va realitzar el procés amb la seqüència del gen *hsp68* de *D. melanogaster* i, en aquest cas, el resultat fou el contig (29169), que també correspon amb el segon match obtingut amb les seqüències de les *Hsp70*, posant de manifest l'alta similaritat entre els dos gens i les diferents còpies.

Un cop detectat el contig que contenia el gen, es van dissenyar dos parelles d'encebadors per tal d'amplificar-lo i seqüenciar-lo completament, ja que en teoria conté tot l'exó del *Hsp70* flanquejada de regió reguladora (figura 4.19):

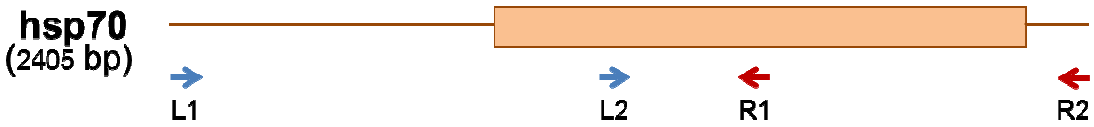


Figura 4.19: Diagrama d'un fragment del contig 30615 on es mostra la regió codificadora de la hsp70 amb la caixa de color. Les fletxes indiquen les dues parelles de primers dissenyades per amplificar tot el contig. Les fletxes blaves indiquen els primers forward i les vermelles els primers reverse.

Tot i que el resultat de l'amplificació de les dues parelles era 1 sola banda, al seqüenciar el producte amplificat, les seqüències dels encebadors L1 i R2 varen sortir molt brutes i en les dels encebadors L2 i R1 (situats a dins de l'exó) es varen detectar polimorfismes. Com que les proves de seqüenciació es van fer amb la soca homocariotípica *chcu,* es va analitzar el fitxer .ace del contig (Figura 4.20).

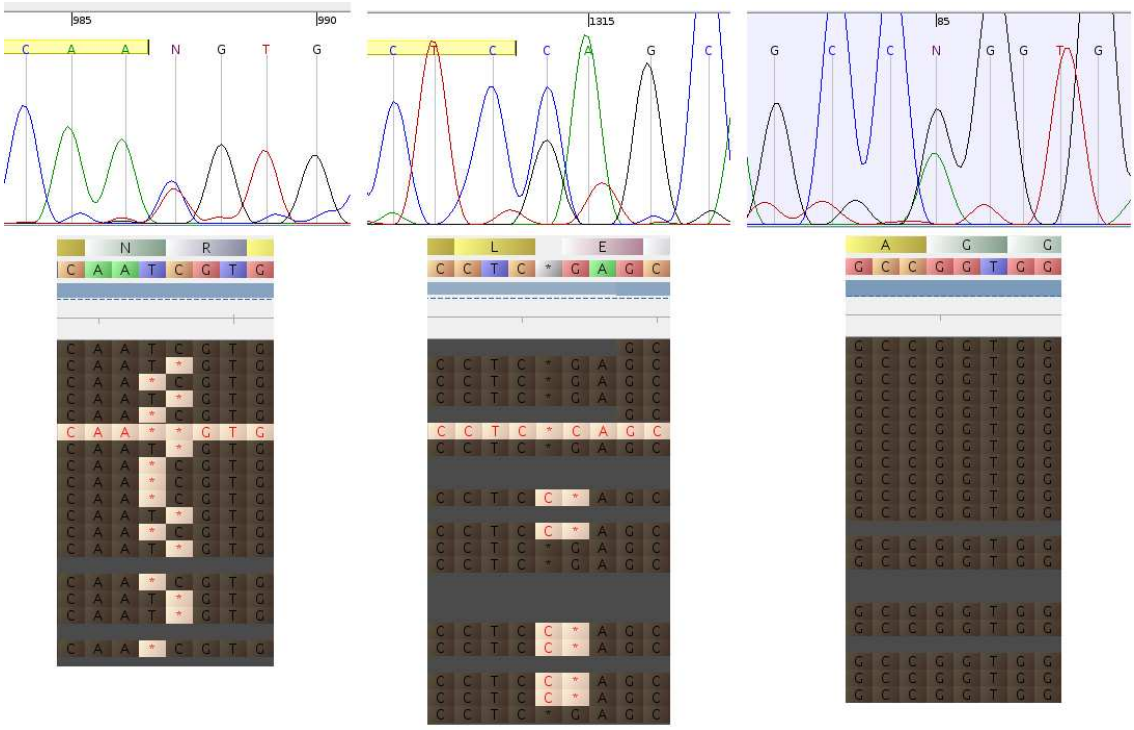


Figura 4.20: Comparació entre el cromatograma resultant de la seqüenciació de sanger (a dalt) i el fitxer .ace (a sota, amb el conjunt de *reads* que conformen el contig consens).

Els fitxers .ace contenen totes les seqüències (o *reads*) obtinguts amb la seqüenciació 454 alineades, de manera que a partir de l'alineament d'aquestes seqüències curtes s'obtenen els contigs. En mirar el fitxer, es va poder determinar si el polimorfisme detectat amb la seqüenciació de sanger eren polimorfismes reals o no. A la figura es pot apreciar que en els dos primers casos es veu perfectament que és un polimorfisme, ja que la meitat de les

seqüències del contig presenten un nucleòtid mentre que l'altra meitat presenten un de diferent. Podria ser un SNP (*single nucleotide polymorphism*), però com que la seqüenciació del genoma s'ha realitzat a partir de la soca *chcu*, que és homocariotípica, sembla que en realitat estem amplificant i seqüenciant dues copies (com a mínim) del gen. Un cop comprovades les seqüències, els polimorfismes trobats a R1 són tots polimorfismes, però els trobats a L2 són errors de seqüenciació (amb el mètode sanger).

Posteriorment, vam intentar identificar els canvis entre les 2 possibles còpies d'*Hsp70* a *D. subobscura*. Per fer-ho, vam buscar en el fitxer .ace seqüències que fossin suficientment llargues per contenir les dues posicions polimòrfiques, i així esbrinar la combinació dels polimorfismes. D'aquesta manera vam poder determinar que si a la primera posició polimòrfica trobem una T (timina), a la segona hi ha una G (guanina). En canvi, si a la primera posició trobem una C (citosina), a la segona també hi haurà una C (citosina). En els dos casos el canvi de nucleòtid afecta a la tercera posició del codó i tots dos donen lloc a canvis no sinònims.
Per tant, tot sembla indicar que les principals diferències entre les dues còpies es deuen trobar a la zona 5' reguladora. Però com que no es va aconseguir que el producte d'amplificació de la zona anterior del contig fos una única banda, es va intentar talla banda, clonar i seqüenciar els productes resultants. L'objectiu era intentar obtenir la seqüència de les dues còpies i veure com es troben orientades entre elles, però no va ser possible obtenir clons amb inserts grans.

Finalment, vam fer un alineament de la seqüència parcial obtinguda (només d'un fragment de l'exó i amb polimorfismes) amb les 5 còpies de *D. melanogaster* disponibles per tal de poder inferir a quina de les còpies s'assembla més la seqüència obtinguda a *D. subobscura*. Amb aquesta comparació podem concloure que el gen *Hsp70* té com a mínim dues còpies i que l'exó de les dues sembla completament invariable de manera que no va ser possible analitzar aquesta família gènica en els diferents ordenaments i poblacions.

4.6. ACLIMATACIÓ TÈRMICA

En aquest capítol es presentaran els resultats referents a l'experiment d'aclimatació tèrmica, en el que volem comprovar si els ordenaments cromosòmics "càlids" i "freds" " de *D. subobscura* presenten diferents nivells d'expressió de Hsp70. A més es va analitzar la seva relació amb la seva termotolerància. Per últim, relacionarem els nostres resultats amb els resultats de termoprefèrencia del treball de Dolgova *et al.* (2010) obtinguts a partir del mateix material. D'aquesta manera, discutirem la possible existència d'una co-adaptació entre aquests dos caràcters. A més, es discutirà la connexió dels nostres resultats amb les clines latitudinals, la variació estacional i diària en les freqüències dels ordenaments cromosòmics del cromosoma O.

4.6.1. Quantificació de HSP70 després d'un xoc tèrmic.

A la Taula 4.22 es presenten els resultats per a la quantificació dels nivells de proteïna Hsp70. En tots els casos, els nivells globals de proteïna Hsp70 van augmentar després del xoc tèrmic, tal i com s'esperava. Per contra, no es van trobar diferències significatives entre sexes ni ordenaments ni entre les interaccions sexe x tractament o sexe x ordenaments.

També es van detectar diferències significatives entre els 3 cariotips, que al fer el contrast linear posterior es va poder veure que aquestes eren degudes principalment a que el cariotip càlid (*warm-adapted*) $O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$ presenta nivells superiors de proteïna HSP70 (un 5% de mitjana) que els individus portadors del cariotip fred (*cold-adapted*) O_{ST} / O_{ST}. A més, es va trobar una interacció significativa entre cariotip i tractament molt interessant a la vegada que inesperada (Taula 4.22, Figura 4.21). Com es pot observar a la figura, el valors dels nivells basals d'HSP70 dels homocariotips$O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$ són superiors i a més no van incrementar després del xoc tèrmic, mentre que en els altres dos cariotips l'increment entre el nivell basal i induït va rondar sobre el 30%. Per altra banda, tots els individus tractats van mostrar nivells de proteïna similars, sense diferències significatives. A més, el contrast linear comparant els homocariotips $O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$ i O_{ST} / O_{ST} pel que fa a l'efecte de la interacció cariotip i tractament clarament indica que els ordenaments càlid i fred es comporten de manera completament diferent per als nivells de HSP70 tenint en compte els seus nivells basals i induïts, mentre que $O_{\underline{3+4+8}}$ / $O_{\underline{3+4+8}}$ mostra un comportament similar a O_{ST} / O_{ST} (Figura 4.21).

Taula 4.22: Efectes de cariotip ($O_{\underline{3+4}}$/ $O_{\underline{3+4}}$, $O_{\underline{3+4+8}}$ /$O_{\underline{3+4+8}}$ i O_{ST} / O_{ST}), sexe i tractament (basal i induït)sobre els nivells d'expressió de la proteïna Hsp70. (⊂ significa "niuat a").

Font de variació	g.ll.	Quadrats Mitjans	*F*	*P*
Cariotip (K)	2	0,325	5,39	**0,010**
$O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$ *vs*. O_{ST} /O_{ST}	1	0,323	5,35	**0,035**
Encreuament ⊂ K	15	0,059	0,95	0,516
Sexe (S)	1	0,035	0,55	0,460
Tractament (T)	1	0,388	6,17	**0,015**
K x S	2	0,024	0,38	0,687
K x T	2	0,359	5,72	**0,004**
$O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$ *vs*. O_{ST} /O_{ST}	1	0,426	6,79	**0,010**
S x T	1	0,018	0,29	0,590
K x S x T	2	0,046	0,74	0,481
Error	108	0,063		

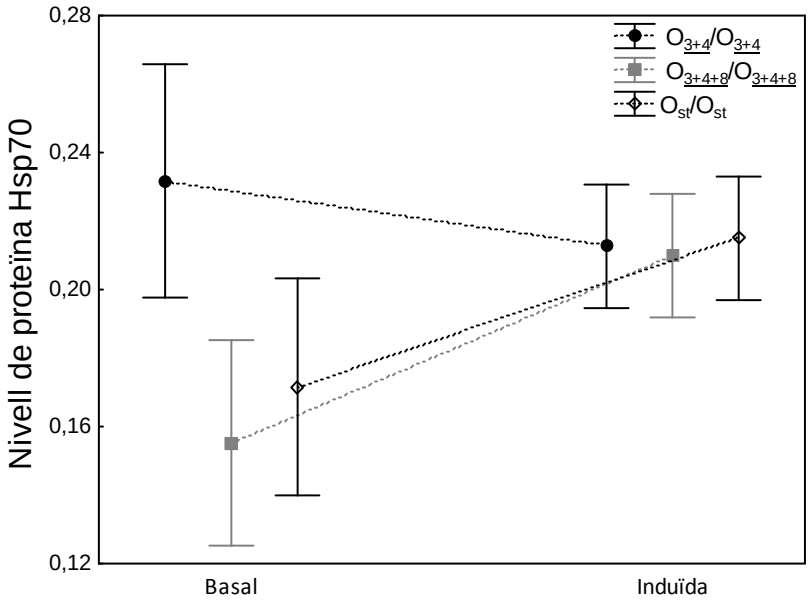


Figura 4.21: Valors mitjans dels nivells de proteïna HSP70 mesurats com a absorvància de la reacció ELISA en individus adults de *Drosophila subobscura* (mascles i femelles combinats). Les barres indiquen els intervals de confiança del 95%

La falta d'inducció de hSP70 en les mosques $O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$ podria ser donada a que en aquests individus es necessita una temperatura llindar superior que la temperatura que necessiten els individus O_{ST} / O_{ST} i $O_{\underline{3+4+8}}$ / $O_{\underline{3+4+8}}$ (Figura 4.21). No obstant, aquesta explicació no té gaire

sentit si considerem que la temperatura utilitzada per realitzar el xoc tèrmic és 10°C per sobre el marge superior del rang de temperatura de preferència $\left(T_{\text{set}}\right)$ (50% central de les temperatures corporals preferides; (Hertz *et al.*, 1993) dels homocariotips de l'ordenament càlid $O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$ (T_{set} = 16,6°C – 22,2°C; Dolgova *et al.*, 2010), i només 3,2°C per sota de la temperatura mitjana de knockdown en l'experiment d'increment de temperatura lent. Per tant, sembla raonable assumir que les condicions d'exposició tèrmica utilitzada en aquest estudi són suficients per a engegar la inducció de la resposta a l'estrès tèrmic en tots els homocariotips utilitzats en els experiments.

La sobreproducció de proteïna HSP70 a temperatura normal té conseqüències deletèries en les cèl·lules de *Drosophila* (Feder *et al.*, 1992), i afecta negativament el desenvolupament larvari (Krebs and Feder, 1997) i la fecunditat de les femelles (Krebs and Loeschcke, 1994). Aquests estudis han portat a la idea que el diferent número de còpies d'aquest gen presents a *D. melanogaster* (sis còpies per genoma haploid*;* (Gong and Golic, 2004) representa un equilibri entre la selecció per a la formació de proteïna sota les condicions estressants contra els seus efectes deleteris sobre la *fitness* (Feder and Hofmann, 1999). Tal i com descriu Sørensen (2010), "no sempre queda clar quan els nivells d'expressió basals i constitutius de proteïnes de xoc tèrmic (HSP) s'han d'interpretar com un reflex de l'habilitat o capacitat de tenir una resposta forta (és a dir, com un benefici) o quan s'ha d'interpretar com un reflex de la necessitat d'una resposta quan l'organisme està sotmès a estrès (és a dir, com una despesa).

Si aquest raonament despesa-benefici s'aplica a *D. subobscura*, la pregunta que hom es pot fer és: per què els nivells basals de proteïna HSP70 dels homocariotips $O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$ són aproximadament els mateixos que els obtinguts pels altres cariotips després del xoc tèrmic? La explicació aparentment obvia és que les poblacions del sud d'Europa, on la freqüència d'aquests ordenaments cromosòmics és relativament alta (Solé *et al.*, 2002), és més probable que estiguin exposats sovint a temperatures més altes que les que pateixen les poblacions situades en latituds més altes, i així, els beneficis de desencadenar la resposta a l'estrès podria ser compensat per les despeses de mantenir els nivells d'HSP70. Això també concorda amb els resultats de (Huey and Pascual, 2009), en que les mosques actives presenten una temperatura corporal menor en les estacions fredes i també a latituds més altes. A més, les fluctuacions oposades entre les mosques portadores dels ordenaments $O_{\underline{3+4}}$ i O_{ST}, on la freqüència d'$O_{\underline{3+4}}$ augmenta a l'estiu i disminueix a l'hivern (Rodríguez-Trelles *et al.*, 1996), també sembla afavorir aquesta interpretació. Per últim, el comportament similar de les mosques O_{ST} / O_{ST} i $O_{\underline{3+4+8}}$ / $O_{\underline{3+4+8}}$ pel que fa a l'expressió de la proteïna HSP70 probablement mereix alguns

comentaris. Tradicionalment, l'ordenament $O_{\underline{3+4+8}}$ s'ha considerat com càlid: la seva correlació negativa amb la latitud a l'àrea Paleàrtica es deu a les altes freqüència en el nord d'Àfrica (Menozzi and Krimbas, 1992). No obstant, no es van observar cap clina per a aquest ordenament en les àrees colonitzades (Balanyà *et al.,* 2003) i estudis recents mostren que l'ordenament $O_{\underline{3+4+8}}$ està incrementant molt en les poblacions del Nord d'Europa (Rezende *et al.*, 2010; el present treball), que fa que ens plantegem la classificació d'aquest ordenament com a càlid. Per tant, el patró oposat de l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ en front dels altres dos podria ser degut a diferències en el contingut genètic d'aquest ordenament càlid. Hi ha dues possibles hipòtesis que podrien explicar els nivells d'expressió de proteïna HSP70 superiors de l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$. Per una banda, Bettencourt *et al.*, (2008) han relacionat de manera positiva la termotolerància basal amb el número de còpies del gen Hsp70 a *D. melanogaster*. D'aquesta manera, un diferents nombre de còpies d'aquest gen en els diferents ordenaments de *D. subobscura*, amb un nombre major en l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$, podrien explicar els nostres resultats. La segona hipòtesi estaria relacionada en que diferències en la regió cis-reguladora d'aquest gen podrien donar lloc a diferències en la seva expressió, com ja ha estat trobat a *D. melanogaster* (Bettencourt *et al.*, 2002). No obstant, són necessaris més experiments com ara la seqüenciació d'aquesta regió en els diferents ordenaments, cosa que fins ara no ha estat possible malgrat els esforços realitzats com s'ha descrit en l'apartat anterior, per tal de determinar quina de les dues hipòtesis és la més probable.

4.6.2. Termotolerància basal i induïda

Els resultats pels assajos de termotolerància estan representats a la Figura 4.22. Es van comparar les temperatures de *knockdown* en mascles i femelles per separat, en individus control (tolerància basal) i individus *hardened* (tolerància induïda al sotmetre als individus a 32°C durant 1h i posteriorment deixant recuperar la seva mobilitat normal abans de ser sotmesos a l'assaig dinàmic), i contrastant els resultats d'un increment ràpid i un increment lent de la temperatura. En l'assaig amb increment ràpid de temperatura la mesura de l'error es va estimar com 1 menys el coeficient de correlació intraclasse entre les dues temperatures de *knockdown* calculades a partir d'analitzar els vídeos gravats i va ser del 18%. No obstant, com que amb cadascuna de les temperatures de *knockdown* estimades s'arribava a les mateixes conclusions, finalment es va utilitzar la mitjana dels dos valors com a valor de tolerància tèrmica.

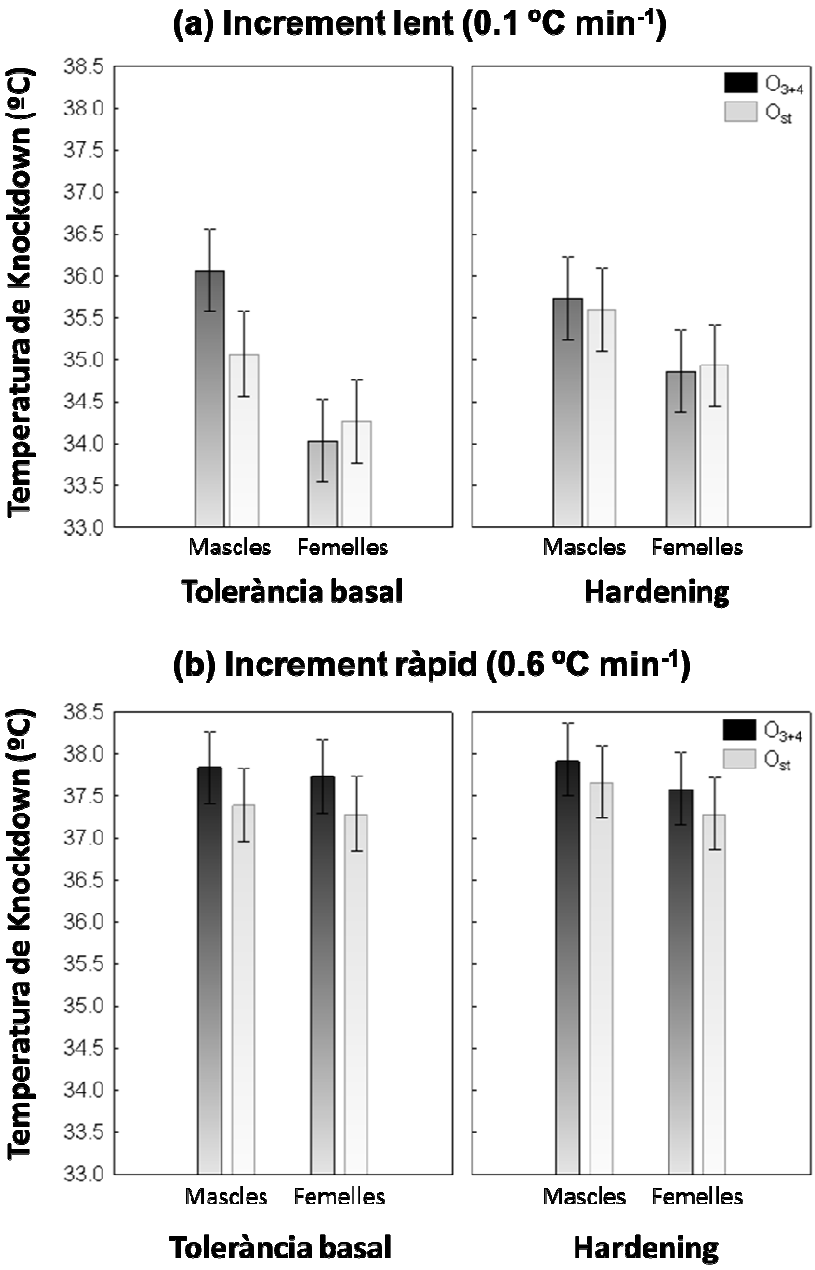


Figura 4.22: Temperatures de *knockdown* en mosques *hardened* i *non-hardened* portadores dels cariorips càlid (O_{3+4} / O_{3+4}) i fred (O_{ST} / O_{ST}) a *Drosophila subobscura* en un assaig dinàmic sota (a) un increment de temperatura lent i (b) un increment de temperatura ràpid. Les barres d'error representen l'interval de confiança del 95%.

La temperatura mitjana de *knockdown* en l'assaig amb increment de temperatura lent (mitjana ± SD: 35,07 ± 1,57°C) va ser substancialment menor que en l'assaig utilitzant l'increment de temperatura ràpid (37,59 ± 1,19°C). Això està en concordança amb el que s'ha observat a *Drosophila melanogaster* per Chown *et al.*, (2009) i el predit segons els models teòrics de Rezende *et al.*, (2011) i Santos *et al.*, (2011). Els coeficients de correlació de Pearson entre les

temperatures de *knockdown* calculades en les diferents condicions d'increment de temperatura (tenint en compte la termotolerància basal i induïda per separat), i utilitzant la temperatura mitjana combinada de cadascun dels creuaments com a variable rellevant no varen ser estadísticament diferents de cero després d'aplicar la correcció de Bonferroni (Taula 4.23).

Taula 4.23: Coeficients de correlació de Pearson entre les temperatures de knockdown estimades dels assajos d'increment lent ($\Delta T = 0{,}1°C\ min^{-1}$) i ràpid ($\Delta T = 0{,}6°C\ min^{-1}$).

	Basal	**Induïda**
Femelles	0,6412	0,2994
Mascles	0,0244	0,5197

Quan es comparen els resultats de la termotolerància basal amb la induïda, només s'observa una major tolerància tèrmica en els individus induïts en el cas de l'assaig utilitzant un increment de temperatura lent, però no quan s'utilitza l'increment de temperatura ràpid (Taula 4.24).

Taula 4.24: ANOVA pels efectes de cariotip ($O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$ i O_{ST} / O_{ST}), sexe i tractament (tolerància tèrmica basal i induïda) sobre les temperatures de knockdown estimades mitjançant dos assaigs dinàmics. Les condicions per l'assaig amb increment de temperatura lent van ser T_0 = 24°C i ΔT = 0,1°C min^{-1} ('*slow-ramping*'; dades representades a la Fig.4.22a) i per l'assaig amb increment de temperatura ràpid T_0 = 24°C i ΔT = 0,6°C min^{-1} ('*fast-ramping*'; dades representades a la Fig.4.22b). ⊂ significa 'niuat dins de'.

Font de variació	**Increment lent**				**Increment ràpid**			
	d.f.	**MS**	***F***	***P***	**d.f.**	**MS**	***F***	***P***
Covariable (bany)	1	0,711	0,38	0,539	1	0,059	0,04	0,840
Cariotip (K)	1	2,557	0,33	0,583	1	7,891	9,19	**0,016**
Creuament ⊂ K	8	7,828	4,16	**< 0,001**	8	0,859	0,60	0,776
Sexe (S)	1	71,007	37,77	**< 0,001**	1	3,125	2,19	0,140
Tractament (T)	1	10,691	5,69	**0,018**	1	0,160	0,11	0,738
K x S	1	7,594	4,04	**0,046**	1	0,002	0,00	0,967
K x T	1	1,800	0,96	0,329	1	0,419	0,29	0,589
S x T	1	6,319	3,36	0,068	1	0,944	0,66	0,417
K x S x T	1	3,937	2,09	0,149	1	0,008	0,01	0,940
Error	221	1,880			219	1,427		

En canvi, només es van trobar diferències entre cariotips amb l'increment de temperatura ràpid: les mosques O_{3+4}/O_{3+4} presenten temperatures de knockdown majors que les O_{ST}/O_{ST} (37,77°C *vs*. 37,41°C).

Relació entre termotolerància i nivells d'expressió d'Hsp70

Si el grau de termotolerància de les nostres mosques estigués completament relacionada amb els nivells de proteïna HSP70, esperaríem que les mosques O_{ST}/O_{ST} presentessin més o menys la mateixa temperatura de knockdown mitjana que els individus O_{3+4}/O_{3+4} després del tractament, quan els nivells d'HSP70 són similars en tots els cariotips (Figura 4.21). Per contra, la interacció cariotip x tractament no va ser significativa per a cap cas (els efectes del *hardening* van estar absents en l'experiment amb l'increment ràpid de temperatura). Per tant, en base als nostres resultats, és difícil de concloure que els nivells superiors d'HSP70 en els individus portadors de l'ordenament càlid O_{3+4}/O_{3+4} estan vinculats de manera causal amb una termotolerància basal superior.

La funció de la proteïna de xoc tèrmic HSP70 en la tolerància a la calor en adults de *Drosophila* segueix sense ser del tot clara (Dahlgaard *et al.*, 1998; Krebs *et al.*, 1998; Sørensen *et al.*, 1999; Folk *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2010). Es podria pensar que la raó d'això es troba en que els diferents protocols que s'han utilitzat per tal de determinar la CT_{max} pot ser que capturin diferents mecanismes fisiològics o genètics subjacents a la termotolerància, ja que les diferents estimes (temps o temperatures de knockdown) estan poc correlacionades (Sgrò *et al.*, 2010). En aquest estudi també s'ha detectat poca correlació entre les temperatures de knockdown estimades en els dos assajos utilitzats, però probablement això no és degut a que s'hagin estimat coses diferents. Una explicació més raonable seria que la quantitat de soroll experimental introduït per la metodologia emprada per a mesurar de manera fiable la termotolerància és considerable, tal i com suggereix la baixa repetibilitat que presenta aquest caràcter (sobre un 0,2; (Krebs and Loeschcke, 1997) i confirmat per l'aproximació teòrica de Santos *et al.,* (2011) i experimental de Castañeda *et al.*, (2012) en el que mostren que molts dels protocols experimentals donen lloc a estimacions de la CT_{max} poc fiables i molt diferents.

Recentment, han sortit una sèrie d'articles que recomanen que la taxa d'increment de temperatura en experiments que tinguin com a objectiu l'estudi de la tolerància tèrmica ha de ser el més ràpida possible per tal de minimitzar la contribució de variables que no es poden controlar com ara l'esgotament de recursos durant l'assaig o bé la resposta d'aclimatació a curt termini o efectes estocàstics (Rezende *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011; Castañeda *et al.*,

2012). En el context d'aquest estudi, el protocol d'increment lent de temperatura pot subestimar les diferències genètiques que provoquen diferències en els límits tèrmics crítics (Rezende *et al.*, 2011), que podrien explicar perquè no es varen trobar diferències de termotolerància entre cariotips en l'estudi previ dut a terme en el nostre grup (Dolgova *et al.*, 2010). Així doncs, en el present estudi, en el que es va dur a terme el mateix assaig però amb un increment de temperatura ràpid, es mostra una representació molt més acurada de les diferències genètiques pel que fa a la tolerància tèrmica entre les mosques O_{ST}/O_{ST} i $O_{\underline{3+4}}/O_{\underline{3+4}}$.

En resum, aquest estudi suggereix que els cariotips càlids de *D. subobscura* són més capaços d'enfrontar-se a temperatures d'estrès més altes que els individus portadors d'ordenaments freds. Aquesta major termotolerància combinada amb la major preferència tèrmica (els individus portadors de l'$O_{\underline{3+4}}$ prefereixen temperatures majors que els O_{ST}; Dolgova *et al.*, 2010), ens permet concloure que per a aquesta espècie trobem suport per a la hipòtesi de la coadaptació tèrmica que pot servir també per a explicar des d'un enfoc adaptatiu els patrons d'activitat diaris que es donen a l'estiu, en els quals els individus portadors de l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$ són més actius al migdia (Savkovic *et al.*, 2004). No obstant, encara no podem determinar la relació causal entre els comparativament nivells superiors de proteïna d'estrès tèrmic i la major tolerància tèrmica de les mosques $O_{\underline{3+4}}$ / $O_{\underline{3+4}}$.

5. CONCLUSIONS

1. S'han detectat clines latitudinals només en els ordenaments $O_{\underline{3+4+7}}$ i O_{ST}. En els ordenaments $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+8}}$ els signes dels coeficients de regressió versus latitud són els mateixos que els descrits prèviament tot i no presentar clines significatives.

2. El contingut genètic d'un determinat ordenament cromosòmic és constant a totes les poblacions tant a nivell de *loci* microsatèl·lit com de gens candidats a l'adaptació tèrmica. Per tant, el flux gènic entre poblacions sembla ser força elevat.

3. Per contra, s'ha trobat diferenciació genètica entre els diferents ordenaments. Dels quatre ordenaments analitzats amb *loci* microsatèl·lits l'O_{ST} és el mes diferent, sobretot quan es considera la regió I, que és on es localitzen la majoria de les inversions analitzades.

4. Amb l'anàlisi del desequilibri de lligament (LD), s'ha observat que tots els *loci* microsatèl·lit situats en la regió I presenten LD amb l' O_{ST} i, a més, en dos d'ells és causat pel mateix al·lel en les diferents poblacions.

5. S'ha trobat diferenciació genètica entre els ordenament $O_{\underline{3+4}}$ i $O_{\underline{3+4+7}}$ pels gens situats dins de la inversió O_7, així com pel gen *Atpα* tot i que es localitza fora de la inversió. A més, les xarxes de recombinació dutes a terme amb els gens concatenats mostren dos clades que corresponen als dos ordenaments analitzats.

6. El fort LD entre els gens *Fst* i *Atpα*, separats per 14Mb i un dins i l'altre fóra de la inversió O_7, suggeriria l'existència d'interaccions epistàtiques entre ells.

7. Tenint en compte els nostres resultats, la hipòtesi de l'adaptació local és la que millor explicaria el manteniment de les inversions del cromosoma O de *D. subobscura*.

8. Els homocariotips $O_{\underline{3+4}}$ varen presentar uns valors molt elevats en els nivells basals d'HSP70, equivalents als nivells de proteïna mesurats després d'un xoc tèrmic a qualsevol dels homocariotips.

9. S'ha demostrat que la taxa d'increment de temperatura utilitzada en els assaigs dinàmics per a calcular la T_{ko} pot afectar molt als resultats obtinguts.

10. La major termotolerància, termopreferencia i nivells d'expressió d'HSP70 de les mosques portadores de l'ordenament $O_{\underline{3+4}}$, en relació al O_{ST}, podrien estar relacionats amb la clina latitudinal d'aquest ordenament.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

SUMMARY

Chromosomal inversions

Chromosomal inversions are a type of genome alterations where a segment of the chromosome changes its orientation inside the chromosome. Inversions can be paracentric, affecting only one arm of the chromosome or pericentric if the inversion includes the centromere. Within the genus *Drosophila*, the paracentric inversions are the most frequent chromosome changes, being polymorphic about a 60% of the species (Powell, 1997).

From the classical point of view, inversions are formed due to the occurrence of two simultaneous and random breaks in a single chromosome, followed by incorrect repair of breaks, which causes the generated join fragment in inverted orientation (Krimbas and Powell, 1992). It has been also proposed that inversions are the result of ectopic recombination, supported by the existence, in some *Drosophila* species, of transposable elements in the inversion breakpoints (Cáceres, 2000). More recently, the staggered breaks model (Casals and Navarro, 2007) has been proposed, which claim that duplications at the breakpoints of inversions are not the cause, but the product of staggered breaks caused by the occurrence of an inversion. But despite different models to explain inversions formation there is general agreement in considering each inversion and arrangement to be monophyletic.

Genetic effect of inversions

The main effect of inversions in heterokaryotypic individuals is the reduction of recombination inside the inverted region. In *Drosophila* fitness reduction in heterokaryotypes for paracentric inversions is avoided in males due to their lack of recombination, and in females due to that only one gamete produces the egg while the rest form the polar bodies. The level of recombination inhibition in females depends on the size of inversions. Thus, in small or overlapped inversions recombination is almost suppressed due to mechanical pairing problems in whereas in large inversions recombination events can appear in the central region of inversions. In this case, the products of simple or odd crossovers within inversions originate unbalanced and not viable gametes. The result of this inhibition is that the chromosome inversions are inherited intact as single simple Mendelian units (Powell, 1997), with genetic exchange among them mediated by double crossovers and gene conversion.

Inversion polymorphism

A species present inversion polymorphism when two or more chromosomal arrangement naturally occurs in its populations. The extent and patterns of chromosomal polymorphism in the genus *Drosophila* is well studied and documented in Sperlich and Pfriem (1986), Krimbas and Powell (1992) and Powell (1997). The exhaustive study of the inversion polymorphism in the different species of *Drosophila* allowed determining that in many species the different arrangements present both geographic and or temporary variations (Powell, 1992). Moreover, the analysis of these spatial and temporary patterns in some *Drosophila* species allowed pointing out the evidence of selection (Powell, 1992; Umina *et al.,* 2005; Balanyà *et al.*, 2006).

However, the reason why these polymorphisms persist in wild populations is not clear, and still remains to be explained. And understanding the mechanisms of the adaptive role of inversions involves molecular studies of the genic content of chromosomal rearrangements and its recombination dynamics. Three main hypotheses have been proposed to explain the adaptive value of inversions: the Coadaptation hypothesis by Dobszhansky (1950), the supergene selection postulated by Wassermann (1968) and the Local adaptation hypothesis by Kirkpatrick and Barton (2006). The coadaptation hypothesis postulates that chromosomal arrangements maintain a set of alleles that epistatically interact among them with those from the other arrangements of the same populations, in a way that the heterozygote individuals present a higher fitness (Dobzhansky, 1950). The genetic exchange between chromosomal inversions from different populations would disrupt the coadapted complex and would produce offspring with lower fitness. The supergen selection states that different coadapted complexes can be found within a chromosomal arrangement. Thus, the structural homozygosity does not imply genetic homozygosity (Wassermann, 1968). Homokayotypic individuals would present lower fitness because recombination can disrupt the epistatic interactions. Finally, according to the local adaptation hypothesis, when an inversion is created it will retain a set of genes specifically adapted to environmental conditions of the population. The inhibition of recombination in the inverted region maintains intact the adapted alleles and also stabilizes them against gene exchange with migrants from other populations or genetic content. Thus, inversions are favored (even without epistasis) and are established in the populations to keep the adapted complexes of genes (Kirkpatrick and Barton, 2006).

Drosophila subobscura

Drosophila subobscura is a Paleartic species which presents a rich chromosomal inversion polymorphism on its five acrocentric chromosomes, many of these showing latitudinal clines (Krimbas, 1993). Three decades ago this species colonized the South and North American subcontinents, where similar clines to the ones found in the Old World were soon detected, as an indication of their adaptive nature (Prevosti *et al.,* 1988; Balanyà *et al.,* 2006). Moreover, seasonal fluctuations have also been described, mainly for the O chromosomal arrangements, which are in concordance with the geographical distribution of the arrangements. According to their association with latitude and ambient temperature we can classify the inversions as "warm-adapted" or "cold-adapted" (Menozzi and Krimbas, 1992). For example, $O_{ST,}$ is a typical cold-adapted chromosomal gene arrangement because it presents very high frequencies in Northern Europe while it is almost inexistent in the Iberian Peninsula, whereas $O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$ shows the opposite pattern and it is considered warm-adapted. However, the selective forces shaping these clines remain unclear. Temperature seems an obvious candidate, due to its association with latitude. Furthermore, chromosomal arrangement frequencies correlate with ambient temperature in all continents and recent changes in frequency have proved to track global warming (Balanyà *et al.*, 2006, 2009).

Thermal adaptation

Climatic factors determine the geographical limits of many species, but temperature is one of the most important variables that delimit their abundance and distribution (Parmesan, 2006). Thus, it can be considered that temperature is an important selective agent.

In the last century, global warming is occurring as a consequence of the greenhouse effect. And it has been demonstrated that it is one of the major causes of the reduction of the biodiversity of the planet (IPCC, 2001). The changes in the environment act as selective agents and generally, the adaptation to the new environment can be through behavioral or physiological modifications, or through genetic adaptation by natural selection (Hoffmann and Parsons, 1991). Examples of these responses have been found in nature, many of them at the phenological level. In the last 50 years, up to 80% of species have moved their distribution towards the north (Root *et al.*, 2003) and many of them have advanced their reproduction or development in the same way that temperatures have increased (Parmesan, 2006). But also changes at the genetic level have been found in different species of the *Drosophila* genus

(Levitan, 2003; Umina *et al*., 2005) and particularly in *D. subobscura* (Rodríguez-Trellez and Rodríguez, 1998; Balanyà *et al.,* 2006).

To cope with the increasing temperatures, the organisms can present responses at the behavioral level (thermopreference), physiological responses (phenotypic plasticity) or genetic responses (thermotolerance). One of the best studied areas is the relationship between the heat tolerance and the expression of heat shock proteins (Hsps). This relation has been found in all studied organism and it has been observed that the induction of Hsps is related with the improving of their thermotolerance (Krebs and Feder, 1998).

Objectives

The main objective of the present work was to investigate and determinate in *D. subobscura* which is the role of chromosomal inversions in the adaptation to the environment and how are maintained in the populations. To discriminate between different hypotheses, we analyzed the genetic content of inversions of the O chromosome from seven different populations along a latitudinal cline, using different molecular markers such as microsatellite loci and candidate genes for thermal adaptation. Moreover, we have studied the relationship of different chromosomal arrangements with the thermotolerance and the heat shock response of the individuals carrying them, to test if particular gene arrangements are associated with higher thermal resistance.

Results and discussion

In the first part of the study the results of the populations sampled are presented. Seven populations distributed along a latitudinal gradient from Groningen (The Netherlands), in the north, to Málaga (Spain), in the south, were sampled approximately at the same dates to avoid seasonal biases. Thirteen different species were collected, with *D. subobscura* being the most abundant in three localities. We also collected for the first time in Europe *D. suzukii* (Calabria *et al.,* 2012), an Asian invasive pest species that ovoposits and feeds on healthy fruits, unlike most other *Drosophila* species.

For *D. subobscura* individuals from each population, wild caught males or males descendant from wild females were individually crossed with virgin females of the *chcu* mutant strain, that carries the recessive markers *cherry* eyes and *curled* wings and is homokaryotypic for the chromosomal arrangements A_{st}, J_{st}, U_{st}, E_{st} and $O_{\underline{3+4}}$. One third-instar larva from each cross was dissected and its polytene chromosomes examined to assess the chromosomal polymorphism

of each population. Furthermore, each larva was posteriorly analyzed with microsatellite loci to specifically infer the haplotype of each wild O chromosome. We analyzed for the most frequent arrangements (O_{3+4}, O_{3+4+7}, O_{3+4+8} and O_{ST}) their frequency distribution along the latitudinal gradient and found that the arrangements O_{3+4+7} and O_{ST} were the ones presenting significant latitudinal clines but with opposite sign. For the O_{3+4} arrangement, a typically considered "warm" arrangement, the latitudinal cline was only found when considering all the O_{3+4+X} chromosomes in the populations. The O_{3+4+8} arrangement was the only one that did not present significant cline although we observed that this arrangement is increasing its frequency in the northern localities, as previously reported (Balanyà *et al.*, 2004). In addition, to obtain wild O chromosomes in homozygous condition for the Iberian populations (Spain), appropriate crosses using the lethal balanced strain Va/Ba were carried out (Sperlich *et al*., 1977; Mestres *et al.*, 1990). Homokaryotypic lines were used for sequencing candidate genes from the different populations as well as for studying their heat response.

For the population of Málaga, three of the chromosomal lines obtained presented a wing mutation. Two of them (*aa* and *ac*) were not previously described, whereas the other was the *dumpy* mutant (Calabria *et al.,* 2009; Calabria and Mestres, 2009).

In the second part of the study we analyzed the genetic content of the same four arrangements (O_{3+4}, O_{3+4+7}, O_{3+4+8} and O_{ST}) with microsatellite markers. A total of 635 individuals were genotyped for 13 microsatellites (Pascual *et al*., 2000) that cover the entire O chromosome (Santos *et al.,* 2010) following the protocol described in Pegueroles *et al*. (2010a), with some modifications. Up to 30 individuals for each arrangement and population were analyzed. We also detected a threshold effect in the genetic variability of inversions. We found that in the populations where the frequency of the inversion was below the 15%, genetic variability was significantly lower than in populations where the arrangement was more frequent. We found that the genetic content of inversions is highly uniform as we did not find significant differences among populations for the same arrangement, in none of the four arrangements assayed. However, we found high genetic differences among arrangements, especially between the O_{ST} arrangement and the rest. The differences were even higher when considering only region I, were almost all inversions are located. Moreover, for the O_{ST} arrangement we found significant lower levels of genetic variability, especially for *loci* dsub04 and dsub29. For this inversion we found high levels of LD between *loci* located in region I. Furthermore, for locus dsub04 the same allele (196) presented LD with inversion O_{ST} in almost all populations, whereas for locus dsb29 the same allele (252) showed LD with this inversion in

all the populations. These observations suggest that selection is occurring in this arrangement. With the software STRUCTURE four genetically differentiated groups were detected that correspond to the four arrangements analyzed, independently to their population of origin. Nonetheless, when this analysis was carried out for the two regions separately, the results showed that the two regions behave differently. In this way, for region I we detected three groups corresponding to the three arrangements located in this region because the arrangement O_{3+4+7} it is actually O_{3+4} in relation to region I. The same explanation is valid for region II, where only two groups were found, one corresponding to the individuals carrying an inversion in this region (O_{3+4+7}) and the other group corresponding to the rest of individuals, because all of them present the standard arrangement in this region of the chromosome.

In the third part of the study, we focused in region II. In the previous study using microsatellites we found that in that region O_{3+4+7} was genetically differentiated from all the other arrangements either warm (O_{3+4} and O_{3+4+8}) or cold-adapted (O_{ST}). For this reason, we focused only in arrangements O_{3+4} and O_{3+4+7}, both considered warm-adapted and the most frequent in the Southern populations, which ensured having a good representative number of homokaryotypic lines for each arrangement from the different populations. Four differentially expressed candidate genes under different temperature conditions (Laayouni *et al*., 2007), were selected according to their cytological location on the O chromosome (Pegueroles, 2010): *Fst* and *Sqd,* located inside the O_7 inversion and near the proximal and distal breakpoints, respectively; and *Yrt* and *Atpα* located outside the inversion but in its influence region (Pegueroles *et al*., 2010b). For the populations of Málaga, València and Barcelona, 10 homokaryotypic individuals for each arrangement were sequenced for each gene, following the protocol described in Pegueroles (2010). In general, we did not find differences among populations within the same arrangement, as preciously found with microsatellites. When comparing the two arrangements, we found genetic differentiation for the gens located inside the inversion and also the *Atpα* gene. Moreover, strong LD was found between *Fst* and *Atpα*, despite being located 14Mb apart. These two genes present polymorphic sites that entail aminoacidic changes that differentiate the two arrangements, and the association between them could suggest the existence of epistatic interactions between these two genes. Finally, when the recombination networks for the concatenated dataset were computed, two clades corresponding to the two arrangements were obtained. Inside the clades, no differentiation among populations was detected, confirming the uniformity within inversions and the differentiation between them, although some recombinants were detected.

Three main hypotheses have been proposed to address the selective mechanisms underlying inversion polymorphisms: the coadaptation *sensu* Dobzhansky (Dobzhansky, 1950), the supergene selection (Wasserman, 1968) and the local adaptation model (Kirkpatrick and Barton, 2006). Under the coadaptation and the supergene selection models we would expect genetic variation on the chromosomal arrangements but also within arrangements among populations. On the contrary, under the local adaptation model it is expected that, within an inversion, the genetic content would remain constant across the different populations and although epistatic interactions among genes are not required it is suggested that positive synergism between locally adapted alleles makes an inversion that carries two or more of them even more fit (Kirkpatrick and Barton, 2006).

Thus, our results are in accordance with the local adaptation scenario. The genetic content of the different chromosomal arrangement was constant at a wide range of geographical distribution. This is in accordance with various studies that compare two populations and did not find genetic differentiation for a given arrangement (Rozas and Aguadé, 1990; Rozas *et al*., 1995, 1999). Moreover, in the same population we found high genetic differentiation among arrangement, specifically in the *loci* situated in region I of the O chromosome for the microsatellite *loci*, or in the *loci* situated close to the breakpoints in the case of the candidate genes to thermal selection. Furthermore, we also found genetic differentiation in a gene located outside the inversion, but in a region where recombination is reduced by the inversion (Pegueroles *et al.*, 2010b). Nonetheless, given the age of the inversions (Pegueroles, 2010) no genetic differentiation in this gene among arrangements would be expected unless it is strongly maintained by selection. Therefore it seems that each chromosome arrangement has its own genetic identity all along the seven populations studied. However, there is some evidence for gene flux among the arrangements. In the study with the candidate genes we have found 10% of recombinant individuals between arrangements either explained by gene conversion (7,6%) or by double crossovers (2,4%). Using microsatellites we observed that the genetic content of the region II for the arrangements $O_{\underline{3+4}}$, $O_{\underline{3+4+8}}$ and O_{ST} was genetically uniform, suggesting that in this region (free from inversions in these three arrangements) the recombination is free.

The LD patterns were also in accordance with the local adaptation hypothesis, especially for the O_{ST} arrangement, where a high association between the same alleles in *locus* dsub29 and dsub4 were observed in almost all populations. Moreover, although the LD between the genes *Fst* and *Atpα* would indicate a possible epistatic interaction between them, a process required

in the coadaptation hypothesis, the local adaptation, as stated above, does not rule out it. Actually, Kirkpatrick and Barton (2006) state that, although not necessaries, the epistatic interactions would be a good mechanism to maintain the genetic content of inversions. Furthermore, the possible patterns of selection found for these two genes (*Fst* and *Atpα*), altogether with their epistatic interactions could be indication that this inversion is being selected. These selective patterns can also explain the formation and maintenance of a parallel cline for the O_{3+4+7} arrangement in America (whereas the O_{3+4} does not present cline), as well as the seasonal fluctuations that this arrangement shows in El Pedroso (Rodríguez-Trelles *et al.,* 1996).

Finally, in the last part of the work, the thermal adaptation in *D. subobscura* was analyzed. In this chapter, we aimed to analyze if three different arrangements, one with its frequency showing a negative regression with latitude (O_{3+4}) and two showing a positive regression with latitude (O_{3+4+8} and O_{ST}) showed differences in the expression of Hsp70. We used this protein because it is the most important in the heat response (Lindquist and Craig, 1988) and also because it is located in region I, inside the inverted region 3+4 (Moltó *et al.,* 1992), in which we described a high genetic differentiation among the three arrangements. Thermotolerance was also analyzed in order to relate it with the levels of Hsp70 expression and with the objective of determine if the thermal co-adaptation hypothesis (Dolgova *et al*., 2010) is occurring in this species. Behavior (thermalpreference) is has been suggested to direct evolution and accelerate the physiological adaptation (thermotolerance) (Huey and Bennett, 1987; Angilletta, 2009). For this study, we used homokaryotypic outbred individuals derived from the inbred homokaryotypic lines from the Barcelona population. For both experiments, we hardened the flies at 34°C for 1h and then allowed the flies to recover for 2h in the expression experiment and for 6h in the thermotolerance assay. Basal and induced levels of Hsp70 were assessed with an ELISA assay following the protocol of Sørensen *et al*., (1999) and hardened and non-hardened thermotolerance was assayed with a dynamic assay using two different temperature ramping (slow ramping: $\Delta T = 0.1°C\ min^{-1}$; fast ramping: $\Delta T = 0.6°C\ min^{-1}$; Calabria *et al.*, 2012). In all cases the expression of Hsp70 was higher in hardened individuals, as expected, and differences among arrangements were detected in the hardened flies, which can be related with the cost of producing this protein that could mark a maximum of production allowed. However, O_{3+4} outbred individuals presented very high basal values of Hsp70 levels, equivalent to those measured after a heat shock for the rest of homokaryotypes. In the thermotolerance assay, we observed that the different temperature ramping used can affect the results. In the slow ramping assay we obtained significant lower results compared with the fast ramping

assay. One explanation could be that in the slow ramping assays other factors as dehydration can affect the correct estimation of thermotolerance. When comparing the thermotolerance between arrangements, O_{3+4} flies presented higher values than O_{ST} flies. Our results, which show higher expression levels of Hsp70 and higher thermotolerance in the $O_{\underline{3+4}}$ flies, altogether with the results obtained by Dolgova *el al*., (2010) where $O_{\underline{3+4}}$ flies also presented the higher values of thermopreference when comparing them with the O_{ST} individuals, suggest that the thermal co-adaptation hypothesis does find support in *D. subobscura* and can be related to the latitudinal clines that this arrangement shows, with higher frequencies in Southern Europe. However, the causal link between the comparatively high basal levels of Hsp70 heat shock protein and high adult heat tolerance of $O_{\underline{3+4}}$ homokaryotype flies is not yet clear-cut.

Overall, in this study we have found high genetic differentiation between arrangements at the three studied levels: microsatellites, candidate genes and protein expression. Moreover, the genetic differentiation is maintained along the populations, in a way that each arrangement has its own identity. Our results, then, support the hypothesis of Local adaptation in the maintenance of the inversions of the O chromosome of *D. subobscura*. Furthermore, when comparing the Hsp70 expression and thermotolerance between warm and cold-adapted arrangements, our results are in concordance with the clinal distributions of the arrangements, as predicted.

CONCLUSIONS

1. Latitudinal clines were detected for chromosomal arrangements $O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$ and O_{ST}. In $O_{\underline{3+4}}$ and $O_{\underline{3+4+8}}$ arrangements, the sign of the regression coefficients with latitude were the same as previously described despite no significant clines were found.

2. The genetic content for a particular chromosomal arrangement is the same in all populations both using microsatellite loci and candidate genes for thermal adaptation. Therefore, gene flow among populations is high.

3. However, genetic differentiation was found when comparing the different arrangements. For the four analyzed arrangements, the O_{ST} is the most differentiated one, especially when considering region I, where most of the analyzed inversions are located.

4. With the analysis of linkage disequilibrium (LD), we found that all *loci* located in region I presented LD with the O_{ST} inversion and for two *loci* it was caused by the same allele in most populations.

5. Genetic differentiation was found between $O_{\underline{3+4}}$ and $O_{\underline{3+4}+\underline{7}}$ arrangements for genes located inside the O_7 inversion and also for *Atpα* despite its location is outside the inversion. Recombination networks when using the concatenated dataset showed two clades corresponding to the two arrangements.

6. The strong LD found between *Fst* and *Atpα*, located 14Mb apart and inside and outside O_7 inversion, could suggest the existence of epistatic interactions between them.

7. The Local Adaptation hypothesis is the one that fits better our data and would explain the maintenance of the O chromosome arrangements in *D. subobscura*.

8. $O_{\underline{3+4}}$ outbred individuals presented very high basal values of Hsp70 levels, equivalent to those measured in all homokaryotypes after a heat shock.

9. It has been shown that the rate of temperature ramping used in the dynamic assays to calculate the T_{ko} can greatly affect the results.

10. The higher thermotolerance, thermopreference and basal expression levels of *Hsp70*, observed in $O_{\underline{3+4}}$ flies, in comparison to the O_{ST}, could be related to the negative latitudinal cline of this arrangement.

7. BIBLIOGRAFIA

Álvarez, G., Martínez, P., & Zapata, C. 1990. Genetic variation in a modifier system affecting the expression of *Bare* mutant of *Drosophila subobscura*. *Heredity* **64**: 55-66.

Anderson, W.W., Arnold, J., Baldwin, D.G., Beckenbach, A.T., Brown, C.J., Bryant, S.H., Coyne, J.A., Harshman, L.G., Heed, W.B., & Jeffery, D.E. 1991. Four decades of inversion polymorphism in *Drosophila pseudoobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 10367-71.

Andolfatto, P. & Nordborg, M. 1998. Letter to the Editor The Effect of Gene Conversion on Intralocus Associations. *Genetics* **148**: 1397-1399.

Angilletta, M.J. 2009. *Thermal Adaptation. A Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford, U.K.: Oxford University Press.

Araúz, P.A, Mestres, F., Pegueroles, C., Arenas, C., Tzannidakis, G., Krimbas, C.B. & Serra, L. 2009. Tracking the origin of the American colonization by *Drosophila subobscura*: genetic comparison between Eastern and Western Mediterranean populations. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **47**: 25-34.

Araúz, P.A. 2009. Estudio comparativo de poblaciones del Mediterráneo occidental y oriental de *Drosophila subobscura* mediante marcadores genéticos y su relación con la colonización de América. Tesis Doctoral. Departament de Genètica, Universitat de Barcelona.

Arboleda, C.E. 2008. Polimorfismo y divergencia en genes implicados en la resistencia al frío en *Drosophila*. Tesis Doctoral. Departament de Genètica, Universitat de Barcelona.

Ayala, F.J. & Coluzzi, M. 2005. Chromosome speciation: Humans, Drosophila, and mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 6535-6542.

Ayala, F.J., Serra, L. & Prevosti, A. 1989. A grand experiment in evolution: the *Drosophila subobscura* colonization of the Americas. *Genome* **31**: 246-255.

Bächli, G., Vilela, C.R., Escher, S.A. & Saura, A. 2004. *The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark.*

Balanyà, J., Serra, L., Gilchrist, G.W., Huey, R.B., Pascual, M., Mestres, F. & Solé, E. 2003. Evolutionary pace of chromosomal polymorphism in colonizing populations of *Drosophila subobscura*: an evolutionary time series. *Evolution* **57**: 1837-1845.

Balanyà, J., Solé, E., Oller, J.M., Sperlich, D. & Serra, L. 2004. Long-term changes in the chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. II. European populations. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **42**: 191-201.

Balanyà, J., Oller, J.M., Huey, R.B., Gilchrist, G.W., & Serra, L. 2006. Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*. *Science* **313**: 1773-1775.

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.

Balanyà, J., Segarra, C., Prevosti, A. & Serra, L. 1994. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: the founder event and a rapid expansion. *Journal of Heredity* **85**: 427-432.

Barrio, E., Latorre, A. & Moya, A. 1994. Phylogeny of the *Drosophila obscura* species group deduced from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* **39**: 478-488.

Beckenbach, A.T. & Prevosti, A. 1986. Colonization of North America by the European species *Drosophila subobscura* and *D. ambigua. American Midland Naturalist.* **115**: 10-18.

Begon, M. & Shorrocks, B. 1978. The feeding- and breeding-sites of *Drosophila obscura* Fallen and *Drosophila subobscura* Collin. *Journal of Natural History.* **12**: 137-151.

Benjamini, Y. & Hochberg, Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B Methodological* **57**: 289-300.

Bettencourt, B.R. & Feder, M. E. 2001. Hsp70 duplication in the *Drosophila melanogaster* species group: how and when did two become five? *Molecular biology and evolution* **18**: 1272-82.

Bettencourt, B.R., Hogan, C.C., Nimali, M. & Drohan, B.W. 2008. Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of Hsp70 copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in Hsp70 null flies. *BMC biology* **6**: 5.

Bettencourt, B.R., Kim, I., Hoffmann, A.A. & Feder, M.E. 2002. Response to natural and laboratory selection at the Drosophila hsp70 genes. *Evolution; international journal of organic evolution* **56**: 1796-801.

Bing, X., Zhang, J., & Sinclair, B.J. 2012. A comparison of Frost expression among species and life stages of *Drosophila*. *Insect molecular biology* **21**: 31-9.

Bradshaw, W.E. & Holzapfel, C.M. 2008. Genetic response to rapid climate change : it's seasonal timing that matters. *Molecular Ecology*: 157-166.

Brncic, D. 1972. Seasonal fluctuations of inversion polymorphism in *Drosophila flavopilosa* and the relationships with certain ecological factors. *Univ.Texas Publ.* **7213**: 103-116.

Brncic, D., Budnik, M. & Prevosti, A. 1982. Ordenaciones cromosómicas en las poblaciones chilenas de *Drosophila subobscura* . *Medio Ambiente* **6**: 23-32.

Brncic, D., Prevosti, A., Budnik, M., Monclús, M. & Ocaña, J. 1981. Colonization of *Drosophila subobscura* in Chile. I. First population and cytogenetic studies. *Genetica* **56**: 3-9.

Burla, H. 1951. Sysytematik, Verbreitung und Oekologie der Drosophila-Arten der Schweiz. *Rev.Suisse Zool.* **58**: 23-175.

Burla, H., Jungen, H. & Bächli, B. 1986. Population structure of *Drosophila subobscura*: Non-random microdispersion of inversion polymorphism on a mountain slope. *Genetica* **70**: 9-15.

Cáceres, M. 2000. Inversiones Cromosómicas en *Drosophila*: Origen Molecular y Significado Evolutivo de su Tamaño. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Calabria, G., Dolgova, O., Rego, C., Castañeda, L.E., Rezende, E.L., Balanyà, J., Pascual, M., Sørensen, J.G., Loeschcke, V., Santos, M. 2012. Hsp70 protein levels and thermotolerance in *Drosophila subobscura*: a reassessment of the thermal co-adaptation hypothesis. *Journ*al *of Evolutionary Biology* **25** (4): 691–700.

Calabria, G., Máca, J., Bächli, G., Serra, L. & Pascual, M. 2012. First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (*Diptera: Drosophilidae*) in Europe. *Journal of Applied Entomology* **136**: 139-147.

Calabria, G. & Mestres, F. 2009. New wing mutation in *Drosophila subobscura*. *Drosophila Information Service.* **92**: 142-143.

Calabria, G., Vila-farré, M. & Mestres, F. 2009. Wing mutations detected in *Drosophila subobscura*. *Drosophila Information Service.* **92**: 141-142.

Carson, H.L., Lockwood, J.P. & Craddock, E.M. 1990. Extinction and recolonization of local populations on a growing shield volcano. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7055-7.

Casals, F., Cáceres, M. & Ruiz, A. 2003. The foldback-like transposon Galileo is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii*. *Molecular biology and evolution* **20**: 674-85.

Casals, F. & Navarro, A. 2007. Chromosomal evolution: inversions: the chicken or the egg? *Heredity* **99**: 479-480.

Castañeda, L. E., Calabria, G., Betancourt, L. A., Rezende, E. L. & Santos, M. 2012. Measurement error in heat tolerance assays. *Journal of Thermal Biology* **37**: 432-437.

Charlesworth, B., Charlesworth, D., Loukas, M. & Morgan, K. 1979. A study of linkage disequilibrium in British populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **92**: 983-994.

Chovnick, A. 1973. Gene conversion and transfer of genetic information within the inverted region of inversion heterozygotes. **75**: 123-131.

Chown, S.L., Jumbam, K.R., Sørensen, J.G. & Terblanche, J.S. 2009. Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. *Functional Ecology* **23**: 133-140.

Cirera, S., Martin-Campos, J.M., Segarra, C. & Aguadé, M. 1995. Molecular characterization of the breakpoints of an inversion fixed between *Drosophila melanogaster* and *D. subobscura*. *Genetics* **139**: 321-326.

Codina, M. & Pérez, M.M. 1980. Primeros datos sobre la distribución estacional de las especies de *Drosophila* en Cataluña. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Biol.)* **78**: 143-154.

Collin, J.E. 1936. Note. *Drosophila subobscura* sp. n. *Journal of Genetics.* **33**: 60.

Coluzzi, M. 1982. Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in anopheline mosquitoes. In Liss A. (Ed.), *Mechanisms of Speciation*. New York (pp. 143-153).

Cuenca, J.B., Galindo, M.I., Saura, A.O., Sorsa, V. & de Frutos, R. 1998. Ultrastructure of regions containing homologous loci in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila subobscura*. *Chromosoma* **107**: 113-126.

Dahlgaard, J., Loeschcke, V, Michalak, P. & Justesen, J. 1998. Induced thermotolerance and associated expression of the heat-shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology* **12**: 786-793.

de Frutos, R. & Prevosti, A. 1984. Temporal changes of chromosomal polymorphism in natural populations of *Drosophila subobscura*. *Genetica* **63**: 181-187.

Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B, Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C. & Martin, P.R. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude Thermal Safety margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 6668-6672.

Dillon, M.E., Wang, G., Garrity, P.A. & Huey, R.B. 2009. Review: Thermal preference in *Drosophila*. *Journal of thermal biology* **34**: 109-119.

Dobzhansky, T. 1950. Genetics of natural populations XIX. Origin of heterosis throught natural selection in populations of Drosophila peusoobscura. Genetics **35**: 288-302.

Dobzhansky, T. 1962. Rigid vs. flexible chromosomal polymorphism in *Drosophila. The american naturalist* **96:** 321-328.

Dobzhansky, T. 1970. *Genetics of the Evolutionary Process*. New York: Columbia Univ. Press.

Dobzhansky, T. & Ayala, F.J. 1973. Temporal frequency changes of enzyme and chromosomal polymorphisms in natural populations of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 680-3.

Dobzhansky, T. & Epling, C. 1948. The suppression of crossing-over in inversion heterozygotes of *Drosophila pseudoobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **34**: 137-141.

Dolgova, O., Rego, C., Calabria, G., Balanyà, J., Pascual, M., Rezende, E.L., & Santos, M. 2010. Genetic constraints for thermal coadaptation in *Drosophila subobscura*. *BMC evolutionary biology* **10**: 363.

Etges, W.J. 1984. Genetic Structure and Change in Natural Populations of *Drosophila robusta*: Systematic Inversion and Inversion Association Frequency Shifts in the Great Smoky Mountains. *Evolution* **38**: 675-688.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular ecology notes* **7**: 574-578.

Feder, J.H., Rossi, J.M., Solomon, J., Solomon, N. & Lindquist, S. 1992. The consequences of expressing hsp70 in Drosophila cells at normal temperatures. *Genes & Development* **6**: 1402-1413.

Feder, M.E. & Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology* **61**: 243-82.

Feng, Y., Huynh, L., Takeyasu, K. & Fambrough, D. M. 1997 The *Drosophila* Na,K-ATPase - subunit gene: gene structure, promoter function and analysis of a cold-sensitive recessive-lethal mutation. *Genes and Function* **1:** 99-117.

Folk, D.G., Zwollo, P., Rand, D.M. & Gilchrist, G.W. 2006. Selection on knockdown performance in *Drosophila melanogaster* impacts thermotolerance and heat-shock response differently in females and males. *Journal of Experimental Biology* ***209***: 3964-3973.

Fontdevila, A., Zapata, C., Álvarez, G., Sánchez, L., Méndez, J. & Enriquez, I. 1983. Genetic coadaptation in the chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura*. I. Seasonal changes of gametic disequilibrium in a natural population. *Genetics* **105**: 935-955.

García, M.P. & Prevosti, A. 1981. Association between allozyme alleles and chromosomal arrangements of the O chromosome in *Drosophila subobscura*. I. Data of natural populations (1). *Genética Ibérica* **33**: 151-174.

Gaunt, T.R., Rodriguez, S., Zapata, C. & Day, I.N.M. 2006. MIDAS: software for analysis and visualisation of interallelic disequilibrium between multiallelic markers. *BMC bioinformatics* **7**: 227.

Gloor, G.B., Preston, C.R., Nadine, Johnson-schlitz, D.M., Phillis, R.W., Benz, W.K., Robertsons, H.M. & Engelst, W.R. 1993. Type I Repressors of P Element Mobility. Genetics **135**: 81-95.

Goldstein, D.B. & Schlötterer, C. 1999. *Microsatellites: evolution and applications.* (D. B. Goldstein & C Schlötterer, Eds.). Oxford, U.K.: Oxford University Press.

Gong, W.J. & Golic, K.G. 2004. Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster* Hsp70 genes. *Genetics* **168**: 1467-1476.

Gosteli, M. 1990. Chromosomal polymorphism in natural populations of *Drosophila subobscura*. *Ph.D.Thesis, Zurich*.

Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* **86**: 485-48.

Griffiths, J., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. & Gelbart, W.M. 2000. *An introduction to genetic analysis*. San Francisco: Freeman and Company.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.

Hauser, M., Gaimari, S. & Damus, M. 2009. *Drosophila suzukii* new to North America. *FlyTimes* **43**: 12-15.

Hertz, P.E., Huey, R.B. & Stevenson, R.D. 1993. Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question. *American Naturalist* **142**: 796-818.

Hill, W. G. & Robertson, A. 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theorical Applied. Genetics*. **38:** 226-231.

Hoffmann, A.A. & Parsons, P.A. 1991. Evolutionary Genetics and Environmental Stress. Oxford University Press, New York.

Hoffmann, A.A. & Rieseberg, L.H. 2008. Revisiting the Impact of Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**: 21-42.

Hoffmann, A.A., Sørensen, J.G. & Loeschcke, V. 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology* **28**: 175-216.

Hoffmann, A.A. & Willi, Y. 2008. Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Reviews Genetics* **9**: 421-432.

Hudson, R.R. 2000. A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* **155**: 2011-2014.

Hudson, R.R., Slatkin, M. & Maddison, W.P. 1992 Estimation of levels of gene flow from DNA-sequence data. *Genetics* **132:** 583-589.

Huey, R.B, & Bennett, A.F. 1987. Phylogenetic Studies of Coadaptation: Preferred Temperatures Versus Optimal Performance Temperatures of Lizards. *Evolution* **41**: 1098-1115.

Huey, R.B., Hertz, P.E., & Sinervo, B. 2003. Behavioral drive versus Behavioral inertia in evolution: A null model approach. *American Naturalist* **161**: 357-366.

Huey, R.B, & Pascual, M. 2009. Partial thermoregulatory compensation by a rapidly evolving invasive species along a latitudinal cline. *Ecology* **90**: 1715-1720.

Huey, R.B., & Stevenson, R.D. 1979. Integrating Thermal Physiology and Ecology of Ectotherms: A Discussion of Approaches. *American Zoologist* **19** : 357-366.

Huson, D.H., & Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 254-267.

IPCC Working Group I Third Assessment Report, Climate Change 2001: The Scientific Basis. : 1-20.

Jakobsson, M. & Rosenberg, N.A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**: 1801-1806.

Jensen, L.T., Cockerell, F.E., Kristensen, T.N., Rako, L., Loeschcke, V., McKechnie, S.W. & Hoffmann, A.A. 2010. Adult heat tolerance variation in *Drosophila melanogaster* is not related to Hsp70 expression. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology* **313**: 35-44.

Kelly, J.K. 1997. A test of neutrality based on interlocus associations. *Genetics* **146**: 1197-1206.

Kennington, W.J., Partridge, L. & Hoffmann, A.A. 2006. Patterns of diversity and linkage disequilibrium within the cosmopolitan inversion In(3R)Payne in *Drosophila melanogaster* are indicative of coadaptation. *Genetics* **172**: 1655-1663.

Kirkpatrick, M. 2010. How and why chromosome inversions evolve. *PLoS biology* **8** (9): e1000501.

Kirkpatrick, M. & Barton, N. 2006. Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics* **173**: 419-434.

Koske, T. & Maynard Smith, J. 1954. Genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. X. The fifth linkage group. *Jounal of Genetics* **52**: 521-541.

Krebs, R.A. & Feder, M.E. 1997a. Natural variation in the expression of the heat-shock protein HSP70 in a population of *Drosophila melanogaster* and its correlation with tolerance of ecologically relevant thermal stress. *Evolution* **51**: 173-179.

Krebs, R.A. & Feder, M.E. 1997b. Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell stress & chaperones* **2**: 60-71.

Krebs, R.A. & Feder, M.E. 1998. Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much? *Journal of insect physiology* **44**: 1091–1101.

Krebs, R.A. & Loeschcke, V. 1994. Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*: 730-737.

Krebs, R.A. & Loeschcke, V. 1997. Estimating heritability in a threshold trait: heat-shock tolerance in Drosophila buzzatii. *Heredity* **79**: 252-259.

Krebs, R.A., Feder, M.E. & Lee, J. 1998. Heritability of expression of the 70KD heat-shock protein in *Drosophila melanogaster* and its relevance to the evolution of thermotolerance. *Evolution* **52**: 841-847.

Krimbas, C.B. 1993. *Drosophila subobscura: Biology, Genetics and Inversion polymorphism*.

Krimbas, C.B., & Loukas, M. 1980. The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Evolutionary Biology* **12**: 163-234.

Krimbas, C.B. & Powell, J.F. 1992. *Drosophila Inversion Polymorphism*. CRC Press.

Kunze-Mühl, E. & Müller, E. 1958. Weitere Untersuchungen uber die chromosomale Struktur und die naturlichen Strukturtypen von *Drosophila subobscura* Collins. *Chromosoma* **9**: 559-570.

Laayouni, H., García-Franco, F., Chávez-Sandoval, B.E., Trotta, V., Beltran, S., Corominas, M., & Santos, M. 2007. Thermal evolution of gene expression profiles in *Drosophila subobscura*. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 42.

Laayouni, H., Hasson, E., Santos, M., & Fontdevila, A. 2003. The evolutionary history of Drosophila buzzatii. XXXV. Inversion polymorphism and nucleotide variability in different regions of the second chromosome. *Molecular biology and evolution* **20**: 931-44.

Lankinen, P. & Pinsker, W. 1977. Allozyme constitution of two standard strains of *Drosophila subobscura*. *Experientia* **33**: 1301-1302.

Latorre, A., Moya, A. & Ayala, F.J. 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 8649-8653.

Lemeunier, F. & Aulard, S. 1992. Inversion polymorphism in *Drosophila melanogaster*. In C. B. Krimbas & J. R. Powell (Eds.), *Drosophila Inversion Polymorphism*. Boca Raton, Florida: CRC Press (pp. 339-406).

Levitan, M. 1992. Chromosome variation in Drosophila robusta. In C B Krimbas & Jeffrey R Powell (Eds.), *Drosophila Inversion Polymorphism*. Boca Raton, Florida: CRC Press (pp. 221-338).

Levitan, M. 2003. Climatic factors and increased frequencies of southern chromosome forms in natural populations of *Drosophila robusta*. *Evolutionary ecology research* **5**: 597-604.

Lewontin, R.C. 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* **49**: 49-67.

Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.

Lindquist, S. & Craig, A.E. 1988. The heat shock proteins. *Annual Review of Genetics* **22**: 631-677.

Lindsley, D.L. & Grell, E.H. 1968. *Genetic Variations of Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publication No. 627.

Liu, K. & Muse, S.V. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* **21**: 2128-2129.

Loeschcke, V. & Hoffmann, A.A. 2007. Consequences of heat hardening on a field fitness component in *Drosophila* depend on environmental temperature. *American Naturalist* **169**: 175-183.

Loukas, M., Krimbas, C.B., Mavragani-Tsipidou, P. & Kastritsis, C.D. 1979. Genetics of *Drosophila subobscura* populations. VIII. Allozyme loci and their chromosome maps. *Journal of Heredity* **70**: 17-26.

Mainx, F., Koske, T. & Smital, E. 1953. Untersuchungen uber die chromosomale Struktur europische Vertreter der *Drosophila obscura* -Gruppe. *Zeitschr.Indukt.Abstamm.-Vererbungsl.* **85**: 354-372.

Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., & Lefeuvre, P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* **26**: 2462-3.

Martinez-Sebastian, M.J., Latorre, A. & de Frutos, R. 1984. Chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura* populations sampled at different altitudes. *Genética Ibérica* **36**: 1-11.

Matsumura, S. 1931. *6000 illustrated insects of Japan-empire (in Japanese)*. Tokohshoin, Tokyo.

Maynard-Smith, J. 1956. Acclimatization to high temperatures in inbred and outbred *Drosophila subobscura*. *Journal of genetics* **54**: 497-505.

McColl, G., Hoffmann, A.A. & McKechnie, S.W. 1996. Response of two heat shock genes to selection for knockdown heat resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **143**: 1615-27.

McColl, G. & McKechnie, SW. 1999. The *Drosophila* heat shock hsr-omega gene: an allele frequency cline detected by quantitative PCR. *Molecular biology and evolution* **16**: 1568-74.

Mc Donald, J.H. & Kreitman, M. 1991. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature* **351:** 652-654.

McFarquhar, A.M. & Robertson, F.W. 1963. The lack of evidence for co-adaptation in crosses between geographical races of *Drosophila subobscura* Coll. *Genetic Research* **4**: 104-131.

Menozzi, P. & Krimbas, C.B. 1992. The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura* revisited: synthetic maps of gene arrangement frequencies and their interpretation. *Journal of Evolutionary Biology* **5**: 625-641.

Mestres, F., Abad, L., Sabater-Munoz, B., Latorre, A. & Serra, L. 2004. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: association between *Odh* gene haplotypes, lethal genes and chromosomal arrangements. *Genes Genet Syst* **79**: 233-244.

Mestres, F., Balanyà, J., Arenas, C., Solé, E. & Serra, L. 2001. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: heterotic effect of chromosomal arrangements revealed by the persistence of lethal genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 9167-9170.

Mestres, F., Balanyà, J, Segarra, C., Prevosti, A. & Serra, L. 1992. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: Analysis of the O_5 inversions from Europe and America and their implications for the colonizing process. *Evolution* **46**: 1564-1567.

Mestres, F., Pegueroles, G., Prevosti, A., & Serra, L. 1990. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: lethal genes and the problem of the O5 inversion. *Evolution* **44**: 1823-1836.

Mestres, F., Serra, L. & Ayala, F. J. 1995. Colonization of the Americas by *Drosophila subobscura*: lethal-gene allelism and association with chromosomal arrangements. *Genetics* **140**: 1297-1305.

Moltó, M.D., Pascual, L., Martínez-Sebastián, M.J. & de Frutos, R. 1992. Genetic analysis of heat shock response in three Drosophila species of the obscura group. *Genome* **35**: 870-880.

Monclús, M. 1964. Distribución y ecología de Drosofílidos en España. I. Especies de *Drosophila* en la región catalana. *Genética Ibérica* **16**: 143-165.

Munté, A., Rozas, J., Aguadé, M. & Segarra, C. 2005. Chromosomal inversion polymorphism leads to extensive genetic structure: a multilocus survey in *Drosophila subobscura*. *Genetics* **169**: 1573-1581.

Navarro, A., Barbadilla, A. & Ruiz, A. 2000. Effect of inversion polymorphism on the neutral nucleotide variability of linked chromosomal regions in Drosophila. *Genetics* **155**: 685-698.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Nei, M. & Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* **3**: 418-426.

Noor, M.A.F., Grams, K.L., Bertucci, L.A. & Reiland, J. 2001. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12084-12088.

Norris, K. S. 1967. Color adaptation in desert reptiles and its thermal relationships. In: *Lizard ecology. A symposium.* Kansas City, Mo. University of Missouri Press (pp. 162-229).

Orengo, D.J. & Prevosti, A. 1994. Preadult competition between *Drosophila subobscura* and *Drosophila pseudoobscura*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **32**: 44-50.

Orengo, D.J. & Prevosti, A. 1996. Temporal changes in chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura* related to climatic changes. *Evolution* **50**: 1346-1350.

Palter, K.B., Watanabe, M., Stinson, L., Mahowald, A.P. & Craig, E.A. 1986. Expression and Localization of *Drosophila melanogaster* hsp70 Cognate Proteins. *Molecular and cellular biology* **6**: 1187-1203.

Park, S.D.E. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. PhD Thesis. University of Dublin.

Parmesan, C. 2006. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **37**: 637-669.

Parsell, D.A., Taulien, J. & Lindquist, S. 1993. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **339**: 279-285.

Pascual, M., Aquadro, C.F., Soto, V. & Serra, L. 2001. Microsatellite variation in colonizing and paleartic populations of *Drosophila subobscura*. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 731-740.

Pascual, M., Ayala, F.J., Prevosti, A. & Serra, L. 1993. Colonization of North America by *Drosophila subobscura* : Ecological analysis of three communities of drosophilids in California. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **31**: 216-226.

Pascual, M., Balanyà, J., Latorre, A. & Serra, L. 1997. Analysis of the variability of *Drosophila azteca* and *D. athabasca* populations revealed by random amplyfied polymorphic DNA analysis. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **35**: 159-164-

Pascual, M., Chapuis, M.P., Mestres, F., Balanyà, J., Huey, R.B., Gilchrist, G.W., Serra, L. & Estoup, A. 2007. Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology* **16**: 3069-3083.

Pascual, M., Schug, M.D. & Aquadro, C.F. 2000. High density of long dinucleotide microsatellites in *Drosophila subobscura*. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 1259-1267.

Pascual, M., Serra, L. & Ayala, F. J. 1998. Interspecific laboratory competition of the recently sympatric species *Drosophila subobscura* and *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* **52**: 269-274.

Peakall, R. & Smouse, P.E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288-295.

Pegueroles, C. 2010. Estudi de la recombinació en *Drosophila subobscura* a nivell genòmic. Tesi Doctoral. Departament de Genètica, Universitat de Barcelona.

Pegueroles, C., Araúz, P.A., Pascual, M. & Mestres, F. 2010a. A recombination survey using microsatellites: the O chromosome of *Drosophila subobscura*. *Genetica* **138**: 795-804.

Pegueroles, C., Aquadro, C.F, Mestres, F. & Pascual, M. 2012. Gene flow and gene flux shape evolutionary patterns of variation in *D. subobscura. Submitted*.

Pegueroles, C., Ordóñez, V., Mestres, F. & Pascual, M. 2010b. Recombination and selection in the maintenance of the adaptive value of inversions. *Journal of Evolutionary Biology* **23**:2709-2717.

Pentzos-Daponte, A. & Sperlich, D. 1965. Vitalitsprufungen an intra- und interlokalen Heterozygoten von *Drosophila subobscura*. *Z.VererbLehre* **97**: 46-54.

Pina-Martins, F. & Paulo, O.S. 2008. CONCATENATOR: Sequence data matrices handling made easy. *Molecular Ecology Resources* **8**: 1254-1255.

Popadić, A., & Anderson, W. W. 1995. Evidence for gene conversion in the amylase multigene family of Drosophila pseudoobscura. *Molecular Biology and Evolution* **12**: 564-572.

Powell, J.R. 1992. Inversion polymorphisms in *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilirs*. In C B Krimbas & J. F. Powell (Eds.), *Drosophila Inversion Polymorphism*. Boca Raton, Florida: CRC Press (pp. 73-126).

Powell, J.R. 1997. Progress and prospects in evolutionary biology: The *Drosophila* model. *Oxford University Press, New York.*

Prevosti, A. 1967. Inversion heterozygosity and selection for wing length in *Drosophila subobscura*. *Genetic Research* **10**: 81-93.

Prevosti, A., García, M.P., Serra, L., Aguade, M., Ribo, G. & Segarra, 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., Serra, L., Ribó, G., Aguadé, M., Segarra, E., Monclús, M. & Garcia, M.P. 1985. The colonization of *Drosophila subobscura* in Chile. II. Clines in the chromosomal arrangements. *Evolution* **39**: 838-844.

Prevosti, A., Serra, L., Segarra, C., Aguadé, M., Ribó, G. & Monclús, M. 1990. Clines of chromosomal arrangements of *Drosophila subobscura* in South America evolve closer to old world patterns. *Evolution* **44**: 218-221.

Prevosti, A., Ribó, G., Serra, L., Aguadé, M., Balanyà, J., Monclús, M., & Mestres, F. 1988. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: Experiment in natural populations that supports the adaptive role of chromosomal inversion polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**: 5597-5600.

Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.

Ramos-Onsins, S.E. & Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 2092-2100.

Ranganath, H.A. & Krishnamurthy, N.B. 1978. Chromosomal morphism in *Drosophila nasuta* Coexistence of heteroselection and flexibility in the polymorphic system of South Indian populations. *Genetica* **48**: 215-221.

Ranz, J.M., Maurin, D., Chan, Y.S., von Grotthuss, M., Hillier, L.W., Roote, J., Ashburner, M. & Bergman, C.M. 2007. Principles of genome evolution in the *Drosophila melanogaster* species group. *PLoS biology* **5** (6): 1366-1380.

Reddy, G.S. & Krishnamurthy, N.B. 1974. Altitudinal gradients in frequencies of three common inversions in *Drosophila ananasse*. *Drosophila Information Service* **51**: 136-137.

Rego, C., Balanyà, J., Fragata, I., Matos, M., Rezende, E.L. & Santos, M. 2010. Clinal patterns of chromosomal inversion polymorphisms in *Drosophila subobscura* are partly associated with thermal preferences and heat stress resistance. *Evolution* **64**: 385-97.

Reis, M., Vieira, C.P., Morales-Hojas, R., Aguiar, B., Rocha, H., Schlötterer, C. & Vieira, J. 2011. A comparative study of the short term cold resistance response in distantly related Drosophila species: the role of regucalcin and frost. *PloS one* **6**: e25520.

Rezende, E.L., Balanyà, J., Rodríguez-Trelles, F., Rego, C., Fragata, I., Matos, M., Serra, L. & Santos, M. 2010. Climate change and chromosomal inversions in *Drosophila subobscura*. *Climate Research* **43**: 103-114.

Rezende, E.L., Tejedo, M. & Santos, M. 2011. Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: methodological problems and evolutionary implications. *Functional Ecology* **25**: 111-121.

Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences* **18**: 571-573.

Roberts, S.P. & Feder, M.E. 2000. Changing fitness consequences of hsp70 copy number in transgenic *Drosophila* larvae undergoing natural thermal stress. *Functional Ecology* **14**: 353-357.

Rodríguez-Trelles, F., Álvarez, G. & Zapata, C. 1996. Time series analysis of seasonal changes of the O inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **142**: 179-187.

Rodríguez-Trelles, F. & Rodríguez, M.A. 1998. Rapid micro-evolution and loss of chromosomal diversity in *Drosophila* in response to climate warming. *Evolutionary Ecology* **12**: 829-838.

Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R. & Schneider, S.H. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* **421**: 57-60.

Rosenberg, N.A. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**: 137-138.

Rozas, J. & Aguadé, M. 1990. Evidence of extensive genetic exchange in the rp49 region among polymorphic chromosome inversions in *Drosophila subobscura*. *Genetics* **126**: 417-426.

Rozas, J. & Aguadé, M. 1991. Using Restriction-Map Analysis to Characterize the Colonization Process of *Drosophila subobscura* on the American Continent. I. rp49 Region. *Molecular Biology and Evolution* **8**: 447-457.

Rozas, J., & Aguadé, M. 1994. Gene conversion is involved in the transfer of genetic information between naturally occurring inversions of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 11517-11521.

Rozas, J., Hernández, 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., Segarra, C., Ribó, G. & Aguadé, M. 1999. Molecular population genetics of the rp49 gene region in different chromosomal inversions of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **151**: 189-202.

Rozas, J., Segarra, C., Zapata, C, Álvarez, G. & Aguadé, M. 1995. Nucleotide polymorphism at the rp49 region of *Drosophila subobscura*: Lack of geographic subdivision within chromosomal arrangements in Europe. *Journal of Evolutionary Biology* **8**: 355-367.

Sánchez-Gracia, A. & Rozas, J. 2011. Molecular population genetics of the OBP83 genomic region in *Drosophila subobscura* and *D. guanche*: contrasting the effects of natural selection and gene arrangement expansion in the patterns of nucleotide variation. *Heredity* **106**: 191-201.

Santos, J., Serra, L., Solé, E. & Pascual, M. 2010. FISH mapping of microsatellite loci from *Drosophila subobscura* and its comparison to related species . *Chrosomal Research* **18**: 213-216.

Santos, M. 2009. Recombination Load in a chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **181**: 803-809.

Santos, M., Castañeda, L.E. & Rezende, E.L. 2011. Making sense of heat tolerance estimates in ectotherms: lessons from Drosophila. *Functional Ecology* **25**: 1169-1180.

Santos, M., Céspedes, W., Balanyà, J., Trotta, V., Calboli, F.C., Fontdevila, A. & Serra, L. 2005. Temperature-related genetic changes in laboratory populations of *Drosophila subobscura*: evidence against simple climatic-based explanations for latitudinal clines. *Am Nat* **165**: 258-273.

Santos, M., Iriarte, P.F., Céspedes, W., Balanyà, J, Fontdevila, A. & Serra, L. 2004. Swift laboratory thermal evolution of wing shape (but not size) in *Drosophila subobscura* and its relationship with chromosomal inversion polymorphism. *Journal of evolutionary biology* **17**: 841-55.

Savkovic, V., Stamenkovic-Radak, M. & Andjelkovic, M. 2004. Diurnal variability of gene arrangement frequencies in *Drosophila subobscura* populations from two habitats. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **42**: 208-214.

Schaeffer, S. W., & Anderson, W. W. 2005. Mechanisms of genetic exchange within the chromosomal inversions of Drosophila pseudoobscura. *Genetics* **171**: 1729-1739.

Schaeffer, S.W., Goetting-Minesky, M.P., Kovacevic, M., Peoples, J.R., Graybill, J.L., Miller, J.M., Kim, K., Nelson, J.G. & Anderson, W.W. 2003. Evolutionary genomics of inversions in *Drosophila pseudoobscura*: Evidence for epistasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 8319-8324.

Schlötterer, C. 2002. A Microsatellite-Based Multilocus Screen for the Identification of. *Genetics* **160**: 753-763.

Serra, L., Pegueroles, G., & Mestres, F. 1987. Capacity of dispersal of a colonizing species: Drosophila subobscura. *Genetica* **73**: 223-235.

Sgrò, C.M., Overgaard, J., Kristensen, T.N., Mitchell, K.A., Cockerell, F.E. & Hoffmann, A.A. 2010. A comprehensive assessment of geographic variation in heat tolerance and hardening capacity in populations of *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Journal of evolutionary biology* **23**: 2484-2493.

Simões, P., Calabria, G., Picão-Osório, Balanyà, J. & Pascual, M. 2012. Molecular genetic variation associated with Clinal Inversion Polymorphism in *Drosophila subobscura. Submitted.*

Simões, P., Pascual, M., Coelho, M. & Matos, M. 2010. Divergent evolution of molecular markers during laboratory adaptation in *Drosophila subobscura. Genetica* 138: 999-1009.

Simões, P., Pascual, M., Santos, J., Rose, M.R., & Matos, M. 2008. Evolutionary dynamics of molecular markers during local adaptation: a case study in *Drosophila subobscura*. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 66.

Solé, E. 2002. Anàlisi dels canvis cromosòmics a llarg termini en poblacions naturals de *Drosophila subobscura* i la seva relació amb el possible canvi climàtic global. Tesi Doctoral. Departament de Genètica, Universitat de Barcelona.

Solé, E., Balanyà, J., Sperlich, D. & Serra, L. 2002. Long-term changes in the chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. I. Mediterranean populations from southwestern Europe. *Evolution* **56**: 830-835.

Solé, E., Mestres, F., Balanyà, J., Arenas, C. & Serra, L. 2000. Colonization of America by *Drosophila subobscura*: spatial and temporal lethal gene allelism. *Hereditas* **133**: 65-72.

Sørensen, J.G. 2010. Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and exposure to stress in natural populations. **56**: 703-713.

Sørensen, J.G., Kristensen, T.N. & Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6**: 1025-1037.

Sørensen, J.G., Michalak, P., Justesen, J. & Loeschcke, V. 1999. Expression of the heat-shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance. *Hereditas* **131**: 155-164.

Sperlich, D., Feuerbach-Mravlag, H., Lange, P., Michaelidis, A. & Pentzos-Daponte, A. 1977. Genetic load and viability distribution in central and marginal populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **86**: 835-848.

Sperlich, D. & Pfriem, P. 1986. Chromosomal polymorphism in natural and experimental populations. In *The genetics and biology of Drosophila (eds. Ashburner, M., carson, H. L. and Thompson Jr., J.N).* Academic Press, N. Y. (pp. 257-309).

Steck, G., Dixon, W. & Dean, D. 2009. Spotted Wing Drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), a fruit pest new to North America.

Stevison, L.S., Hoehn, K.B., & Noor, M.A.F. 2011. Effects of inversions on within- and between-species recombination and divergence. *Genome biology and evolution* **3**: 830-41.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123:** 585-595.

Terblanche, J.S., Deere, J.A., Clusella-Trullas, S., Janion, C. & Chown, S.L. 2007. Critical thermal limits depend on methodological context. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **274**: 2935-42.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.

Tissières, A., Mitchell, H.K. & Tracy, U.M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of molecular Biology* **84**: 389-398.

Umina, P.A., Weeks, A.R., Kearney, M.R., McKechnie, S.W. & Hoffmann, A.A. 2005. A rapid shift in a classic clinal pattern in Drosophila reflecting climate change. *Science* **308**: 691-693.

Wasserman, M. 1968. Recombination-Induced Chromosomal Heterosis. *Genetics* **58**: 125-139.

Watterson, G.A. 1975. Number of segregating sites in genetic models without recombination. *Theoretical Population Biology* **7**: 256-276.

Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.

White, M.J.D. 1968. Models of Speciation . *Science* **159** : 1065-1070.

Zatsepina, O.G., Velikodvorskaia, V.V., Molodtsov, V.B., Garbuz, D., Lerman, D.N., Bettencourt, B.R., Feder, M.E. & Evgenev, M.B. 2001. A *Drosophila melanogaster* strain from sub-equatorial Africa has exceptional thermotolerance but decreased Hsp70 expression. *The Journal of experimental biology* **204**: 1869-81.

Zivanovic, G. 2007. Seasonal Changes in Chromosomal Inversion Polymorphism in a *Drosophila subobscura* Natural Population from a Southeastern European Continental Refugium of the Last Glaciation Period. *Russian Journal of Genetics* **43**: 1344-1349.

Zivanovic, G. & Mestres, F. 2000. Lethal genes in O_5 chromosomes of *Drosophila subobscura* from Europe and America. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **38**: 123-126.

8. ANNEXOS

8.1. Material suplementari: Haplotips dels gens seqüenciats

Les taules que es presenten a continuació mostren les posicions polimòrfiques dels gens analitzats. Les seqüències es troben agrupades per ordenament i població. A la part superior es troben les línies $O_{\underline{3+4+7}}$ i a sota les $O_{\underline{3+4}}$. Dins de cada ordenament, les primeres seqüències corresponen a la població de Barcelona, seguides de les seqüències de València i, per últim, les provinents de la població de Málaga.

A la part superior de la taula s'indica el nom del gen en cursiva i número de la posició en referència a l'alineament. En aquest, els punts indiquen que el nucleòtid és idèntic al de la seqüència de referència, mentre que els guionets mostren la presència d'un gap. Les àrees ombrejades corresponen a les posicions que es troben dins d'un exó. Finalment, un asterisc a sobre del número de posició indica que el canvi de nucleòtid comporta un canvi d'aminoàcid.

L'ordre de les taules és equivalent a l'ordre dels gens analitzats en un cromosoma O_{ST}: Les 8 primeres taules corresponen al gen *Fst,* les 3 següents al gen *Sqd*, per al gen *Yrt* són les 2 següents i la última taula correspon al gen *Atpα*. Els fragments de recombinació en aquest últim gen s'indiquen amb les caixes negres.

	Fst	9	20	21	27	28	33	36	48	49	53	58	60	61	62	63	68	71	72	84	86	89	101	112	119	120	123	132	149	158	164	166	171	176	183	201	209	210	215	220	227	229	259	265
O_{3+4+Z}	FBC46	A	C	A	A	A	G	G	T	A	T	T	T	A	T	A	A	G	T	T	C	T	T	A	T	A	A	T	T	T	T	T	C	G	T	C	T	A	T	A	G	G	T	T
O_{3+4+Z}	FBC76	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC94	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC96	T	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC101	T	.	.	.	.	.	A	C	.	.	-	.	.	.	.	.	T	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC103	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC106	G	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BC21	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf13	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf134	.	.	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf12	.	.	.	.	.	T	A	.	G	.	.	.	.	.	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf14	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf24	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf26	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf32	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm68	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	T	T	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm73	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	G	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm83	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm84	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf98	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf102	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf106	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf122	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf124	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm5	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm13	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm23	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBF5	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	C	A	A	T	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC15	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC29	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.
O_{3+4}	FBC37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC23	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC31	.	T	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
O_{3+4}	BC33	.	T	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
O_{3+4}	BC34	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC47	.	.	.	.	.	T	A	.	G	.	.	.	.	.	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	C
O_{3+4}	BC56	.	.	.	.	.	.	A	C	.	C	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf4	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C
O_{3+4}	VAf6	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf7	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm10	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm22	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm28	.	.	.	.	.	T	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm47	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C
O_{3+4}	VAm51	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C
O_{3+4}	MAf1	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf11	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	T	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf20	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf55	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAm16	.	.	.	.	.	.	A	C	.	C	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAm27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C
O_{3+4}	MAm37	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.

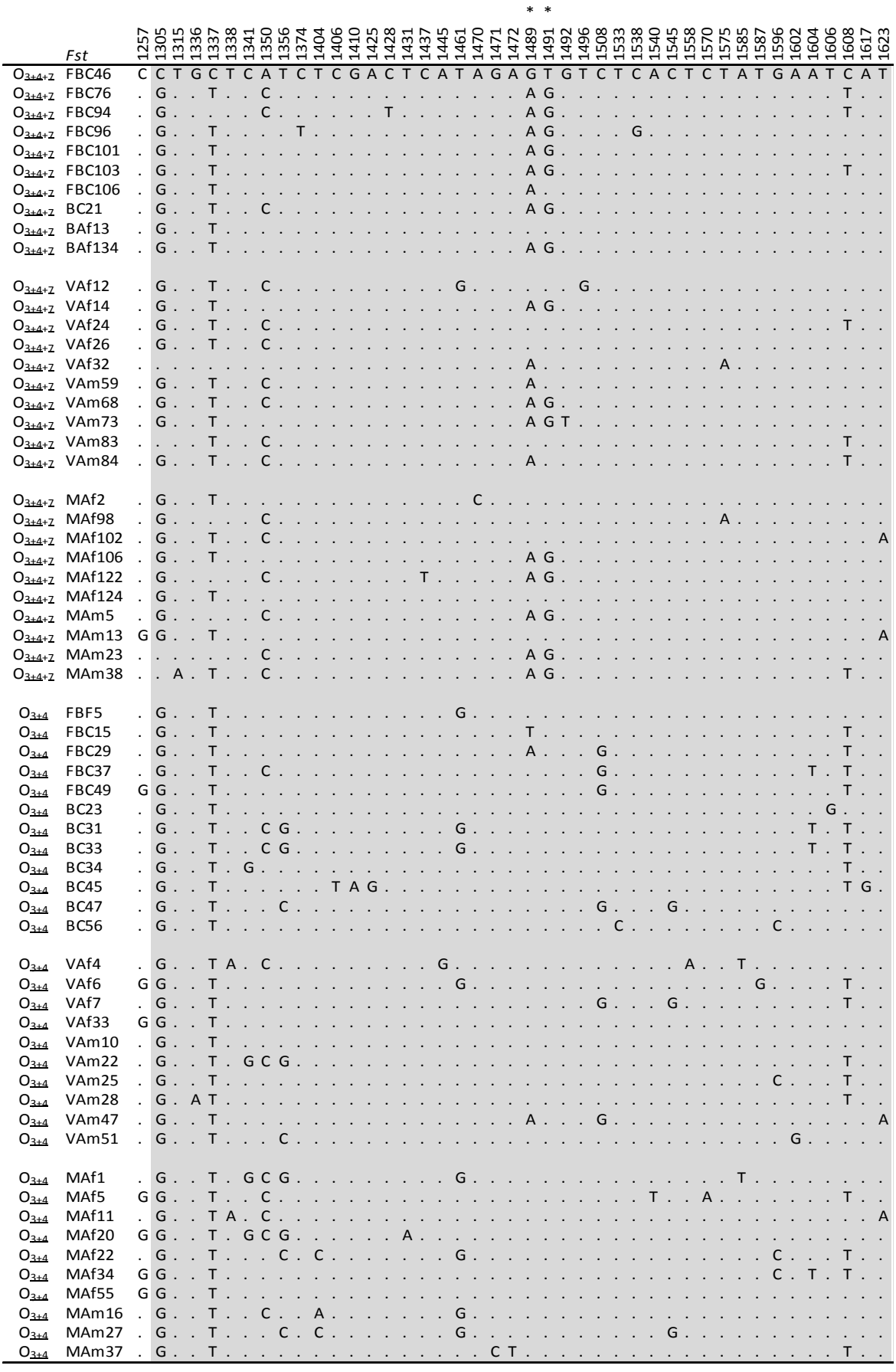
	Fst	292	293	297	327	328	349	353	356	357	366	375	379	391	392	397	401	404	418	466	499	540	542	543	552	554	555	556	557	562	563	564	568	586	588	595	596	599	604	610	612	623	629	635
O_{3+4+Z}	FBC46	T	T	G	T	G	G	T	T	G	C	C	A	A	T	C	C	T	T	A	G	T	A	G	A	-	-	-	-	A	T	A	T	T	A	C	A	T	A	A	A	C	T	A
O_{3+4+Z}	FBC76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC94	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC96	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC101	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC103	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC106	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BC21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf134	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
O_{3+4+Z}	VAf14	C	.	A	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf24	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf26	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf32	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm68	C	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm73	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm83	C	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm84	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf2	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf98	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf102	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf106	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf122	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf124	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
O_{3+4+Z}	MAm23	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBF5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
O_{3+4}	FBC15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	G	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC29	.	.	.	.	A	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	FBC49	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC23	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	T	A	C	A	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	T	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	T	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC56	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	G	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
O_{3+4}	VAf33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	A	C	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
O_{3+4}	MAf1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf5	.	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf20	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf22	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	G	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf55	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAm16	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	MAm27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
O_{3+4}	MAm37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	C	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Fst	292	293	297	327	328	349	353	356	357	366	375	379	391	392	397	401	404	418	466	499	540	542	543	552	554	555	556	557	562	563	564	568	586	588	595	596	599	604	610	612	623	629	635
FBC46	T	T	G	T	G	G	T	T	G	C	C	A	A	T	C	C	T	T	A	G	T	A	G	A	-	-	-	-	A	T	A	T	T	A	C	A	T	A	A	A	C	T	A
FBC76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
FBC94	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
FBC96	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FBC101	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FBC103	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FBC106	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
BAf13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
BAf134	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
VAf12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
VAf14	C	.	A	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAf24	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
VAf26	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
VAf32	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
VAm59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAm68	C	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAm73	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
VAm83	C	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAm84	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
MAf2	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
MAf98	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
MAf102	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAf106	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
MAf122	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAf124	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAm5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAm13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
MAm23	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.
MAm38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
FBF5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
FBC15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	-	-	-	-	C	.	.	.	.	.	G	.	.	G	.	.	.	.	.
FBC29	.	.	.	.	A	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FBC37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
FBC49	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	-	-	-	-	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC23	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	-	-	-	-	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	T	A	C	A	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	T	-	-	-	-	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	T	-	-	-	-	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC56	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAf4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAf6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAf7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	-	-	-	-	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
VAf33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAm10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.
VAm22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAm25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAm28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAm47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VAm51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	A	C	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
MAf1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAf5	.	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAf11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAf20	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAf22	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAf34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	G	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAf55	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MAm16	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
MAm27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
MAm37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	C	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	Fst	292	293	297	327	328	349	353	356	357	366	375	379	391	392	397	401	404	418	466	499	540	542	543	552	554	555	556	557	562	563	564	568	586	588	595	596	599	604	610	612	623	629	635
O_{3+4+Z}	FBC46	T	T	G	T	G	G	T	T	G	C	C	A	A	T	C	C	T	T	A	G	T	A	G	A	-	-	-	-	A	T	A	T	T	A	C	A	T	A	A	A	C	T	A
O_{3+4+Z}	FBC76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC94	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC96	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC101	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC103	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC106	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BC21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf134	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
O_{3+4+Z}	VAf14	C	.	A	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf24	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf26	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf32	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm68	C	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm73	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm83	C	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm84	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf2	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf98	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf102	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf106	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf122	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf124	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
O_{3+4+Z}	MAm23	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBF5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
O_{3+4}	FBC15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	G	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC29	.	.	.	.	A	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	FBC49	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC23	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	T	A	C	A	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	T	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	T	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC56	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	G	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	VAf33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	A	C	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
O_{3+4}	MAf1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf5	.	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf20	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf22	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	G	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf55	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAm16	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	MAm27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
O_{3+4}	MAm37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	C	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

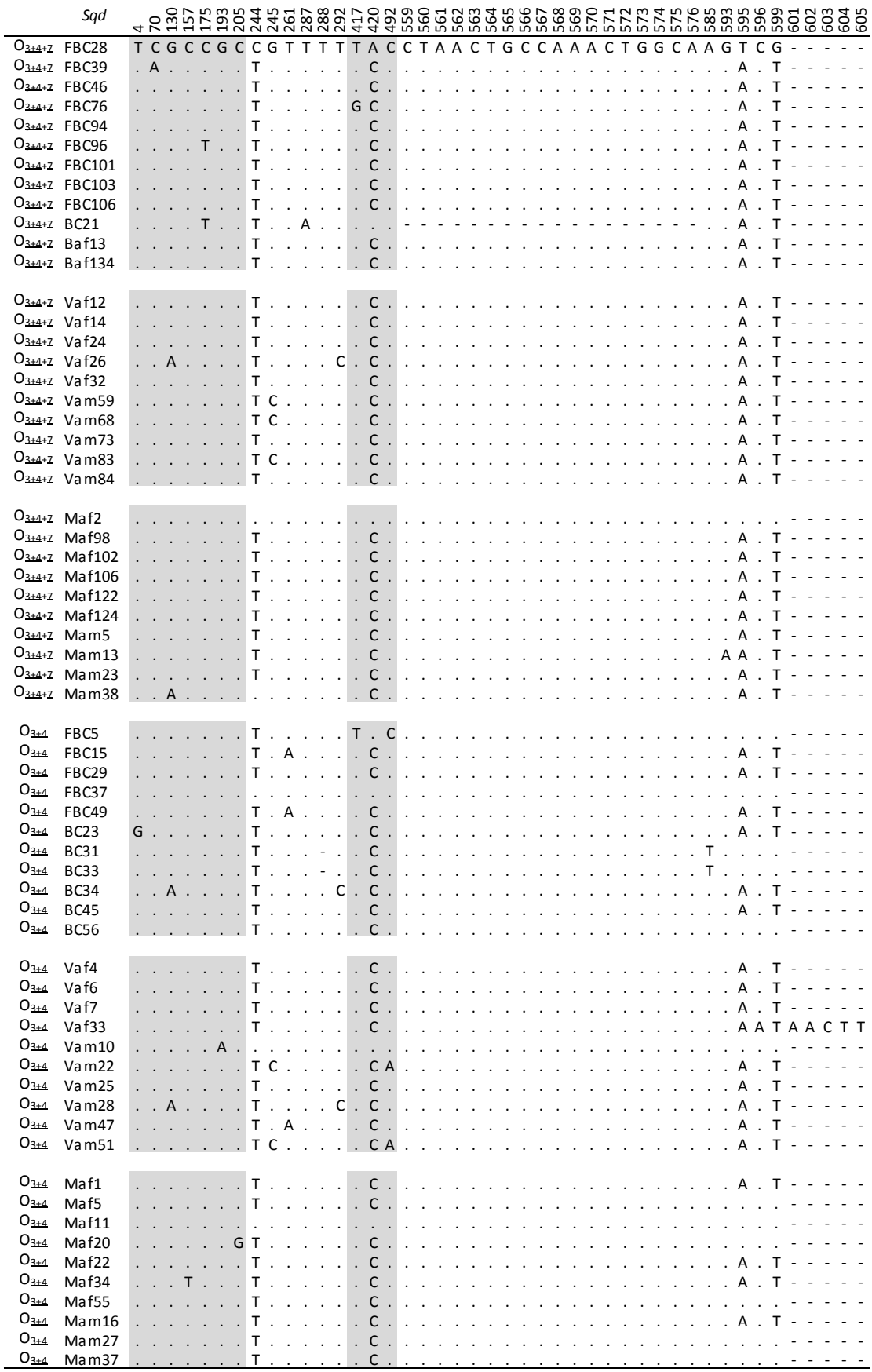
	Fst	637	649	659	677	682	685	686	688	691	694	706	707	720	722	732	735	742	750	755	757	759	760	777	796	805	813	814	844	848	926	930	939	940	944	949	960	963	965	967	968	970	979	981
O_{3+4+Z}	FBC46	A	C	T	A	A	A	T	A	G	T	C	A	A	C	T	T	T	T	A	T	T	G	T	A	T	T	C	C	G	C	T	T	T	G	T	T	A	A	A	G	G	C	G
O_{3+4+Z}	FBC76	T	T	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC94	T	.	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC96	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC101	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC103	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC106	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BC21	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf13	T	.	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf134	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf12	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf14	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf24	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf26	.	T	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf32	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm59	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm68	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4+Z}	VAm73	.	T	C	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
O_{3+4+Z}	VAm83	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm84	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf2	.	.	C	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf98	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf102	T	T	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf106	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf122	T	T	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf124	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
O_{3+4+Z}	MAm5	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm13	.	G	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm23	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm38	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
O_{3+4}	FBF5	.	.	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC15	T	T	C	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC29	T	.	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	T	.	.
O_{3+4}	FBC37	T	T	C	.	G	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC49	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC23	.	G	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	BC31	.	T	C	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC33	.	T	C	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC34	T	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC45	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC47	.	T	C	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC56	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf4	.	T	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf6	.	.	C	.	G	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf7	T	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf33	.	T	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm10	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm22	.	T	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	VAm25	T	.	C	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm28	.	T	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm47	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm51	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf1	.	T	C	.	G	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf5	.	T	C	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf11	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf20	T	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.
O_{3+4}	MAf22	T	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf34	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf55	T	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	MAm16	T	.	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.
O_{3+4}	MAm27	T	T	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAm37	.	T	C	.	.	.	.	G	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	T	.	.

	Fst	987	989	992	996	997	1007	1014	1018	1021	1023	1028	1031	1035	1039	1045	1055	1059	1060	1061	1062	1065	1066	1071	1074	1079	1084	1085	1086	1087	1090	1116	1118	1122	1123	1124	1126	1130	1143	1168	1180	1197	1211	1226
O_{3+4+Z}	FBC46	T	G	T	G	G	C	A	A	C	C	A	G	C	A	C	T	T	A	-	-	G	G	T	A	T	A	C	A	T	A	C	A	T	A	C	G	T	G	T	G	T	A	A
O_{3+4+Z}	FBC76	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	T	A	G	.	A	.	.	G	-	-	T	.	-	-	-	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC94	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC96	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC101	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	T	.	G	.	A	.	.	G	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC103	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC106	.	.	.	.	A	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BC21	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	-	-	T	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf13	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf134	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf12	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	.	.	T	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf14	.	.	.	.	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf26	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf32	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	T	A	G	.	A	.	.	G	-	-	T	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm59	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm68	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm73	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm83	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm84	.	.	.	.	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf2	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf98	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf102	.	.	.	C	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4+Z}	MAf106	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf122	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf124	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	G	T	.	.	-	-	-	.	.	.	A	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm13	.	.	A	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.
O_{3+4+Z}	MAm23	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBF5	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	FBC15	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	FBC29	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	.	A	G	.	A	.	.	G	-	-	T	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC37	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC49	.	.	.	C	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	G	.	.	G	.
O_{3+4}	BC23	.	C	.	.	.	.	.	A	A	.	A	G	.	A	.	.	G	-	-	T	.	-	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC31	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	G	.	A	G	.
O_{3+4}	BC33	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	G	.	A	G	.
O_{3+4}	BC34	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.
O_{3+4}	BC45	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	T	.	.	T	.	.	.	G	-	-	T	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.
O_{3+4}	BC47	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	C	-	-	-	-	-	-	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC56	.	.	.	C	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	G	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf4	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	C	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	G	.	T	A	.	.	.	.	.	.	T
O_{3+4}	VAf6	.	C	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	VAf7	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	VAf33	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	T	A	G	.	A	.	.	.	-	-	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	VAm10	.	.	.	A	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	VAm22	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	T
O_{3+4}	VAm25	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	G	-	G	-	-	T	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	VAm28	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	-	-	.	.	.	-	-	.	.	.	.	T	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm47	-	-	-	-	-	-	.	G	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	-	-	T	A	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	VAm51	C	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	MAf1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	-	-	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf5	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf11	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	T	A	G	.	A	.	.	G	-	-	T	.	-	-	C	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	MAf20	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	A	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	MAf22	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	T	A	G	.	A	.	.	G	-	-	T	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.
O_{3+4}	MAf34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	-	-	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	G	.	T	A	.	.	.	.	.	.	T
O_{3+4}	MAf55	.	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	-	-	-	-	-	.	-	-	T	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	MAm16	C	.	.	.	A	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G	-	-	T	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.
O_{3+4}	MAm27	.	.	.	.	A	G	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G	-	-	T	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAm37	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	.	A	G	.	A	.	.	G	-	-	T	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.


Fst
1257 1305 1315 1336 1337 1338 1341 1350 1356 1374 1404 1406 1410 1425 1428 1431 1437 1445 1461 1470 1471 1472 1489 1491 1492 1496 1508 1533 1538 1540 1545 1558 1570 1575 1585 1587 1596 1602 1604 1606 1608 1617 1623
O3+4+Z FBC46 C C T G C T C A T C T C G A C T C A T A G A G T G T C T C A C T C T A T G A A T C A T
O3+4+Z FBC76 . G . . T . . C . . . . A G . . . . T . .
O3+4+Z FBC94 . G . . . . . C . . . . . T . . . . A G . . . . T . .
O3+4+Z FBC96 . G . . T . . . . T . . . . A G . . . . G . . . .
O3+4+Z FBC101 . G . . T . . . . A G . . . .
O3+4+Z FBC103 . G . . T . . . . A G . . . . T . .
O3+4+Z FBC106 . G . . T . . . . A . . . .
O3+4+Z BC21 . G . . T . . C . . . . A G . . . .
O3+4+Z BAf13 . G . . T . . . .
O3+4+Z BAf134 . G . . T . . . . A G . . . .
O3+4+Z VAf12 . G . . T . . C . . . . G . . . . . G . . . .
O3+4+Z VAf14 . G . . T . . . . A G . . . .
O3+4+Z VAf24 . G . . T . . C . . . . T . .
O3+4+Z VAf26 . G . . T . . C . . . .
O3+4+Z VAf32 . . . . A . . . . A . . . .
O3+4+Z VAm59 . G . . T . . C . . . . A . . . .
O3+4+Z VAm68 . G . . T . . C . . . . A G . . . .
O3+4+Z VAm73 . G . . T . . . . A G T . . . .
O3+4+Z VAm83 . . . . T . . C . . . . T . .
O3+4+Z VAm84 . G . . T . . C . . . . A . . . . T . .
O3+4+Z MAf2 . G . . T . . . . C . . . .
O3+4+Z MAf98 . G . . . . . C . . . . A . . . .
O3+4+Z MAf102 . G . . T . . C . . . . A
O3+4+Z MAf106 . G . . T . . . . A G . . . .
O3+4+Z MAf122 . G . . . . . C . . . . T . . . . A G . . . .
O3+4+Z MAf124 . G . . T . . . .
O3+4+Z MAm5 . G . . . . . C . . . . A G . . . .
O3+4+Z MAm13 G G . . T . . . . A
O3+4+Z MAm23 . . . . . C . . . . A G . . . .
O3+4+Z MAm38 . . A . T . . C . . . . A G . . . . T . .
O3+4 FBF5 . G . . T . . . . G . . . .
O3+4 FBC15 . G . . T . . . . T . . . . T . .
O3+4 FBC29 . G . . T . . . . A . . . G . . . . T . .
O3+4 FBC37 . G . . T . . C . . . . G . . . . T . T . .
O3+4 FBC49 G G . . T . . . . G . . . . T . .
O3+4 BC23 . G . . T . . . . G . . .
O3+4 BC31 . G . . T . . C G . . . . G . . . . T . T . .
O3+4 BC33 . G . . T . . C G . . . . G . . . . T . T . .
O3+4 BC34 . G . . T . G . . . . T . .
O3+4 BC45 . G . . T . . . . . . T A G . . . . T G .
O3+4 BC47 . G . . T . . . C . . . . G . . . G . . . .
O3+4 BC56 . G . . T . . . . C . . . . . . C . . . . . .
O3+4 VAf4 . G . . T A . C . . . . G . . . . A . . T . . . . . .
O3+4 VAf6 G G . . T . . . . G . . . . G . . . . T . .
O3+4 VAf7 . G . . T . . . . G . . . G . . . . T . .
O3+4 VAf33 G G . . T . . . .
O3+4 VAm10 . G . . T . . . .
O3+4 VAm22 . G . . T . G C G . . . . T . .
O3+4 VAm25 . G . . T . . . . C . . . T . .
O3+4 VAm28 . G . A T . . . . T . .
O3+4 VAm47 . G . . T . . . . A . . . G . . . . A
O3+4 VAm51 . G . . T . . . C . . . . G . . . . .
O3+4 MAf1 . G . . T . G C G . . . . G . . . . T . . . .
O3+4 MAf5 G G . . T . . C . . . . T . . A . . . . . . T . .
O3+4 MAf11 . G . . T A . C . . . . A
O3+4 MAf20 G G . . T . G C G . . . . . A . . . .
O3+4 MAf22 . G . . T . . . C . C . . . . . G . . . . C . . . T . .
O3+4 MAf34 G G . . T . . . . C . T . T . .
O3+4 MAf55 G G . . T . . . .
O3+4 MAm16 . G . . T . . C . . A . . . . G . . . .
O3+4 MAm27 . G . . T . . . C . C . . . . . . G . . . . G . . . .
O3+4 MAm37 . G . . T . . . . C T . . . . T . .

	Fst	1644	1650	1660	1662	1664	1671	1679	1698	1703	1725	1730	1737	1751	1756	1772	1773	1794	1796	1800	1812	1813	1818	1823	1827	1829	1834	1837	1844	1850	1862	1863	1869	1892	1893	1894	1896	1897	1898	1899	1906	1908	1914	1917
O_{3+4+Z}	FBC46	A	C	G	T	G	C	A	C	A	T	C	T	G	G	G	C	A	A	C	A	G	C	C	T	C	T	G	G	G	A	A	G	T	C	T	T	C	T	G	T	C	T	C
O_{3+4+Z}	FBC76	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC94	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC96	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC101	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC103	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
O_{3+4+Z}	FBC106	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BC21	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf13	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf134	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf12	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4+Z}	VAf14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf24	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf26	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf32	.	.	.	.	A	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm59	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm68	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm73	T	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm83	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm84	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf2	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf98	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf102	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf106	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf122	.	.	-	-	-	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
O_{3+4+Z}	MAf124	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm5	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm13	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm23	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm38	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBF5	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC15	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	FBC29	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC37	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	FBC49	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	BC23	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	BC31	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	BC33	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	BC34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	BC45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	BC47	.	.	.	.	.	.	C	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC56	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	VAf4	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	VAf6	.	T	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	VAf7	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	T	C	C	T	C	C	C	.	.	.
O_{3+4}	VAm10	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	VAm25	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm28	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	VAm47	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	VAm51	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf1	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf5	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	MAf11	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	MAf20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	G	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf22	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf34	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	MAf55	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
O_{3+4}	MAm16	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
O_{3+4}	MAm27	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	MAm37	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A

	Fst	1919	1923	1934	1937	1938	1952	1956	1965	1969	1982	1984	1985	1986	1988	1996	2015	2022	2024	2025	2027	2036	2037	2039	2040	2041	2050	2062
O_{3+4+Z}	FBC46	A	C	A	C	T	A	T	A	C	A	T	A	C	A	A	C	G	T	T	G	C	C	T	T	T	T	T
O_{3+4+Z}	FBC76	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC94	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC96	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	G	.
O_{3+4+Z}	FBC101	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC103	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC106	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BC21	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf13	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BAf134	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf12	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf14	G	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf24	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf26	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAf32	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm59	.	T	.	.	A	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm68	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm73	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm83	.	T	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	VAm84	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf2	.	T	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf98	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf102	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf106	.	T	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf122	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAf124	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm5	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm13	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm23	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	MAm38	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	FBF5	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A	G	T	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC15	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	C	A	.	G	.	.
O_{3+4}	FBC29	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC37	.	.	.	.	A	.	.	T	.	T	A	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC49	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	BC23	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	BC31	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	BC33	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	BC34	.	T	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	BC45	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	BC47	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	BC56	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	C	A	.	G	.	.
O_{3+4}	VAf4	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf6	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf7	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf33	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.
O_{3+4}	VAm10	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm22	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm25	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm28	.	.	.	.	A	T	.	T	.	.	.	.	.	.	G	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm47	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm51	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf1	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf5	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf11	.	T	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf20	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf22	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf34	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf55	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	MAm16	.	T	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.
O_{3+4}	MAm27	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	-	A	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
O_{3+4}	MAm37	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.

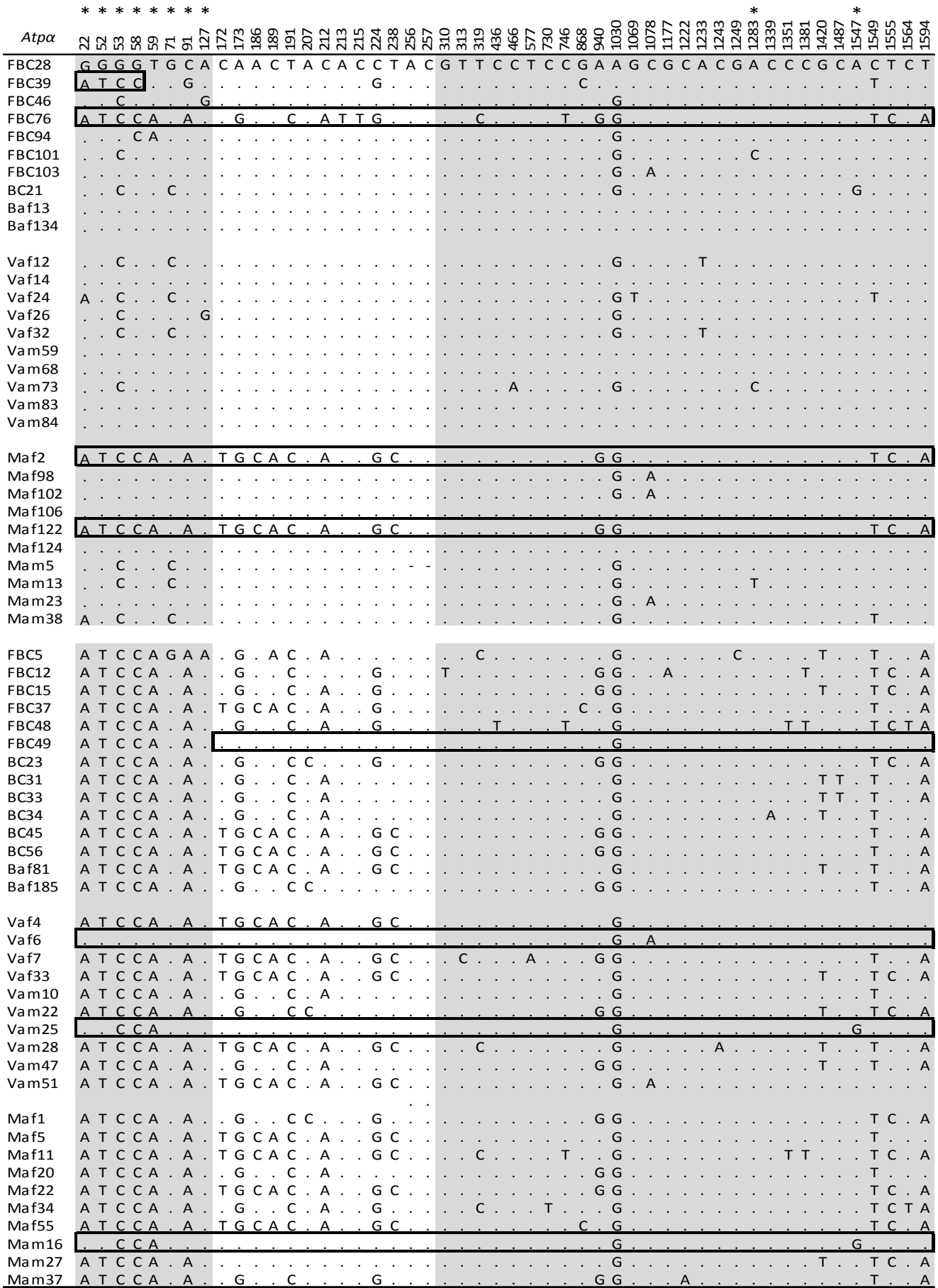

Sqd
4 70 130 157 175 193 205 244 245 261 287 288 292 417 420 492 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 585 593 595 596 599 601 602 603 604 605
O3+4+Z FBC28 T C G C C G C C G T T T T T A C C T A A C T G C C A A A C T G G C A A G T C G - - - - -
O3+4+Z FBC39 . A . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z FBC46 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z FBC76 . . . . . T . . . . G C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z FBC94 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z FBC96 . . . . T . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z FBC101 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z FBC103 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z FBC106 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z BC21 . . . . T . . T . . A . . . . - A . T - - - - -
O3+4+Z Baf13 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Baf134 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vaf12 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vaf14 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vaf24 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vaf26 . . A . . . . T . . . . C . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vaf32 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vam59 . . . . . T C . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vam68 . . . . . T C . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vam73 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vam83 . . . . . T C . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Vam84 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Maf2 . . . . - - - - -
O3+4+Z Maf98 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Maf102 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Maf106 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Maf122 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Maf124 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Mam5 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Mam13 . . . . . T . . . . . C . . . . . A A . T - - - - -
O3+4+Z Mam23 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4+Z Mam38 . . A . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 FBC5 . . . . . T . . . . T . C . . . . . - - - - -
O3+4 FBC15 . . . . . T . A . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 FBC29 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 FBC37 . . . . - - - - -
O3+4 FBC49 . . . . . T . A . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 BC23 G . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 BC31 . . . . . T . . . - . . C . . . . . T . . . . - - - - -
O3+4 BC33 . . . . . T . . . - . . C . . . . . T . . . . - - - - -
O3+4 BC34 . . A . . . . T . . . . C . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 BC45 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 BC56 . . . . . T . . . . . C . . . . . - - - - -
O3+4 Vaf4 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Vaf6 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Vaf7 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Vaf33 . . . . . T . . . . . C . . . . . A A T A A C T T
O3+4 Vam10 . . . . . A . . . . . - - - - -
O3+4 Vam22 . . . . . T C . . . . C A . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Vam25 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Vam28 . . A . . . . T . . . . C . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Vam47 . . . . . T . A . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Vam51 . . . . . T C . . . . C A . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Maf1 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Maf5 . . . . . T . . . . . C . . . . . - - - - -
O3+4 Maf11 . . . . - - - - -
O3+4 Maf20 . . . . . G T . . . . . C . . . . . - - - - -
O3+4 Maf22 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Maf34 . . . T . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Maf55 . . . . . T . . . . . C . . . . . - - - - -
O3+4 Mam16 . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T - - - - -
O3+4 Mam27 . . . . . T . . . . . C . . . . . - - - - -
O3+4 Mam37 . . . . . T . . . . . C . . . . . - - - - -

	Sqd	607	608	610	622	626	631	637	638	646	894	908	926	952	966	1025	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1059	1061	1067	1099	1107	1109	1112	1113	1127	1129	1130	1133	1137	1156	1157	1158
O_{3+4+Z}	FBC28	T	C	T	A	T	C	T	A	C	C	A	A	C	G	A	A	A	A	A	A	G	C	G	C	A	A	A	A	A	A	A	A	T	C	T	A	G	-	C	G	G	G	A	A	C
O_{3+4+Z}	FBC39	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC46	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC76	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC94	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC96	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC101	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC103	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC106	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BC21	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Baf13	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Baf134	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vaf12	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vaf14	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vaf24	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vaf26	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	-	-	-
O_{3+4+Z}	Vaf32	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	-	-	-
O_{3+4+Z}	Vam59	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vam68	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vam73	A	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vam83	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vam84	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf98	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf102	A	.	.	-	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf106	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf122	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf124	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Mam5	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Mam13	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Mam23	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Mam38	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC15	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC29	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC49	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	BC23	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	BC33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	BC34	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	BC45	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	BC56	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Vaf4	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Vaf6	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Vaf7	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Vaf33	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	A	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam22	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam25	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam28	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam47	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam51	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	-	.	.	T	A	.	.	.
O_{3+4}	Maf1	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	G	C	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf22	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf34	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf55	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Mam16	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Mam27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.
O_{3+4}	Mam37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	T	.	.	.	.

	Sqd	1167	1168	1172	1174	1175	1176	1181	1182	1189	1190	1191	1210	1256	1257	1287	1297	1307	1317	1318	1319	1320	1321	1323	1332	1334	1336	1355	1356	1357	1358	1359	1364	1368	1376	1379	1380	1381	1407	1440
O_{3+4+Z}	FBC28	C	A	G	A	A	C	A	-	A	A	C	C	-	A	C	G	A	A	T	T	G	C	A	C	T	C	A	-	-	G	C	-	G	A	C	A	C	C	T
O_{3+4+Z}	FBC39	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC46	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
O_{3+4+Z}	FBC76	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC94	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC96	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC101	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC103	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	A	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	FBC106	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	BC21	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Baf13	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Baf134	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	G	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vaf12	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vaf14	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vaf24	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	.	A	A	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vaf26	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vaf32	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vam59	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vam68	.	.	A	-	-	-	-	-	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vam73	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vam83	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Vam84	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf2	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf98	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	-	A	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf102	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf106	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf122	.	.	A	-	-	-	-	-	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Maf124	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Mam5	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Mam13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	T	.	.	.	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+Z}	Mam23	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	.	.	.	-	-	-	.	A
O_{3+4+Z}	Mam38	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC5	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC15	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC29	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	A
O_{3+4}	FBC37	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	-	.
O_{3+4}	FBC49	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	T	.	-	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC23	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	.	A	A	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC31	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC33	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC34	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC45	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC56	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vaf4	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vaf6	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vaf7	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	-	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	.	A	A	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vaf33	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam10	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam22	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	-	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam25	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam28	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam47	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Vam51	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf1	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf5	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf11	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf20	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf22	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf34	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Maf55	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Mam16	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Mam27	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	Mam37	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.

	Yrt	6	8	19	21	23	28	59	110	119	140	161	168	179	216	149	263	269	284	287	300	305	320	326	335	356	362	368	389	440	452	458	461	488	515	518	524	530	533	536	542	567	605	615
O_{3+4+Z}	FBC28	A	A	A	T	A	T	C	G	G	C	C	C	C	C	C	A	G	C	G	T	C	G	A	C	G	T	A	C	C	C	G	C	G	G	G	G	T	C	G	C	C	G	A
O_{3+4+Z}	FBC46	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	FBC76	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	FBC94	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	FBC96	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	T	.	T	.	T	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	FBC101	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	FBC106	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	A	T	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	FBC103	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	C	.	A	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	BC21	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C
O_{3+4+Z}	BAf13	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	A	C	G	T	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.
O_{3+4+Z}	BAf134	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	.	C	G	.	.	T	.	.	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	VAf12	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	VAf14	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	T	.	T	A	.	.	C	G	.	T	.	C	G	T	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.
O_{3+4+Z}	VAf24	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	VAf26	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	VAf32	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	VAm59	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	A	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	VAm68	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.
O_{3+4+Z}	VAm73	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	A	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	VAm83	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	VAm84	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	A	.	C	.	A	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	MAf2	.	.	.	C	.	C	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	C	G	.	T	.	C	G	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	MAf98	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	MAf106	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	MAf122	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	C	T	T	.	.	A	C
O_{3+4+Z}	MAf124	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	MAm5	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	MAm38	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4+Z}	MAm23	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	T	.	T	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4}	FBC5	.	G	.	.	T	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C
O_{3+4}	FBC15	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	FBC29	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	.	.	T	.	T	.	.	C	C	T	T	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	FBC30	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	FBC37	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	A	C	G	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.
O_{3+4}	FBC48	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.	.	C	G	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	FBC49	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	BC23	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	C	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	BC31	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	BC33	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	BC34	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	BC45	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	BC56	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	A	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	VAf4	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.
O_{3+4}	VAf6	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	VAf7	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	T	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	VAf33	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	VAm10	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	T	.	T	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4}	VAm22	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4}	VAm25	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C
O_{3+4}	VAm47	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	C	C	T	T	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm51	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	MAf1	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.
O_{3+4}	MAf5	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	MAf11	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	MAf20	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	T	T	.	T	.	.	.	C	C	T	T	.	.	A	.
O_{3+4}	MAf22	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	MAf34	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	MAf55	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	MAm27	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C
O_{3+4}	MAm37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	C	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
O_{3+4}	MAm16	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	A	C	G	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.

	Yrt	617	632	638	650	659	665	671	681	683	695	704	731	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	792	796	816	819	839	875	884	905	911	920
O_{3+4+z}	FBC28	G	G	C	T	T	C	A	C	G	T	G	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C	G	C	G	T	G	C	C	G
O_{3+4+z}	FBC46	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	FBC76	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	FBC94	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4+z}	FBC96	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4+z}	FBC101	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	FBC106	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	FBC103	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	BC21	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4+z}	BAf13	.	.	T	G	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4+z}	BAf134	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	VAf12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	C	G	G	C	C	G	C	T	G	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	VAf14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	VAf24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	VAf26	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	VAf32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	VAm59	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	VAm68	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	VAm73	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4+z}	VAm83	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	VAm84	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	MAf2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	MAf98	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	MAf106	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	MAf122	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	MAf124	.	.	T	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
O_{3+4+z}	MAm5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	MAm38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.
O_{3+4+z}	MAm23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC5	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC15	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	FBC29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4}	FBC30	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4}	FBC37	.	.	T	G	.	.	.	.	T	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	FBC48	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.
O_{3+4}	FBC49	.	.	T	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	BC23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.
O_{3+4}	BC31	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
O_{3+4}	BC33	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
O_{3+4}	BC34	.	.	T	G	.	.	.	T	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.
O_{3+4}	BC45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
O_{3+4}	BC56	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf4	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf6	.	.	T	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAf7	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	VAf33	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4}	VAm10	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	VAm22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
O_{3+4}	VAm25	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	VAm47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	VAm51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.
O_{3+4}	MAf1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4}	MAf5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf11	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4}	MAf20	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4}	MAf22	.	.	T	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf34	.	.	T	G	.	.	.	.	.	C	.	.	G	C	G	G	C	C	-	-	-	-	-	-	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
O_{3+4}	MAf55	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4}	MAm27	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
O_{3+4}	MAm37	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
O_{3+4}	MAm16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.


Atpα
22 52 53 58 59 71 91 127 172 173 186 189 191 207 212 213 215 224 238 256 257 310 313 319 436 466 577 730 746 868 940 1030 1069 1078 1177 1222 1233 1243 1249 1283 1339 1351 1381 1420 1487 1547 1549 1555 1564 1594
FBC28 G G G G T G C A C A A C T A C A C C T A C G T T C C T C C G A A G C G C A C G A C C C G C A C T C T
FBC39 A T C C . . G . . . . . G . . . . . C . . . . . T . . .
FBC46 . . C . . . . G . . . . . G . . . . . .
FBC76 A T C C A . A . . G . . C . A T T G . . . . C . . . . T . G G . . . . . T C . A
FBC94 . . . C A . . . . . .
FBC101 . . C . . . . . C . . . . . .
FBC103 . . . . . A . . . . . .
BC21 . . C . . C . . . . . G . . . .
Baf13 . . . . . .
Baf134 . . . . . .
Vaf12 . . C . . C . . . . . T . . . . . .
Vaf14 . . . . . .
Vaf24 A . C . . C . . . . . G T . . . . . T . . .
Vaf26 . . C . . . . G . . . . . G . . . . . .
Vaf32 . . C . . C . . . . . T . . . . . .
Vam59 . . . . . .
Vam68 . . . . . .
Vam73 . . C . . . . . A . . . . . G . . . . . C . . . . . .
Vam83 . . . . . .
Vam84 . . . . . .
Maf2 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G G . . . . . T C . A
Maf98 . . . . . G . A . . . . . .
Maf102 . . . . . G . A . . . . . .
Maf106 . . . . . .
Maf122 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G G . . . . . T C . A
Maf124 . . . . . .
Mam5 . . C . . C . . . . . - - . . . . . G . . . . . .
Mam13 . . C . . C . . . . . G . . . . . T . . . . . .
Mam23 . . . . . G . A . . . . . .
Mam38 A . C . . C . . . . . G . . . . . T . . .
FBC5 A T C C A G A A . G . A C . A . . . . . C . . . . . G . . . . . C . . . . T . . T . . A
FBC12 A T C C A . A . . G . . C . . . . G . . . T . . . . . G G . . A . . . . . T . . . T C . A
FBC15 A T C C A . A . . G . . C . A . . G . . . . . G G . . . . . T . . T C . A
FBC37 A T C C A . A . T G C A C . A . . G . . . . . C . G . . . . . T . . A
FBC48 A T C C A . A . . G . . C . A . . G . . . . . T . . . T . . G . . . . . T T . . . T C T A
FBC49 A T C C A . A . . . . . G . . . . . .
BC23 A T C C A . A . . G . . C C . . . G . . . . . G G . . . . . T C . A
BC31 A T C C A . A . . G . . C . A . . . . . G . . . . . T T . T . . A
BC33 A T C C A . A . . G . . C . A . . . . . G . . . . . T T . T . . A
BC34 A T C C A . A . . G . . C . A . . . . . G . . . . . A . . T . . T . . .
BC45 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G G . . . . . T . . A
BC56 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G G . . . . . T . . A
Baf81 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G . . . . . T . . T . . A
Baf185 A T C C A . A . . G . . C C . . . . . G G . . . . . T . . A
Vaf4 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G . . . . . .
Vaf6 . . . . . G . A . . . . . .
Vaf7 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . C . . . A . . . G G . . . . . T . . A
Vaf33 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G . . . . . T . . T C . A
Vam10 A T C C A . A . . G . . C . A . . . . . G . . . . . T . . .
Vam22 A T C C A . A . . G . . C C . . . . . G G . . . . . T . . T C . A
Vam25 . . C C A . . . . . G . . . . . G . . . .
Vam28 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . C . . . . . G . . . . . A . . . . T . . T . . A
Vam47 A T C C A . A . . G . . C . A . . . . . G G . . . . . T . . T . . A
Vam51 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G . A . . . .
Maf1 A T C C A . A . . G . . C C . . . G . . . . . G G . . . . . T C . A
Maf5 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G . . . . . T . . .
Maf11 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . C . . . . T . . G . . . . . T T . . . T C . A
Maf20 A T C C A . A . . G . . C . A . . . . . G G . . . . . T . . .
Maf22 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . G G . . . . . T C . A
Maf34 A T C C A . A . . G . . C . A . . G . . . . . C . . . T . . . G . . . . . T C T A
Maf55 A T C C A . A . T G C A C . A . . G C . . . . . C . G . . . . . T C . A
Mam16 . . C C A . . . . . G . . . . . G . . . .
Mam27 A T C C A . A . . . . . G . . . . . T . . T C . A
Mam37 A T C C A . A . . G . . C . . . . G . . . . . G G . . . A . . . . . T . . A

8.2. Publicacions

PUBLICACIONS QUE S'ADJUNTEN:

- Calabria, G. & Mestres, F. 2009. New wing mutation in *Drosophila subobscura*. *Drosophila Information Service* **92**: 142-143.

- Calabria, G., Dolgova, O., Rego, C., Castañeda, L.E., Rezende, L.E., Balanyà, J., Pascual, M., Sørensen, J.G., Loeschcke, V., Santos, M. 2012. Hsp70 protein levels and thermotolerance in *Drosophila subobscura*: a reassessment of the thermal co-adaptation hypothesis. *Journ*al *of Evolutionary Biology* **25** (4): 691–700.

- Calabria, G., Máca, J., Bächli, G., Serra, L., & Pascual, M. 2012. First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (*Diptera: Drosophilidae*) in Europe. *Journ*al *of Applied Entomology* **136**: 139-147.

- Calabria, G., Vila-farré, M. & Mestres, F. 2009. Wing mutations detected in *Drosophila subobscura*. *Drosophila Information Service* **92**: 141-142.

- Castañeda, L.E., Calabria, G., Betancourt, L.A., Rezende, L.E., Santos, M. 2012. Measurement error in heat tolerance assays. *Journ*al *of term*al *adaptation* **37**: 432-437.

- Dolgova O., Rego C., Calabria G., Balanyà J., Pascual M., Rezende L.E., Santos M. 2010. Genetic constraints for thermal coadaptation in *Drosophila subobscura*. *BMC Evolutionary Biology,* **10:** 203.

Mutation Notes

Wing mutations detected in *Drosophila subobscura.*

Calabria, G., M. Vila-Farré, and F. Mestres. Dept. de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. E-mails: gemmacalabria@ub.edu; mvilafarre@gmail.com; fmestres@ub.edu.

In the Málaga (Spain) population, crosses using the lethal balanced strain *Va*/*Ba* were carried out to obtain wild O chromosomes of *D. subobscura* in homozygous condition (Sperlich *et al.*, 1977; Mestres *et al.*, 1990). One of the chromosomal lines presented a mutation characterized by the lobulation of the distal area of the wing (Figures 1 and 2). It resembles the *dumpy* (*dp*) mutation of *D. melanogaster* (Lindsley and Zimm, 1992; Ranganath and Tanuja, 1999). This mutation has been previously described in *D. subobscura* (Krimbas, 1993). As in the F_3 we obtained wild, *dumpy*, *Varicose* and *dumpy Varicose* flies, it can be concluded that this mutation is recessive and not located in the O chromosome of the species. Its expressivity is variable. It can be qualified as rank RK1.



Figure 1. Ventral view of a *D. subobscura* female showing *dumpy* and *Varicose* mutations. The lobulation is clearly visible.



Figure 2. Wing detail of *dumpy* mutation.



Figure 3. General view of *D. subobscura* females showing the *ac* mutation. The drooping position of wings is apparent.



Figure 4. Female showing the drooping wing phenotype.

In another chromosomal line, a wing mutation characterized by the abnormal disposition of the wings, presenting them in a drooping position in reference to the body axis was obtained (Figures 3 and 4). This mutation has not been previously described in *D. subobscura* (Krimbas, 1993). We have called this mutation *ac* ("*ales caigudes*"). The mutation is recessive and located in the O chromosome. It can be qualified as rank RK1.

Acknowledgments: This work was supported by grants CGL2006-13423-C02-02 of M.E.C. (Spain), SGR2005 00995 from the Generalitat de Catalunya (Spain).

References: Krimbas, C.B., 1993, D. subobscura. *Biology, Genetics and Inversion Polymorphism*, Verlag Dr. Kovac, Hamburg, Germany; Lindsley, D.L., and G.G. Zimm 1992, *The Genome of* Drosophila melanogaster, Academic Press, San Diego, USA; Mestres, F., G. Pegueroles, A. Prevosti, and L. Serra 1990, Evolution 44: 1823–1836; Sperlich, D., H. Feuerbach-Mravlag, P. Lange, A. Michaelidis, and A. Pentzos-Daponte 1977, Genetics 86: 835–848; Ranganath, H.A., and M.T. Tanuja 1999, Resonance 4: 95–104.



New wing mutation in *Drosophila subobscura.*

Calabria, Gemma, and Francesc Mestres. Dept. de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. E-mails: gemmacalabria@ub.edu; fmestres@ub.edu

To obtain wild chromosomes in homozygous condition for the O chromosomes of *D. subobscura* from Málaga (Spain), appropriate crosses using the lethal balanced strain *Va*/*Ba* were carried out (Sperlich *et al.*, 1977; Mestres *et al.*, 1990). One of the chromosomal lines obtained presented a wing mutation. This was characterized by a reduction in length and changes in the shape (Figure 1). The vein pattern is altered forming new transverse veins (Figure 2a, 2b). This mutation has not previously been described in *D. subobscura* species (Krimbas, 1993). We have called this mutation *aa* (ales alterades). The mutation is recessive and located in the O chromosome. It can be qualified as rank RK1.



Figure 1. General view of a *D. subobscura* male and female with the *aa* mutation. The reduction of wing size is apparent.

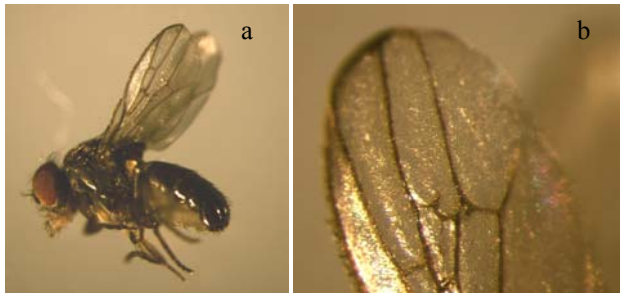


Figure 2. (a, left) Lateral view showing the altered vein pattern. (b, right) Detail of the wing where can be observed additional transverse veins.

Acknowledgments: This work was supported by grants CGL2006-13423-C02-02 of M. E. C. (Spain), SGR2005 00995 from the Generalitat de Catalunya (Spain).

References: Krimbas, C.B., 1993, D. subobscura. *Biology, Genetics and Inversion Polymorphism*, Verlag Dr. Kovac, Hamburg; Mestres, F., G. Pegueroles, A. Prevosti, and L. Serra 1990, Evolution 44: 1823-1836; Sperlich, D., H. Feuerbach-Mravlag, P. Lange, A. Michaelidis, and A. Pentzos-Daponte 1977, Genetics 86: 835-848.



Novel mutants in *D. simulans.*

Sousa-Neves, Rui, Joseph Schinaman, and Joyce Cater. Department of Biology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106.

Here we report five mutations in *Drosophila simulans*. All mutations appeared spontaneously in stocks recently established from natural populations of different localities. Below is a brief description of these mutants.

Results and Discussion

1. *orange glue*[1] (*ogl*[1]).

ORIGIN: Recessive mutation isolated in March 2009 from wild type Cayucos (California, 2008).
PHENOTYPE: The eyes are smaller than the wild type and rough. The orange eye pigmentation is usually unevenly distributed and more concentrated towards the center of the eye (Figure 1). The outer part of the eye varies from completely white to light orange. In males the eye color is usually more even and stronger than in females. The stock has normal fertility, but viability appears to be reduced.
LINKAGE: Chromosome 3. Placed on 3R due to the fact that *ogl* is balanced by In(3R)Ubx (81F1;84B1;84E1;89E1).



Figure 1. *orange glue* female. Note the color and distribution of the eye pigments of *ogl* when compared to the eyes of the females in Figure 2.

JOURNAL OF Evolutionary Biology

doi: 10.1111/j.1420-9101.2012.02463.x

Hsp70 protein levels and thermotolerance in *Drosophila subobscura*: a reassessment of the thermal co-adaptation hypothesis

G. CALABRIA*, O. DOLGOVA†, C. REGO‡, L. E. CASTAÑEDA†§, E. L. REZENDE†, J. BALANYÀ*, M. PASCUAL*, J. G. SØRENSEN¶, V. LOESCHCKE¶ & M. SANTOS†

*Departament de Genètica, Grup de Biologia Evolutiva (GBE)/Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

†Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Biologia Evolutiva (GBE), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain

‡Departamento de Ciências Agrárias, Azorean Biodiversity Group-CITAA, Universidade dos Açores, Terra-Chã, Angra do Heroísmo, Portugal

§Instituto de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

¶Department of Bioscience, Aarhus University, Aarhus, Denmark

Keywords:

Drosophila;
heat tolerance;
Hsp70 expression;
latitudinal clines;
thermal co-adaptation.

Abstract

Theory predicts that geographic variation in traits and genes associated with climatic adaptation may be initially driven by the correlated evolution of thermal preference and thermal sensitivity. This assumes that an organism's preferred body temperature corresponds with the thermal optimum in which performance is maximized; hence, shifts in thermal preferences affect the subsequent evolution of thermal-related traits. *Drosophila subobscura* evolved worldwide latitudinal clines in several traits including chromosome inversion frequencies, with some polymorphic inversions being apparently associated with thermal preference and thermal tolerance. Here we show that flies carrying the warm-climate chromosome arrangement O_{3+4} have higher basal protein levels of Hsp70 than their cold-climate O_{st} counterparts, but this difference disappears after heat hardening. O_{3+4} carriers are also more heat tolerant, although it is difficult to conclude from our results that this is causally linked to their higher basal levels of Hsp70. The observed patterns are consistent with the thermal co-adaptation hypothesis and suggest that the interplay between behaviour and physiology underlies latitudinal and seasonal shifts in inversion frequencies.

Introduction

Thermal acclimation is a plastic response that occurs within the lifetime of individuals and triggers a variety of physiological adjustments. This includes the alteration in gene expression and increased heat-shock resistance by prior short-term exposition to sublethal high temperatures ('hardening'; Hoffmann *et al.*, 2003). The heat-induced heat-shock proteins Hsp70s have for a long time being considered essential for heat stress survival (e.g. Parsell *et al.*, 1993; Sørensen *et al.*, 2003). Hsp70s are a highly conserved chaperone family that assist in protein folding and mitigate cellular damage during thermal stress, although apparently with a fitness cost to the organism (Krebs & Loeschcke, 1994; Krebs & Feder, 1997a, 1998; Feder *et al.*, 2002). This cost may impose a trade-off to the maximum attained levels of Hsp70, which in *Drosophila* might extend throughout the life cycle because Hsp70 expression seems to be genetically coupled at larval and adult stages (Krebs *et al.*, 1998; but see Sarup *et al.*, 2006).

However, the actual role played by Hsp70 in the heat tolerance of *Drosophila* is proving to be a controversial issue. Some studies where manipulation of Hsp70 levels was achieved by using transgenic *Drosophila melanogaster* larvae have shown that individuals producing more protein improved thermotolerance under laboratory

Correspondence: Gemma Calabria, Departament de Genètica, Grup de Biologia Evolutiva (GBE), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 93 493 5801; fax: +34 93 403 4420;
e-mail: gemmacalabria@ub.edu

© 2012 THE AUTHORS. *J. EVOL. BIOL.*
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2012 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

(Krebs & Feder, 1998; Bettencourt *et al.*, 2008) and field-like conditions (Roberts & Feder, 2000); furthermore, standing natural variation of Hsp70 expression also correlates positively with larval thermotolerance (Krebs & Feder, 1997b). On the other hand, weak or no associations between Hsp70 levels and adult thermotolerance have been detected (Dahlgaard *et al.*, 1998; Krebs *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 2010). These contrasting outcomes are somewhat odd in view of the correlated response for increased Hsp70 levels in *Drosophila* lines selected for adult heat tolerance (Sørensen *et al.*, 1999; Folk *et al.*, 2006), which suggests that these traits are pleiotropically linked.

We have recently uncovered that segregating chromosome arrangements in *Drosophila subobscura* are associated with differential adult thermal preferences and heat tolerances (Rego *et al.*, 2010). *Drosophila subobscura* is one of the species with the richest inversion polymorphism in the genus. Compelling evidence that inversions' latitudinal clines are adaptive in this species is that within a decade after its invasion of South and North America from native European populations, flies evolved latitudinal clines that were generally parallel with clines in the Old World (Prevosti *et al.*, 1985, 1988; Balanyà *et al.*, 2003). Further evidence comes from the long-term shifts in inversion frequencies indicating that the genetic constitution of *D. subobscura* populations worldwide is responding to climate change (Balanyà *et al.*, 2006). These results suggest that directional selection must be strong, and temperature is a likely selective agent. Consistent with this assumption, we found that flies carrying 'cold-climate' chromosome arrangements (i.e. those chromosome arrangements that show a negative correlation coefficient with maximum temperatures along the cline, or a positive correlation coefficient with latitude; Balanyà *et al.*, 2003) prefer lower temperatures and have lower heat tolerances than their 'warm-climate' counterparts (Rego *et al.*, 2010). These findings stimulated our assessment of the thermal co-adaptation hypothesis (Dolgova *et al.*, 2010); that is, the idea that behaviour (thermal preference) 'drives' evolution in new directions and can speed up physiological (thermotolerance) adaptation (Huey & Bennett, 1987; Angilletta, 2009).

To test the thermal co-adaptation hypothesis, we focused on the largest and inversion richest chromosome O of *D. subobscura* (Dolgova *et al.*, 2010) because (i) its complex gene arrangements from more equatorial populations – with overlapping inversions in the distal (segment I) and nonoverlapping inversions in the proximal (segment II) segment to the centromere (Krimbas & Loukas, 1980) – are gradually replaced by the standard gene arrangement (O_{st}) as populations approach high latitudes, (ii) this chromosome is associated with thermal preferences (Rego *et al.*, 2010) and harbours several genes involved in the heat-shock response, including the gene *Hsp70* located inside the region covered by the overlapping inversions 3+4 (Moltó *et al.*, 1992) (Fig. 1), and (iii) warm- (O_{3+4}) and cold-climate (O_{st}) chromosome arrangements are highly differentiated for their genetic content in the 3+4 region (Munté *et al.*, 2005). Therefore, we tested whether these gene arrangements could host a set of allelic combinations for thermal preference and thermotolerance that would generate a positive genetic correlation between these two traits in line with the predictions from the thermal co-adaptation hypothesis. Our expectation was that flies' preferred body temperatures and heat tolerances according to their genetic constitution for chromosome O should agree with the clinal patterns. Although we were able to replicate Rego *et al.*'s (2010) results showing that O_{3+4} carriers display a preference for higher temperatures than their O_{st} counterparts, no difference between these arrangements was detected for heat tolerance (Dolgova *et al.*, 2010). Consequently, we concluded that any correlation between these traits across latitudinal gradients would presumably reflect a pattern of correlated selection rather than genetic correlation (Dolgova *et al.*, 2010).

Considering that inversion polymorphisms in other chromosomes associated with thermotolerance exhibit latitudinal variation in the expected direction (Rego *et al.*, 2010), it is unclear why different arrangements in chromosome O seem to have negligible effects on this trait in our flies. There are at least three possible explanations. First, it might be the case that there is not enough genetic differentiation for *Hsp*70 between O_{3+4} and O_{st} chromosome arrangements. Second, assuming that there is indeed genetic differentiation it might happen that there is no association between Hsp70 protein levels and adult thermotolerance in *D. subobscura*, in accordance with what has been recently suggested to occur in *D. melanogaster* (Jensen *et al.*, 2010). Third, flies carrying different arrangements may differ in their plasticity to heat shock, resulting in contrasting patterns

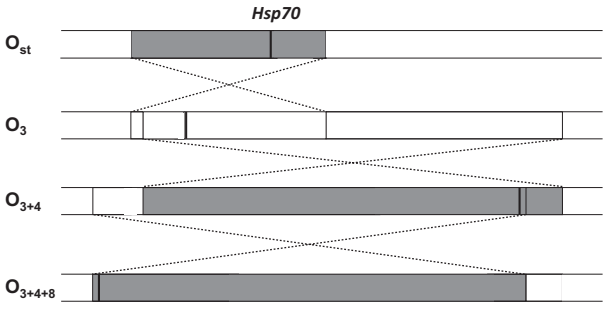


Fig. 1 Schematic representation of segment I of chromosome O in *Drosophila subobscura* showing the relative position of the gene *Hsp70* (thick black line) in the three chromosome arrangements used in this study (O_{st}, O_{3+4} and O_{3+4+8}). O_3 is the now extinct original chromosome arrangement from which O_{st} and O_{3+4} derived. Shaded bars indicate the inverted regions.

of basal and induced heat tolerance (see Rezende *et al.*, 2011). Consequently, the initial assessment of the thermal co-adaptation hypothesis could be somewhat flawed if the potential fitness benefits of heat-induced thermotolerance under extreme field conditions (Loeschcke & Hoffmann, 2007) were not appropriately assessed in the experiments performed by Dolgova *et al.* (2010).

In this study, we focus on the latter two alternatives. We first show that warm- and cold-climate O chromosome arrangements in *D. subobscura* are indeed differentiated for basal Hsp70 protein expression levels. We then estimate basal and induced thermotolerance using two different dynamic assays, because measured heat tolerance is known to be affected by variable heating rates (Terblanche *et al.*, 2007; Chown *et al.*, 2009; for a mechanistic explanation of why this may happen, see Rezende *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011). We show that thermal preference and thermotolerance are indeed coupled as predicted from the thermal co-adaptation hypothesis and discuss the confounding factors that have influenced the outcome of the heat tolerance assays in our previous experiments (Dolgova *et al.*, 2010). Finally, we discuss our results in connection with the latitudinal clines and seasonal variation in the frequencies of chromosome O gene arrangements.

Materials and methods

Base stocks and fly handling

The origin and establishment of the 18 isochromosomal lines for the O chromosome in an otherwise highly homogeneous genetic background used in this study have been described elsewhere (Dolgova *et al.*, 2010). Briefly, more than 200 isofemale lines were established from wild flies collected near Barcelona (41°43′N, 2°13′E) in October 2007. From each isofemale line, we isolated a single O chromosome by repeatedly backcrossing (for at least five generations) a wild-type male with females from the *ch-cu* strain, which carries the recessive markers on the O chromosome *cherry* eyes (*ch*) and *curled* wings (*cu*) and has a highly homogeneous genetic background. The isochromosomal lines were then obtained using the *Va/Ba* (*Varicose/Bare*) balancer stock, which has the same genetic background than the *ch-cu* strain. The final isochromosomal lines used in the experiments were the same than the ones used by Dolgova *et al.* (2010) and included six independent lines for each of the three chromosome arrangements O_{st}, O_{3+4}, and O_{3+4+8}.

Most frequent chromosome arrangements in Southern Europe carry the inversions O_{3+4} in segment I and are gradually replaced by arrangement O_{st} as we move towards the north: the combined frequency of O_{st} and arrangements carrying 3+4 is generally higher than 70% (Solé *et al.*, 2002; Balanyà *et al.*, 2004). Our main concern here is therefore to test for putative differences in Hsp70 protein expression levels, as well as in basal and inducible heat tolerances between chromosome arrangements O_{3+4} and O_{st}. Arrangement O_{3+4+8} was also included in the study because (i) the gene *Hsp70* changed its chromosome position relative to the centromere when inversion O_8 arose on a O_{3+4} chromosome arrangement (Fig. 1), and (ii) it allows us to asses the extent of among-arrangement genetic differentiation for Hsp70 protein expression levels given the reduced recombination rate in the region covered by these arrangements (Pegueroles *et al.*, 2010).

Because outbred individuals are obviously more representative of field conditions than isochromosomal lines, the homokaryotypic O_{3+4}/O_{3+4}, O_{3+4+8}/O_{3+4+8} and O_{st}/O_{st} experimental flies were derived from six cyclically permuted reciprocal crosses among the six isochromosomal lines per chromosomal type (i.e. 1×2, 2×3, , 6×1). It is however important to notice that the outbred progeny within each cross is genetically identical, and therefore, the within-cross variation only reflects environmental variance. Flies were always reared at 18 °C, and all fly handling was carried out at room temperature using CO_2 anaesthesia only to sort virgin flies.

Thermal exposure conditions

Preliminary experiments using two randomly selected outbred crosses were performed to pinpoint the stressful high temperature most appropriate for the heat hardening treatment to induce the heat-shock response. Heat knockdown times were measured in 30 one-week-old nonvirgin females from each cross. The flies were placed individually in 5-mL glass vials and exposed acutely to 38 or 36 °C by immersion in preheated water baths with capacity for 60 vials each. Water temperature was controlled by a programmable heating unit (JULABO ED; JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Germany) that also ensured proper water circulation. To minimize measurement error, the flies were video-recorded during the assays with a digital HD video camera (SONY HDR-CX110E, Tokyo, Japan), and knockdown times were estimated from the videos. The results (Fig. 2) clearly suggest that 38 °C is close to the critical thermal maximum (CT_{max}) because all flies were knocked down after 4.8 min (the time required for 50% of the flies to succumb to heat stress was LT_{50} = 2 min). Flies were able to withstand 36 °C for up to 16 min (LT_{50} = 9.7 min).

To induce thermotolerance, the experimental flies from each cross were transferred in groups of ten flies (1-week-old nonvirgin females or males) to empty vials (2×8 cm) with moistened stoppers to avoid desiccation. Because pre-exposure at 5–6 °C lower than CT_{max} is usually enough to elicit heat hardening in *Drosophila* (see Hoffmann *et al.*, 2003), the vials were allocated and evenly spaced in a rack and immersed in a water bath at 32 °C for 1 h (no fly died after this exposure). The flies

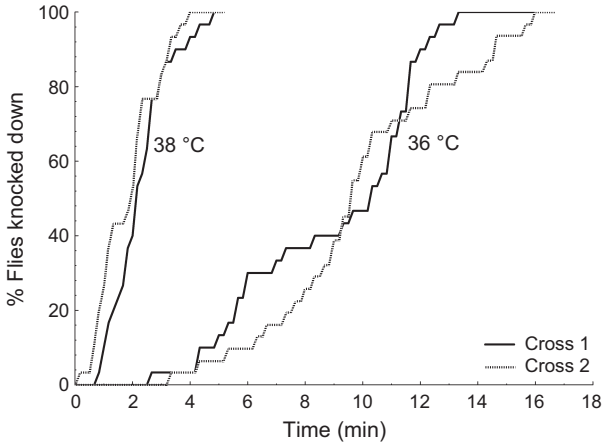


Fig. 2 Knockdown times of genetically homogeneous *Drosophila subobscura* females acutely placed at 36 or 38 °C and derived from two crosses using different isochromosomal lines. Each sigmoid-like line was obtained from 30 one-week-old females and also illustrates the stochastic effect associated with the cumulative probability of dying after a finite exposure to a stressful high temperature.

were then allowed to recover normal mobility at 18 °C for 2 h to measure Hsp70 protein induction, or for 6 h prior to the heat knockdown assays performed (see below). The heat-shock response requires *de novo* synthesis of proteins, and a recovery period following high-temperature treatment is often necessary to induce rapid heat hardening (Hoffmann *et al.*, 2003; Chown & Nicolson, 2004).

Hsp70 protein expression

Following the heat-shock treatment and the 2-h recovery time, flies were placed in Eppendorf tubes, frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until the level of Hsp70 protein expression was assayed. Control flies from both sexes for each cross kept at 18 °C were also frozen to quantify the basal level of Hsp70.

Flies from each replicated group were homogenized in 1.0 mL of homogenizing mix (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO). Lysates were centrifuged for 30 min at 13 226 *g* at 4 °C, and the supernatant was transferred to two 0.5-mL microtubes and stored on ice. The total protein concentration in the supernatant was determined from quadruplicate 10-μL samples in a 96-well microplate with a BCA assay (Sigma-Aldrich Co.) according to the manufacturer's instructions and standardized against bovine serum albumin diluted in sterile distilled water.

Hsp70 concentrations from whole animal lysates were quantified with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with an Hsp70-specific monoclonal primary antibody (clone 5A5, dilution 1:1000 PBS; Thermo Scientific Inc., Bremen, Germany) and a HRP-conjugated secondary antibody (anti-mouse IgG; ThermoScientific) following the ELISA protocol described in Sørensen *et al.* (1999). Colour reaction was measured with a spectophotometric microplate reader (PowerWave XS2 Biotek, Bad Friedrichshall, Germany) at 490 nm. Each plate contained 23 samples (heat-induced or control, randomly distributed) and a standard (see below) in four replicates. A blank (without primary antibody) of each sample and standard was included to allow corrections for a nonspecific signal.

The Hsp70 standard was derived from all different crosses after mixing flies to set up a mass population from which two groups of 45 individuals each were hardened as previously described. Data were standardized before statistical analysis. One randomly selected ELISA plate was used as the reference plate, and the standard value of this plate was used to obtain a correction factor for the rest.

Adult heat tolerance assays

Basal and hardened heat tolerances were measured on six females and six males from each of the performed homokaryotype crosses involving the O_{3+4} and O_{st} isochromosomal lines. Because the water baths have capacity for sixty 5-mL glass vials, only five cyclically permuted reciprocal crosses within each chromosomal type were assayed. Three females and three males from each cross were individually placed in sealed empty vials and immersed in two water baths for each treatment.

Heat knockdown temperature was scored as the temperature for individual flies to be knocked down and immobilized in a dynamic assay, where temperature is increased at a constant rate until the end point is observed. Estimates of heat knockdown temperature can however vary dramatically depending on the methodology employed (Terblanche *et al.*, 2007; Chown *et al.*, 2009), which may be partially explained as a result of the varying levels of physiological stress, dehydration and so on experienced by the flies when enclosed in sealed empty vials immersed in a water bath for different periods of time (Rezende *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011). We therefore used two different experimental protocols to measure basal and hardened heat tolerance: a slow ramping protocol with initial temperature T_0 = 24 °C and heating rate ΔT = 0.1 °C min^{-1} as in Dolgova *et al.* (2010), and a fast ramping assay with T_0 = 24 °C and ΔT = 0.6 °C min^{-1}. In both cases, an equilibration time of 10 min was allowed before increasing temperature.

Measurement error was of some concern in the fast ramping assays because the water baths would reach the estimated acute CT_{max} of 38 °C (see above) in approximately 23 min. We therefore placed a thermocouple in the water baths, video-recorded the flies and the temperature displayed by the thermocouple (nearest 0.1 °C), and estimated the heat knockdown temperature of each fly from the time point at which it collapsed

using the linear interpolation $T_k = T_i + \Delta T \times t_k$. In this expression, T_k is the estimated knockdown temperature, T_i is the temperature of the thermocouple at time t_i just before the fly was knocked down, and t_k is the recorded time when the fly was knocked down. The videos were analysed twice (each time by a different observer), and measurement error was estimated as one minus the intraclass correlation coefficient obtained from the one-way ANOVA (Sokal & Rohlf, 1995, p. 213).

Statistical analyses

Levene's test was used to test for homogeneity of variances. Levels of Hsp70 protein were analysed using the linear model.

$$y_{ijklm} = \mu + K_i + c_{j(i)} + S_k + T_l + KS_{ik} + KT_{il} + ST_{kl} + KST_{ikl} + \varepsilon_{ijklm},$$

Where μ is the overall grand mean, K_i is the fixed effect of the ith karyotype (O_{3+4}/O_{3+4}, O_{3+4+8}/O_{3+4+8} and O_{st}/O_{st}), $c_{j(i)}$ is the random effect of the jth cross (j = 1,2,...,6) within karyotype i, S_k is the fixed effect of sex, T_l is the fixed effect of treatment (basal and heat-induced) and ϵ_{ijklm} is the residual error. Hsp70 levels between the warm- (O_{3+4}/O_{3+4}) and cold-climate (O_{st}/O_{st}) homokaryotypes for those gene arrangements that show more significant opposite latitudinal clines (Balanyà *et al.*, 2003) were compared by means of linear contrasts (each comparison or contrast between two means has one degree of freedom).

A similar linear model was used to analyse heat tolerance. Because the variance in knockdown temperature was significantly higher under slow ramping (Levene's $F_{1,472} = 23.40$, $P < 0.001$), the data from the different dynamic assays were analysed separately. An additional reason to perform separate analyses is that the confounding sources of error to reliably estimate heat tolerance are more important in longer assays (i.e. under slow ramping; Rezende *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011). Analyses were performed using the statistical packages STATISTICA 9.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) and SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Induction of Hsp70 protein levels after the heat shock

Global protein levels of Hsp70 increased after the heat-shock treatment as expected, with no significant sex or sex × treatment interaction effects (Table 1). Overall differences among the three homokaryotypes were also detected, and it was clear from the linear contrast that the warm-climate homokaryotype O_{3+4}/O_{3+4} had higher Hsp70 protein levels on average (around 5% higher) than its cold-climate O_{st}/O_{st} counterpart. However, an interesting and somewhat unexpected karyotype × treatment interaction effect was also observed (Table 1, Fig. 3). Thus, the comparatively high basal protein level of Hsp70 in O_{3+4}/O_{3+4} homokaryotypes did not increase after the heat shock, whereas it boosted by around 30% in both O_{3+4+8}/O_{3+4+8} and O_{st}/O_{st} flies. Following heat induction, the three homokaryotypes reached similar Hsp70 protein levels (Fig. 3). The linear contrast comparing O_{3+4}/O_{3+4} vs. O_{st}/O_{st} for the karyotype × treatment interaction effect clearly indicates that these warm- and cold-climate homokaryotypes behave quite differently for Hsp70 protein levels according to basal or heat-induced conditions, whereas O_{3+4+8}/O_{3+4+8} has similar behaviour than O_{st}/O_{st}.

Table 1 ANOVA for the effects of karyotype (O_{3+4}/O_{3+4}, O_{3+4+8}/O_{3+4+8} and O_{st}/O_{st}), sex and treatment (basal and heat-induced) on Hsp70 protein expression levels (data plotted in Fig. 1) (⊂ means 'nested in').

Source of variation	d.f.	Mean square	*F*	*P*
Karyotype (*K*)	2	0.325	5.39	0.010
O_{3+4}/O_{3+4} vs. O_{st}/O_{st}	1	0.323	5.35	0.035
Cross ⊂ *K*	15	0.059	0.95	0.516
Sex (*S*)	1	0.035	0.55	0.460
Treatment (*T*)	1	0.388	6.17	0.015
K × *S*	2	0.024	0.38	0.687
K × *T*	2	0.359	5.72	0.004
O_{3+4}/O_{3+4} vs. O_{st}/O_{st}	1	0.426	6.79	0.010
S × *T*	1	0.018	0.29	0.590
K × *S* × *T*	2	0.046	0.74	0.481
Error	108	0.063		

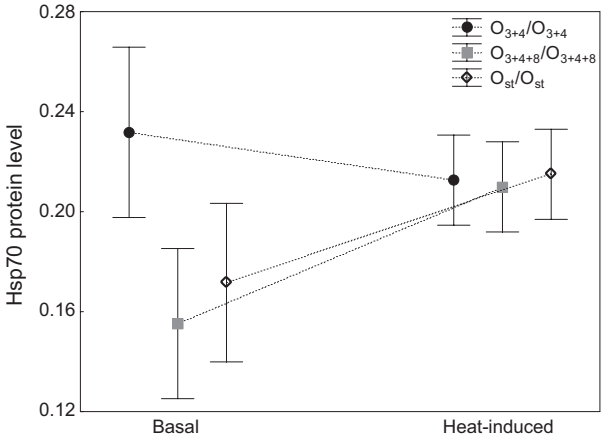


Fig. 3 Hsp70 expression (optical density; standard values used for correction) in adult *Drosophila subobscura* (females and males combined). The error bars are 95% confidence intervals around the mean of outbred flies from the three O chromosome homokaryotypes derived from six independent isochromosomal lines each (see text for details). The heat-induced Hsp70 expression levels were obtained after treating the flies with a heat shock of 32 °C for 1 h and recovery time at 18 °C for 2 h.

Basal and hardened heat tolerance

Results for the adult heat tolerance assays are plotted in Fig. 4. Measurement error in the fast ramping protocol, estimated as one minus the intraclass correlation coefficient between the two knockdown temperatures calculated from the recorded videos, was 18%. The qualitative conclusions remained the same for each estimated knockdown temperature, and we used the average of the two values as our measure of heat tolerance.

The average knockdown temperature with slow ramping (mean ± SD: 35.07 ± 1.57 °C) was substantially lower than with fast ramping (37.59 ± 1.19 °C). This is in accordance with what had been observed by Chown *et al.* (2009) for *D. melanogaster* and is also expected from our theoretical treatment of ramping effects on heat tolerance (Rezende *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011). Pearson correlation coefficients between knockdown temperatures across ramping conditions, using the pooled (basal and hardened separately) within-cross average knockdown temperature as the relevant variables (recall that that the outbred progeny within each cross is genetically identical), were not statistically different from zero in any case (Table 2).

An increase in heat tolerance following heat hardening was observed with slow ramping but not with fast ramping (Table 3). Conversely, differences between karyotypes were only detected with fast ramping: O_{3+4}/O_{3+4} flies had a higher knockdown temperature than their O_{st}/O_{st} counterparts (37.77 vs. 37.41 °C). Yet, the marginally significant karyotype × sex interaction effect under slow ramping indicates that O_{3+4}/O_{3+4} females also had a higher knockdown temperature than O_{st}/O_{st} females, whereas males had about the same heat tolerance regardless karyotype. Also important is that in no case was the karyotype × treatment (basal and hardened heat tolerance) interaction effect statistically significant.

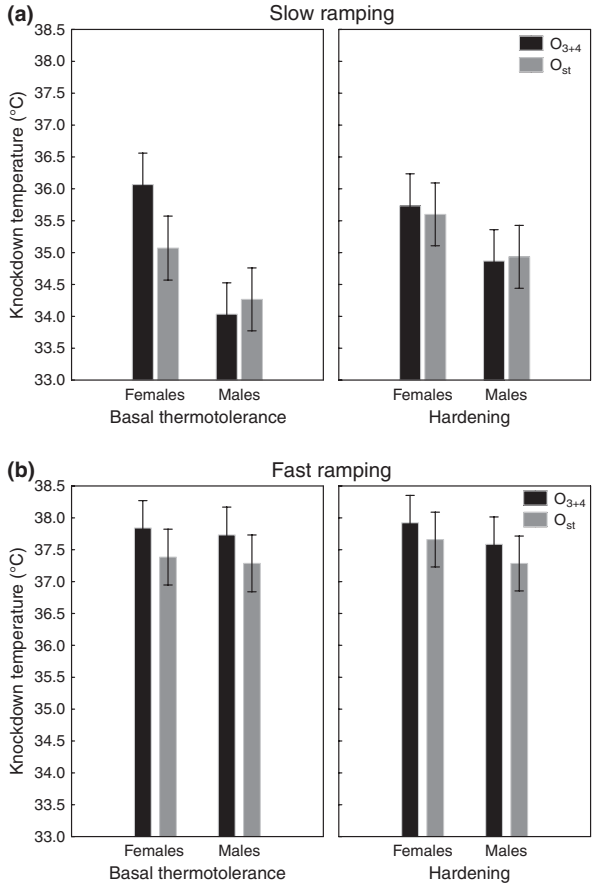


Fig. 4 Knockdown temperatures in nonhardened and hardened flies carrying warm- (O_{3+4}/O_{3+4}) and cold-climate (O_{st}/O_{st}) homokaryotypes in *Drosophila subobscura* under (a) slow ramping (ΔT = 0.1 °C min^{-1}) and (b) fast ramping (ΔT = 0.6 °C min^{-1}). Error bars are 95% confidence intervals.

Discussion

The striking observations on differences between warm- (O_{3+4}) and cold-climate (O_{st}) chromosome arrangements arising from this study are (i) the sustained higher protein levels of Hsp70 in O_{3+4}/O_{3+4} homokaryotypes under basal conditions, (ii) the higher basal thermotolerance of O_{3+4}/O_{3+4} females under slow ramping and (iii) the slightly higher basal and heat-induced thermotolerance of both O_{3+4}/O_{3+4} females and males when compared to their O_{st}/O_{st} counterparts under fast ramping. The lack of induction of Hsp70 in O_{3+4}/O_{3+4} flies might be due to a higher temperature threshold for induction than that required for O_{st}/O_{st} and O_{3+4+8}/O_{3+4+8} flies (Fig. 3). We however find this explanation unlikely because the stressful temperature used for heat hardening is about 10 °C above the upper bound of the 'set point' (T_{set}) range (central 50% of preferred body temperatures; Hertz *et al.*, 1993) for the warm-climate homokaryotype O_{3+4}/O_{3+4} (T_{set} = 16.6–22.2 °C; Dolgova *et al.*, 2010) and only 3.2 °C below its average knockdown temperature under slow ramping. It seems therefore reasonable to assume that our thermal exposure conditions (see Materials and methods) should have triggered rapid heat hardening induction in all homokaryotypes tested in the experiments.

Overproduction of Hsp70 at normal temperatures has deleterious consequences on *Drosophila* cells (Feder *et al.*, 1992) and adversely impacts larval development (Krebs & Feder, 1997a) and female fecundity (Krebs & Loeschcke, 1994). These studies have led to the idea that the existing copy number of *Hsp70* in *D. melanogaster* (six copies of *Hsp70* per haploid genome; Gong & Golic, 2004) represents a balance between selection for its chaperone function under stress conditions and against its deleterious effects on fitness (Feder & Hofmann, 1999). As stated by Sørensen (2010, p. 705), 'it is not always clear when the level of constitutive and inducible heat-shock protein

Table 2 Pearson correlation coefficients between the estimated knockdown temperatures from the slow (ΔT = 0.1 °C min^{-1}) and fast (ΔT = 0.6 °C min^{-1}) ramping assays.

	Basal	Hardened
Females	0.6412	0.2994
Males	0.0244	0.5197

The pooled within-cross average knockdown temperatures were used as the relevant variables. In no case was the correlation coefficient statistically different from zero after a sequential Bonferroni correction.

(Hsp) expression should be interpreted as reflecting the capacity or ability to mount a strong defense (i.e. as a benefit) or when it should be interpreted as reflecting the need to mount a strong response as the organism is stressed (i.e. as a cost)'. If this cost-benefit reasoning applies to *D. subobscura,* the question immediately arises: Why are the basal protein levels of Hsp70 in O_{3+4}/O_{3+4} homokaryotypes about the same than those attained by O_{st}/O_{st} flies after heat hardening induction? The seemingly obvious explanation is that Southern European populations, where the frequency of chromosome arrangement O_{3+4} is relatively high (Solé *et al.*, 2002), are more likely exposed to occasionally high temperatures than populations located at higher latitudes, and the benefits of mounting the stress response might be outweighed by the costs. This is in accordance with active flies having much lower body temperature in cooler seasons and at higher latitudes (Huey & Pascual, 2009). Interestingly, the opposite seasonal fluctuations between O_{st} and O_{3+4} carrying flies observed in an extensively studied population, where O_{3+4} consistently increases in summer and decreases in winter (Rodríguez-Trelles *et al.*, 1996), also seems to favour this interpretation. O_{3+4+8} has traditionally being considered a 'warm-climate' chromosome arrangement although its negative correlation with latitude in Palaearctic populations was mainly due to its high frequency in Northern Africa (Menozzi & Krimbas, 1992). However, no clines were observed for this arrangement in the colonized area (Balanyà *et al.*, 2003) and recent studies show that O_{3+4+8} is dramatically increasing its frequency in Northern European populations (Rezende *et al.*, 2010), which raises some caveats on the putative status of O_{3+4+8} as a warm-climate gene arrangement. Thus, the contrasting pattern of O_{3+4} in front of the other two arrangements could be due to differences in the genetic content of this warm adapted arrangement. Two hypothesis could explain the higher levels of Hsp70 expression in the O_{3+4} arrangement. On the one hand, basal thermotolerance has been found to be positively associated with hsp70 copy number in *D. melanogaster* (Bettencourt *et al.*, 2008); thus, in *D. subobscura* different copy number of the hsp70 genes in the different arrangements, with a higher number in the O_{3+4} arrangement, could explain the results encountered. On the other hand variation in the cis-regulatory region could lead to differences in the genetic expression of this gene as found in *D. melanogaster* (Bettencourt *et al.*, 2002). However, further analyses are needed to determine which hypothesis is more likely.

If the degree of thermotolerance in our flies were entirely dependent on Hsp70 protein levels, we would expect O_{st}/O_{st} flies to have about the same average knockdown temperature than their O_{3+4}/O_{3+4} counterparts after the heat-induced treatment, when Hsp70 levels were about the same across karyotypes (Fig. 3). However, no significant karyotype × treatment interaction was detected in any case (hardening effects were also absent under fast ramping). It is therefore difficult to conclude from our present results that the high basal levels of Hsp70 in the warm-climate O_{3+4}/O_{3+4} karyotypes are causally linked to their higher basal thermotolerance.

The function of Hsp70 heat-shock proteins in *Drosophila* adult heat tolerance remains unclear even after our

Table 3 ANOVA for the effects of karyotype (O_{3+4}/O_{3+4} and O_{st}/O_{st}), sex and treatment (basal and hardened heat tolerance) on knockdown temperature estimated from two dynamic assays. The conditions in the 'slow ramping' assay were T_0 = 24 °C and ΔT = 0.1 °C min^{-1} (data plotted in Fig. 4a) and in the 'fast ramping' assay T_0 = 24 °C and ΔT = 0.6 °C min^{-1} (data plotted in Fig. 4b). ($\subset$ means 'nested in').

	Slow ramping				Fast ramping			
Source of variation	d.f.	MS	*F*	*P*	d.f.	MS	*F*	*P*
Covariate (water bath)	1	0.711	0.38	0.539	1	0.059	0.04	0.840
Karyotype (*K*)	1	2.557	0.33	0.583	1	7.891	9.19	0.016
Cross $\subset$ *K*	8	7.828	4.16	< 0.001	8	0.859	0.60	0.776
Sex (*S*)	1	71.007	37.77	< 0.001	1	3.125	2.19	0.140
Treatment (*T*)	1	10.691	5.69	0.018	1	0.160	0.11	0.738
K × *S*	1	7.594	4.04	0.046	1	0.002	0.00	0.967
K × *T*	1	1.800	0.96	0.329	1	0.419	0.29	0.589
S × *T*	1	6.319	3.36	0.068	1	0.944	0.66	0.417
K × *S* × *T*	1	3.937	2.09	0.149	1	0.008	0.01	0.940
Error	221	1.880			219	1.427		

study (Dahlgaard *et al.*, 1998; Krebs *et al.*, 1998; Sørensen *et al.*, 1999; Folk *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2010). One suggested reason for this is that the different experimental protocols used to assess CT_{max} seemingly capture different physiological and genetic mechanisms underlying thermotolerance because estimates (knockdown temperatures or times) are poorly correlated (Sgrò *et al.*, 2010). We have also detected a relatively low correlation between knockdown temperatures assessed under slow or fast ramping, but doubt this is because our heat tolerance assays are estimating different things. A more reasonable explanation is that the amount of experimental noise introduced by methodology to reliably estimate heat tolerance is substantial, as suggested by the low repeatability of this trait (about 0.2; Krebs & Loeschcke, 1997) and confirmed by our theoretical treatment, showing that many experimental protocols result in unreliable and highly biased estimates of CT_{max} (Santos *et al.*, 2011).

We have recently recommended that ramping rates in experiments aiming at studying thermal tolerance should be as fast as possible to minimize the contribution of uncontrolled variables (e.g. depletion of resources during assays, short-term acclimatory responses and stochasticity effects; Rezende *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011). More important in the present context is that slow ramping protocols can grossly underestimate underlying genetic differences in critical thermal limits (Rezende *et al.*, 2011), which might explain why karyotype variation in heat stress resistance was not detected in our previous experiment (Dolgova *et al.*, 2010). We therefore believe that the present results with the fast ramping assay provide a more accurate representation of the genetic differences in heat tolerance between O_{st}/O_{st} and O_{3+4}/O_{3+4} flies.

In summary, our study clearly suggests that warm-climate karyotypes in *D. subobscura* are better able to cope with high stressful temperatures than their cold-climate counterparts. Combined with their consistent differences in thermal preferences (i.e. O_{3+4} carriers display a higher thermal preference than O_{st} ones; Dolgova *et al.*, 2010), we now conclude (Dolgova *et al.*'s claims notwithstanding) that the thermal co-adaptation hypothesis does find some support in this species and might also adaptively explain its diurnal activity patterns in summer, where O_{3+4} carriers are more active at midday (Savković *et al.*, 2004). However, the causal link between the comparatively high basal levels of Hsp70 heat-shock protein and high adult heat tolerance of O_{3+4}/O_{3+4} flies is not yet clear-cut.

Acknowledgments

We thank Doth Andersen for the technical help. Wolf Blanckenhorn and two anonymous reviewers provided constructive comments on an earlier draft. G. Calabria was supported by a predoctoral fellowship (BES-2007-15096) from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) and by a short visit grant (ref. number 3097) from the ESF Programme on 'Thermal adaptation in ectotherms: linking life history, physiology, behaviour and genetics'. O. Dolgova was supported by a predoctoral fellowship (BES-2007-17438) from the Ministerio de Educación y Ciencia. C. Rego was supported by a post-doctoral fellowship (SFRH/BPD/39998/2007) from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal). L. E. Castañeda is supported by a Juan de la Cierva fellowship (JCI-2010-06156) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). E. L. Rezende is supported by a Ramón y Cajal contract and by grant BFU2009-07564 from the Ministerio de Ciencia e Innovación. M. Pascual is supported by grant CTM2010-22218 from the Ministerio de Ciencia e Innovación. M. Santos is supported by grant CGL2010-15395 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and by the ICREA Acadèmia programme. Financial support by grant 2009SGR 636 from Generalitat de Catalunya to the Grup de Biologia Evolutiva is also gratefully acknowledged.

References

Angilletta, M.J. 2009. *Thermal Adaptation. A Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford Univ Press, Oxford, U.K.

Balanyà, J., Oller, J.M., Huey, R.B., Gilchrist, G.W. & Serra, L. 2006. Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*. *Science* **313**: 1773–1775.

Balanyà, J., Serra, L., Gilchrist, G.W., Huey, R.B., Pascual, M., Mestres, F. *et al.* 2003. Evolutionary pace of chromosomal polymorphism in colonizing populations of *Drosophila subobscura*: an evolutionary time series. *Evolution* **57**: 1837–1845.

Balanyà, J., Solé, E., Oller, J.M., Sperlich, D. & Serra, L. 2004. Long-term changes in the chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. II. European populations. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **42**: 191–201.

Bettencourt, B.R., Kim, I., Hoffmann, A.A. & & Feder, M.E. 2002. Response to natural and laboratory selection at the *Drosophila Hsp70* genes. *Evolution* **56**: 1796–1801.

Bettencourt, B.R., Hogan, C.C., Nimali, M. & Drohan, B.W. 2008. Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of *Hsp70* copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for thermotolerance in *Hsp70* null flies. *BMC Biol.* **6**: 5.

Chown, S.L. & Nicolson, S.W. 2004. *Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Chown, S.L., Jumbam, K.R., Sørensen, J.G. & Terblanche, J.S. 2009. Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. *Funct. Ecol.* **23**: 133–140.

Dahlgaard, J., Loeschcke, V., Michalak, P. & Justesen, J. 1998. Induced thermotolerance and associated expression of the heat-shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* **12**: 786–793.

Dolgova, O., Rego, C., Calabria, G., Balanyà, J., Pascual, M., Rezende, E.L. *et al.* 2010. Genetic constraints for thermal coadaptation in *Drosophila subobscura*. *BMC Evol. Biol.* **10**: 363.

Feder, M.E. & Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**: 243–282.

Feder, J.H., Rossi, J.M., Solomon, J., Solomon, N. & Lindquist, S. 1992. The consequences of expressing *hsp70* in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev.* **6**: 1402–1413.

Feder, M.E., Bedford, T.B.C., Albright, D.R. & Michalak, P. 2002. Evolvability of Hsp70 expression under artificial selection for inducible thermotolerance in independent populations of *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Biochem. Zool.* **75**: 325–334.

Folk, D.G., Zwollo, P., Rand, D.M. & Gilchrist, G.W. 2006. Selection on knockdown performance in *Drosophila melanogaster* impacts thermotolerance and heat-shock response differently in females and males. *J. Exp. Biol.* **209**: 3964–3973.

Gong, W.J. & Golic, K.G. 2004. Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster Hsp70* genes. *Genetics* **168**: 1467–1476.

Hertz, P.E., Huey, R.B. & Stevenson, R.D. 1993. Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question. *Am. Nat.* **142**: 796–818.

Hoffmann, A.A., Sørensen, J.G. & Loeschcke, V. 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J. Therm. Biol.* **28**: 175–216.

Huey, R.B. & Bennett, A.F. 1987. Phylogenetic studies of coadaptation: preferred temperatures versus optimal performance temperatures of lizards. *Evolution* **41**: 1098–1115.

Huey, R.B. & Pascual, M. 2009. Partial thermoregulatory compensation by a rapidly evolving invasive species along a latitudinal cline. *Ecology* **90**: 1715–1720.

Jensen, L.T., Cockerell, F.E., Kristensen, T.N., Rako, L., Loeschcke, V., McKechnie, S.W. *et al.* 2010. Adult heat tolerance variation in *Drosophila melanogaster* is not related to Hsp70 expression. *J. Exp. Zool.* **313A**: 35–44.

Krebs, R.A. & Feder, M.E. 1997a. Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress Chaperones* **2**: 60–71.

Krebs, R.A. & Feder, M.E. 1997b. Natural variation in the expression of the heat-shock protein Hsp70 in a population of *Drosophila melanogaster* and its correlation with tolerance of ecologically relevant thermal stress. *Evolution* **51**: 173–179.

Krebs, R.A. & Feder, M.E. 1998. Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much? *J. Insect Physiol.* **44**: 1091–1101.

Krebs, R.A. & Loeschcke, V. 1994. Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* **8**: 730–737.

Krebs, R.A. & Loeschcke, V. 1997. Estimating heritability in a threshold trait: heat-shock tolerance in *Drosophila buzzatii*. *Heredity* **79**: 252–259.

Krebs, R.A., Feder, M.E. & Lee, J. 1998. Heritability of expression of the 70KD heat-shock protein in *Drosophila melanogaster* and its relevance to the evolution of thermotolerance. *Evolution* **52**: 841–847.

Krimbas, C.B. & Loukas, M. 1980. The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Evol. Biol.* **12**: 163–234.

Loeschcke, V. & Hoffmann, A.A. 2007. Consequences of heat hardening on a field fitness component in *Drosophila* depend on environmental temperature. *Am. Nat.* **169**: 175–183.

Menozzi, P. & Krimbas, C.B. 1992. The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura* revisited: synthetic maps of gene arrangement frequencies and their interpretation. *J. Evol. Biol.* **5**: 625–641.

Moltó, M.D., Pascual, L., Martínez-Sebastián, M.J. & de Frutos, R. 1992. Genetic analysis of the heat shock response in three *Drosophila* species of the *obscura* group. *Genome* **35**: 870–880.

Munté, A., Rozas, J., Aguadé, M. & Segarra, C. 2005. Chromosomal inversion polymorphism leads to extensive genetic structure: a multilocus survey in *Drosophila subobscura*. *Genetics* **69**: 1573–1581.

Parsell, D.A., Taulien, J. & Lindquist, S. 1993. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **339**: 279–286.

Pegueroles, C., Ordóñez, V., Mestres, F. & Pascual, M. 2010. Recombination and selection in the maintenance of the adaptive value of inversions. *J. Evol. Biol.* **23**: 2709–2717.

Prevosti, A., Serra, L., Ribó, G., Aguadé, M., Sagarra, E., Monclús, M. *et al.* 1985. Colonization of *Drosophila subobscura* in Chile. II. Clines in the chromosomal arrangements. *Evolution* **39**: 838–844.

Prevosti, A., Ribó, G., Serra, L., Aguadé, M., Balañá, J., Monclús, M. *et al.* 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.

Rego, C., Balanyà, J., Fragata, I., Matos, M., Rezende, E.L. & Santos, M. 2010. Clinal patterns of chromosomal inversion polymorphisms in *Drosophila subobscura* are partly associated with thermal preferences and heat stress resistance. *Evolution* **64**: 385–397.

Rezende, E.L., Balanyà, J., Rodríguez-Trelles, F., Rego, C., Fragata, I., Matos, M. *et al.* 2010. Climate change and chromosomal inversions in *Drosophila subobscura*. *Clim. Res.* **43**: 103–114.

Rezende, E.L., Tejedo, M. & Santos, M. 2011. Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: methodological problems and evolutionary implications. *Funct. Ecol.* **25**: 111–121.

Roberts, S.P. & Feder, M.E. 2000. Changing fitness consequences of *hsp70* copy number in transgenic *Drosophila* larvae undergoung natural thermal stress. *Funct. Ecol.* **14**: 353–357.

Rodríguez-Trelles, F., Alvarez, G. & Zapata, C. 1996. Time-series analysis of seasonal changes of the O inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetics* **142**: 179–187.

Santos, M., Castañeda, L.E. & Rezende, E.L. 2011. Making sense of heat tolerance estimates in ectotherms: lessons from *Drosophila*. *Funct. Ecol.* **25**: 1169–1180.

Sarup, P., Sorensen, J., Dimitrov, K., Barker, J. & Loeschcke, V. 2006. Climatic adaptation of *Drosophila buzzatii* populations in southeast Australia. *Heredity* **96**: 479–486.

Savković, V., Stamenkovic-Radak, M. & Andjelkovic, M. 2004. Diurnal variability of gene arrangement frequencies in *Drosophila subobscura* populations from two habitats. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **42**: 208–214.

Sgrò, C.M., Overgaard, J., Kristensen, T.N., Mitchell, K.A., Cockerell, F.E. & Hoffmann, A.A. 2010. A comprehensive assessment of geographic variation in heat tolerance and hardening capacity in populations of *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *J. Evol. Biol.* **23**: 2484–2493.

Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1995. *Biometry*, 3rd edn. Freeman, New York, NY.

Solé, E., Balanyà, J., Sperlich, D. & Serra, L. 2002. Long-term changes in the chromosomal inversion polymorphism of

Drosophila subobscura. I. Mediterranean populations from southwestern Europe. *Evolution* **56**: 830–835.

Sørensen, J.G. 2010. Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and exposure to stress in natural populations. *Curr. Zool.* **56**: 703–713.

Sørensen, J.G., Michalak, P., Justesen, J. & Loeschcke, V. 1999. Expression of the heat-shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance. *Hereditas* **131**: 155–164.

Sørensen, J.G., Kristensen, T.N. & Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* **6**: 1025–1037.

Terblanche, J.S., Deere, J.A., Clusella-Trullas, S., Janion, C. & Chown, S.L. 2007. Critical thermal limits depend on methodological context. *Proc. Biol. Sci.* **274**: 2935–2942.

Data deposited at Dryad: doi: 10.5061/dryad.6vn7t861

Received 19 October 2011; revised 30 December 2011; accepted 3 January 2012

JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY

J. Appl. Entomol.

ORIGINAL CONTRIBUTION

First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe

G. Calabria[1], J. Máca[2], G. Bächli[3], L. Serra[1] & M. Pascual[1]

1 Departament de Genètica, Universitat de Barcelona (ed. Annex), Barcelona, Spain
2 Czech Agency of Nature Conservation, Ceské Bude^{Y}jovice, Czech Republic
3 Zoological Museum, University Zurich-Irchel, Zurich, Switzerland

Keywords
cherry fruitfly, invasive species, potential pest

Correspondence
Gemma Calabria (corresponding author), Departament de Genètica, Universitat de Barcelona (ed. Annex). Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.
E-mail: gemmacalabria@ub.edu

Received: June 12, 2010; accepted: September 7, 2010.

doi: 10.1111/j.1439-0418.2010.01583.x

Abstract

Drosophila suzukii ovoposits and feeds on healthy fruits, unlike most other *Drosophila* species. It has been traditionally reported from Asia, but in the last 2 years it has been recorded from North America, where it is causing a lot of agricultural damage. Herein we report the first records of, *D. suzukii* in Europe. It has been found in different localities expanding an altitudinal range from 27 to 1550 m above sea level (ab.s.l). Furthermore by comparing collections of drosophilids from different European populations distributed along a latitudinal cline we were able to determine its high dispersal ability since it spread approximately 1400 km in 1 year either actively or passively through infested fruits. The similarities of the introduction dates in North America and Europe and the COI haplotypes suggest that the two invasions could be related. No considerable damage on crops has been reported yet in Europe. However, if this species gets established in more temperate localities it could become a serious pest. Therefore tracking the invasion of this species is recommended. An early detection of this potential pest is decisive for good management of the fields.

Introduction

Invasive species are recognized as a threat to biodiversity as they can alter environments and displace endemic species (Lee 2002). They also impose enormous costs on agriculture, forestry and human health (Mack et al. 2000; Lee 2002; Malacrida et al. 2007). A number of species of the genus *Drosophila* (commonly known as vinegar flies or lesser fruit flies) have become cosmopolitan after colonizing different areas worldwide from their ancestral distribution ranges (David and Capy 1988; Frydenberg et al. 2002; Fernández Iriarte et al. 2009) although most of them are not considered pests as their larvae mostly develop in damaged or rotting fruit. On the contrary, *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) ovoposits in fresh fruits causing considerable damage to crops, and has also lately invaded new areas (Kaneshiro 1983; Hauser et al. 2009). This species was originally described from Japan in a collection of insect illustrations (with short descriptions in Japanese). Its biology was studied with special mention on the injury caused on cherries which gave the species the common name of cherry fruitfly (Kanzawa 1934, 1936, 1939). Molecular data has corroborated its inclusion in the *Drosophila* genus as a member of the *melanogaster* group and within the *suzukii* subgroup (Yang et al. 2004). The species is now known from many Japanese localities including Bonin Islands and Ryukyu Islands (it is mentioned from Japan in about 150 papers, unfortunately the citations are often cursory and some papers are entirely in Japanese). In Asia, *D. suzukii* is also reported from the eastern part of China (Peng 1937), Taiwan (Lin et al. 1977), Russian Far East (Sidorenko 1992), North and South Korea (Chung 1955; Kang and Moon 1968), northernmost part of India (Parshad and Duggal 1965), Pakistan (Amin ud Din et al. 2005),

Myanmar (Toda 1991) and Thailand (Okada 1976). From particular countries only the first records are given and detailed data on their distribution can be found in TAXODROS (Bächli 2010, http://www.taxodros.uzh.ch). Although the species is oriental its distributional origins cannot be inferred from the chronology of the records as in most of these countries collections of drosophilids are very sparse. In the past few decades it has invaded new areas, including the successful establishment in Hawaii in the 1980s (Kaneshiro 1983; O'Grady and Perreira 2002). Interestingly, Ashburner *et al.* (2005, p. 1250) mentioned its presence in the Neotropic Region, quotting the information of P. O'Grady. More detailed information by P. O'Grady indicated it to be common in Costa Rica in collections from March 1997 and rare in Ecuador in collections from August 1998 (personal information to J. Máca). In 2008, *D. suzukii* was found for the first time in, California, North America (Hauser et al. 2009). One year later, in 2009, it had already been collected from various locations all over the west coast of North America up to British Columbia (Canada), as well as in Florida (USA) along the east coast. The introductions into these areas have already caused a lot of economical damage to agriculture (Hauser et al. 2009; Steck et al. 2009). On the other hand, no reports of damage are known from Hawaii or from Central and South America. The cherry fruitfly *D. suzukii* has also lately been called the spotted wing Drosophila in America (Dreves et al. 2009; Hauser et al. 2009; Steck et al. 2009).

Here we present data of the first findings of *D. suzukii* in Europe. Specifically we give the drosophilid species composition of eight populations distributed across a latitudinal cline from the south of Spain to the north of the Netherlands which will serve as a baseline for further monitoring studies of this potential pest species. We have also sequenced the BARCODE fragment of the COI mtDNA gene in a few number of European specimens and compared them with data available from North American samples which can serve for further studies on tracing the invasion routes. Finally we discuss the effectiveness of management actions.

Materials and Methods

The eight localities sampled were: Barcelona, Málaga, València and Rasquera (Spain), Montpellier, Dijon, Alpes Maritimes (France) and Groningen (The Netherlands) (fig. 1). The localities were sampled in 3 years, the first one being Barcelona in 2007 and the last one Montpellier in 2009 (table 1).

Brief description of sampled localities

Barcelona, Parc de Collserola (41°43'N, 2°13'E)
Typical Mediterranean vegetation composed of a sparse pine forest (*Pinus pinea*) with some ilex oaks



Fig. 1 European localities sampled for *Drosophila* species reported in the present study. Filled dots indicate locations where *D. suzukii* was collected.

Table 1 Collection dates and frequency distribution of the drosophilids sampled in the eight European localities distributed along a latitudinal cline

Population	Málaga	València	Rasquera	Barcelona	Montpellier	Alpes Maritimes	Dijon	Groningen
Latitude	36°43′	39°32′	40°57′	41°25′	43°35′	44°07′	47°18′	53°13′
Collection date	20 Oct 2008	23 Oct 2008	25 Oct 2008	23–29 Oct 2007	01 Sep 2009	29 Aug–4 Sep 2009	27 Aug 2009	30 Aug 2009
Drosophila suzukii			**4.57**		**0.32**	**66.67**		
Drosophila subobscura	5.29	79.17	38.58	34.54	69.72	3.23	28.41	69.07
Drosophila helvetica				0.48	0.32		1.82	4.66
Drosophila obscura						2.15	0.33	
Drosophila melanogaster/ *Drosophila simulans*	94.49	20.83	29.44	65.22	29.02	27.96	48.72	5.93
Drosophila immigrans			1.27	1.09			9.74	17.16
Drosophila kuntzei							7.18	
Drosophila hydei			9.64		0.63			
Drosophila cameraria			16.50	4.95				0.21
Drosophila phalerata				0.48			3.14	2.97
Drosophila repleta	0.21							
Drosophila testacea							0.66	
n	3196	120	394	828	317	93	1211	472

(*Quercus ilex*) and Mediterranean brushwood (*Quercus coccifera*, *Buxus sempervirens*, etc.). The altitude was about 445 m ab.s.l.

Málaga, Abandoned tree nursery from Junta de Andalucía (36°43′N, 4°25′W)
The vegetation of the area was composed of pines (*P. pinea*), ilex oaks (*Q. ilex*) and eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis)*. The altitude was about 49 m ab.s.l.

València, La Canyada (39°32′N, 0°29′W)
A forest (close to a residential area) composed mainly of pine trees (*P. pinea*). The altitude was about 59 m ab.s.l.

Rasquera, Forest located at km 11 of the road from El Perelló to Rasquera (40°57′N, 0°38′E)
The forest was composed mostly of pine trees (*P. pinea*) and its corresponding undergrowth (*Rubus spp*.). The altitude explored was about 140 m ab.s.l.

Montpellier, Parc de Mas Prunet (43°35′N, 3°49′E)
An urban park from the XVIII century of 9 000 m^2. It was composed of deciduous trees and evergreens. The altitude was about 27 m ab.s.l.

Dijon, Parc de la Colombière (47°18′N, 5°02′E)
Is the largest park in the immediate vicinity of Dijon created in the XVI century and restored in 1978. It includes 6000 trees: some 1600 deciduous trees (lime, chestnut, oak, hornbeam, ash, maple) and over 100 evergreens. The altitude was about 245 m ab.s.l.

Groningen, Noorderplantsoen (53°13′N, 6°33′E)
An English style garden occupying the old fortification areas. The traps were located near the big pond. The altitude was about 4 m ab.s.l.

Alpes Maritimes, Minière de Vallauria (44°07′ N, 7°17′ E)
Crystalline rock formation with migmatite along the torrent, with ancient mines, limestone screes and cliffs, glacier deposits. The altitude explored was about 1550 m ab.s.l. Forests were composed of pine, mixture of fir tree and larch with pastoral lawn (cows). *Rubus* spp. and *Prunus domestica insititia* are present over the locality.

In each locality, except for Alpes Maritimes, flies were netted over 15 smashed fermented banana traps with added yeast in 30 min intervals from midday to dusk; collections were made by members of the evolutionary genetics group of the University of Barcelona. In the Alpes Maritimes 20 traps with fermented beer were used. They were installed on 29th Aug 2009 and the flies were collected on 4th Sep 2009; collection was made by J. Máca. All collected drosophilids were classified with a field binocular or in the laboratory after preserving the specimens in 100% absolute ethanol.

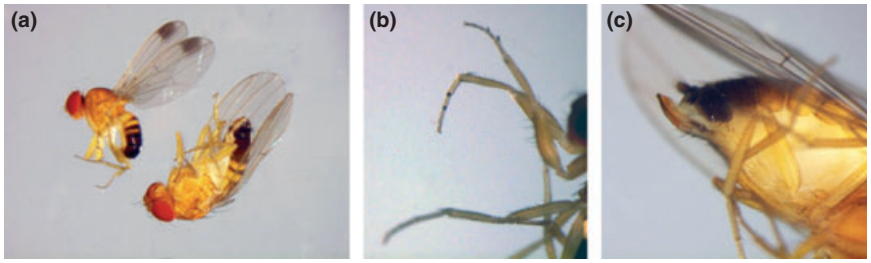


Fig. 2 *Drosophila suzukii*. a: general view of male (left) and female (right). The black spots can be observed in the male's wings. b: sex combs of *D. suzukii* males. c: female ovipositor.

Morphological and molecular analysis to identify *D. suzukii*

Morphological identification was carried out according to the key by Okada (1956) (where a female ovipositor is illustrated) and the description by Bock and Wheeler (1972) that provides pictures of the sex combs and genitalia of males.

Adults of *D. suzukii* are approximately 2–3 mm length (females slightly larger than males), with red eyes, pale brown thorax and pale brown abdomen with black transverse stripes (fig. 2). Males are readily characterized by the presence of a dark spot near the wing tips and by two short sex combs on the 1st and 2nd segment (respectively) of fore tarsi (fig. 2a,b). Although females do not present these characters, they are easily recognized by its characteristic large, pointed and serrated ovipositor which allows them to break the skin of healthy fruits (fig. 2c). Interestingly, neither the combination of sex combs and wing spots in males, as well as the serrated ovipositor is found in any other Palearctic or Nearctic species.

Molecular identification was carried out by the amplification of the barcode COI gene with the universal primers designed by Folmer *et al.* (1994). DNA extraction was carried out as described in Gloor *et al.* (1993). Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifications were performed in a 15 μl total volume with 3 μl dNTPs (1 mM), 0.45 μl DMSO, 0.3 μl Phire Hot Start DNA Polymerase and 3 μl Buffer 5× (Finnzymes), 0.75 μl forward primer (10 μM), 0.75 μl reverse primer (10 μM), 5.75 μl water and 1 μl DNA. Amplification conditions were 30 s at 98°C for initial denaturation followed by 35 cycles with 5 s at 98°C for denaturation, 5 s at 55°C for primer annealing and 90 s at 72°C for extension, and 7 min at 72°C for final extension. A 10 μl volume of the PCR amplified product was purified with 1.7 μl ExoI (Tebu-Bio) and 3.3 μl SAP (Promega). Two sequences were obtained for each amplified individual, one from the forward primer and another one from the reverse primer. Sequencing reactions were obtained with the ABI Prism BigDye Terminators 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's conditions and processed on an ABI 3730 sequencer from the Serveis cientifico-Tècnics at the Universitat de Barcelona. Sequences were assembled with SeqMan II (DNASTAR; http://www.dnastar.com/) to obtain the final sequence per individual and all sequences as well as those found in GenBank were aligned with Clustal W (Thompson et al. 1994) implemented in BioEdit v.7 (Hall 1999).

Results and Discussion

Collecting results

The frequencies of the distribution of the drosophilids sampled in the eight European localities are given in table 1. Due to the difficulties connected with identifying the females of the sibling species *D. melanogaster* and *D. simulans*, the frequencies of these two species were combined.

The first record in Europe of *D. suzukii* was in Rasquera (Spain) in autumn 2008 (table 1) where 10 males and two females were collected. However, the species was absent from southern collections carried out during the same month and year. Collections carried out during the previous year (2007) in Barcelona, also in autumn, found no records of this species. One year later, at the end of August and beginning of September 2009 *D. suzukii* was also captured north of the Pyrenees, in Montpellier and Alpes Maritimes, but it was absent from northern collections (table 1).

Surprisingly, *D. suzukii* was the dominant drosophilid species in the locality with the highest elevation (Alpes Maritimes, 1550 m ab.s.l.), while it repre-

sented a small percentage of the drosophilid fauna sampled in Rasquera (140 m ab.s.l) and in Montpellier (27 m ab.s.l.) (table 1). The different percentage of *D. suzukii* amongst the two French localities sampled at the same time period, could be due to the different type of trapping baits used (fermented beer in Alpes Maritimes and fermented banana in Montpellier) although we cannot discard other factors such as differences in habitat, associated with human modified environments, larval food supply, and to climatic conditions associated with altitude. In a recent paper, it was suggested that *D. suzukii* could move from low to high localities of Japan, probably escaping from resource-poor conditions at lower localities in summer (Mitsui et al. 2010).

During 2009 *D. suzukii* was also found in other European localities (fig. 1) although no records are available of the drosophilid composition of the collections in these sites. Four males and two females were collected with banana baits in Bellaterra (41°30′N, 2°5′E, 32 m ab.s.l.) at the campus of the Universitat Autònoma de Barcelona in October 2009 (Luz Ángela Betancourt, personal communication). In September 2009 insect larvae were collected in the Italian province of Trentino from forest fruits (*Vaccinium, Fragaria* and *Rubus*) and several *D. suzukii* flies emerged from them (Grassi et al. 2009). The Italian localities from where the flies emerged are plotted in fig. 1 and are given below properly named and supplemented by the geographic coordinates and elevations (Grassi, personal communication): Casalino nr. Pergine (Valsugana Valley) 46°07′N, 11°23′E, 503 m ab.s.l.; Novaledo (Valsugana Valley) 46°02′N, 11°36′E, 426 m ab.s.l.; Gaggio nr. Segonzano (Cembra Valley) 46°20′N, 11°28′E, 870 m ab.s.l.; Gorghe nr. Trento (Adige Valley) 46°13′N, 11°14′E, 680 m ab.s.l.; Zortea (Imer, nr. Primiero) (Vanoi Valley) 46°16′N, 11°76′E, 1100–1200 m ab.s.l. Vigo Cavedine, 45°59′N, 10°59′E, approximately 500 m ab.s.l. More recently, one fly was photographed on 21st March 2010 in Villelaure (43°39′N, 5°25′E, 173 m ab.s.l.), approximately 20 km N Aix-en-Provence, on rotting pears (C. Lauriaut personal communication). Finally, in June 2010 in the province of La Toscana (Italy), some individuals were found in a faunistic survey in the forest near San Giuliano Terme, 43°45′N, 10°26′E, 6 m ab.s.l. (Grassi, personal communication).

To summarize, up to date *D. suzukii* has been captured in Europe within the following geographical coordinates: latitude 40°–47°N, longitude 02°–12°E, and from an altitudinal range from 27 to 1550 m ab.s.l.

Molecular identification of *D. suzukii*

We sequenced three males and one female from Rasquera for COI and all individuals presented the same haplotype (GenBank accession number: HM636439). When GenBank was searched for the COI sequences available for *D. suzukii* we obtained two sequences one from Japan (Goto and Kimura 2001; accession number GI: 13429942) and another from California (Hauser et al. 2009; accession number GI: 253749197) that unfortunately amplified two non-overlapping segments as inferred from their comparison with the *D. melanogaster* genome in the UCSC genome browser (http://genome.ucsc.edu). The sequence from California had been amplified with the same universal primers used in the present work and the identity was almost perfect (99% identity) with only two nucleotide differences between the two sequences in a total length of 658 bp (site 213: G instead of A; site 270: T instead of C; both of them synonymous changes). Interestingly, this haplotype has also been found in North America (Martin Hauser, personal communication) but in a very low frequency. The similarities of the introduction dates in North America and Europe along with the same COI haplotype found in both areas suggest that the two invasions could be related. However, further analyses are needed, including more individuals and sampling the ancestral area of the species and other colonized areas in order to know the level of genetic variability of this species. This would also allow us to infer the introduction routes of this invasion as well as whether one or multiple independent invasions have shaped the invasion history of *D. suzukii* as successfully inferred in the colonizing species *D. subobscura* (Pascual et al. 2007; Fernández Iriarte et al. 2009).

Drosophila suzukii as potential pest

According to Kanzawa (1939), the development cycle of *D. suzukii* is between 8 and 14 days (averaging 10 days, at 25°C). The egg period is 1–3 days, the duration of the pupae stage is 4–16 days and adults start to mate 2–3 days after emerging. Adult survive for 3–9 weeks and only adult flies can overwinter. Overwintering adult's life span is considerably longer and many survive until next spring. Flies are known to overwinter under leaves or between stones. The preferred temperature is between 20 and 25°C. Decrease of activity, longevity and egg laying occurs at higher temperatures (above 30°C). Heat tolerance experiments have indicated that *D. suzukii*

has a heat average lethal temperature (LT50) of 32°C and a cold average lethal temperature of −0.8°C (Kimura 2004). Furthermore geographic variation in thermal tolerance was low or negligible as no differences in thermal tolerances were observed between cool (Sapporo) and warm (Tokyo) temperate strains from Japan (Kimura 2004). This data indicates this species is a temperate species. However, the occurrence of this species in southern California suggests that it can tolerate warm conditions and survive the hot summers of California and Oregon.

Females have high fecundity, a female can lay 7–13 eggs per day, on average 384 eggs over her lifetime (Kanzawa 1939). Females of *D. suzukii* generally produce clutches of single or a few eggs on mature fruits, but sporadically can lay eggs on premature fruits (Mitsui et al. 2006). However, multiple ovipositions can occur when not many fruits are available and female population is high. In experiments carried out in laboratory 10–20 eggs per fruit were found and when forced up to 60 flies emerged from a single fruit (Kanzawa 1939). Infestation of fruit is revealed by little holes in its skin caused by the female ovipositor. Fruit damage is initially caused by the *D. suzukii* larvae feeding on flesh, however, secondary damage by beetles (*Nitidulidae*) and fungal and/or bacterial infections may contribute to further fruit deterioration. In California, no official numbers on the damage in cherry production are available yet, but some estimations point to an average of 20% of cherry crops being ruined by *D. suzukii* in 2009 (M. Hauser, personal communication). For an economic evaluation of *D. suzukii* see Bolda *et al.* (2010). In North America this fly has been reported from a great variety of fresh fruits such as blueberries, wild blackberries, red raspberries, Marionberries, cherries, strawberries, plums, peaches, wine grapes, figs, hardy kiwis, and Asian pears (Dreves et al. 2009). The preferred host appears to be cherry but when the cherry season is over, individuals of *D. suzukii* move to the other crops. In fact, our collections were carried out in autumn, when the cherry season has finished, and in areas where no fruit trees were available. This suggests that after summer, there may be a number of cultivated or wild autumn crops suitable to be infected by *D. suzukii.*

The invasion of *D. suzukii* resembles that of another pest species and recent invader drosophilid, the African fig fly *Zaprionus indianus*. This species, also widespread in India and several islands of the Pacific colonized in the last decade the New World. It is a generalist species (Lachaise and Tsacas 1983) and recorded as a pest on native and cultivated fruits such as oranges, peaches and figs in Brazil (Vilela 1999; David et al. 2006), Panamá and Florida (Vander Linde et al. 2006). Contrary to *D. suzukii, Z. indianus* breeds only on fallen fruits or on damaged fruits still on the tree with the exception of figs where its particular morphology of egg-guides gives easy and direct access to the soft contents of the fruits (Vander Linde et al. 2006).

Although *D. suzukii* has colonized California (North America) and Spain (Europe), both Mediterranean climates, ecological simulations seem to indicate that dry Mediterranean climate is not the preferred condition for *D. suzukii* (Hauser et al. 2009). Thus, if this species spreads to more humid areas it could become a serious agricultural pest. Our data seems to confirm the thermo/hydropreferences of *D. suzukii* as in Europe it is expanding northwards, as in western North America, and at higher altitudes were summer temperatures might be milder and humidity higher. Niche shifts could be occurring as reported in *Z. indianus* and quickly expanding ranges of this species into different environments in the invaded areas suggest climatic niche shifts primarily in India (Da Mata et al. 2010).

Invasive species generally spread quickly through one or several regions and the most plausible explanation for the colonization and expansion in the new areas is related to the increasing global trade (Vilela 1999; Rius et al. 2008). Considering that there was probably only one introduction event in Europe, our collection data suggests that *D. suzukii* spread approximately 1400 km in 1 year most probably both actively and passively by human activities through infected fruits as suggested in *Z. indianus* (David et al. 2006). To what extent is the spread along the new areas due to man-made transportation must be taken into account and answered with further studies, and also whether the two invasions (in Europe and North America) are independent or not. In this sense, molecular studies with DNA barcodes are demonstrated to be useful, as for example in the case of *Z. indianus*, where after the study of sequences of COI and COII two independent radiations of this species have been identified, an older to the East (Madagascar, Middle East and India) and a younger to the West (the Americas and Madeira) (Yassin et al. 2008).

Management

Fly traps are recommended for the early detection and control of *D. suzukii*. Trapping is very inexpen-

sive and easy to execute compared to other methods of control, not only for detecting the presence but also to notice if the population is growing. The attractiveness of the bait used for the trap may vary with the crop the bait is competing with and the time of the year. For example, yeast based baits used in jar traps hanging 1.5 m off the ground and changed every 7 days were most useful for detecting *D. suzukii* in a raspberry production field during August 2009 (Ed Show, personal communication). Current registered pesticides (for cherries) are: DMTP, Permetrin, Cypermetrin ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$) and Tralometrin ($C_{22}H_{19}Br_4NO_3$) according to Yamakawa and Watanabe 1991. Unfortunately they are only effective on the fully ripened fruits which might be too late to be effective for preventing damage of the crops by *D. suzukii*. In the USA the effectiveness of Malathion and delegate (spinetoram) against *D. suzukii* has been demonstrated on raspberries (Bolda 2010a). Pyrethroid spray during the ripening season was also effective. The Hymenopterous parasitoid *Phaenopria* sp. is known as a natural enemy of *D. suzukii* (Kanzawa 1939); however, it is not readily disposable for practical use. Other control methods are related with exhaustive harvesting. If there are fruit left on the trees, the oviposition increases and density of *D. suzukii* becomes high. Thus, fruit with inferior quality must also be harvested and then discarded, i.e. removed from the field and physically destroyed (Dreves et al. 2009). Furthermore, 4 days of cold storage (of about 3°C) of the infected fruit (in cherries) kills eggs and larvae without affecting the fruit quality (Kanzawa 1939; Bolda 2010b); this complements the control measures used in the field.

Conclusions

The colonization of *D. suzukii* in Europe is simultaneous with that in North America. While in America vast areas have been already invaded and great damage often reported, in Europe the expansion seems slower and still without apparent economic losses. However, this may change if this species invades the temperate part of Europe. As *D. suzukii* apparently thrives well at high elevated localities of Alps (1100 – more than 1500 m), it can be predicted that it shall break through the mountain passes into central Europe. Monitoring effort is necessary to control the probable further expansion and/or establishment of this species in Europe. Local quarantine measures are worth considering. Genetic studies using different markers should be done in order to ascertain the origin of the species and understand the transport pathways into the new ranges.

Acknowledgements

The authors are grateful to various persons for their keen interest about the new potential agricultural pest. We are especially indebted L. A. Betancourt (UAB, Spain), A. Grassi (Trento, Italy), M. Hauser (CDFA, Cal., USA), C. Lauriaut (Villelaure, France) and P. O'Grady (Berkeley University, Cal., USA) who helped us to supplement information on its present distribution; P. Simões and O. Dolgova who helped in the collections of the European populations and V. Kellermann for her usefull comments on the English version of this paper. This work was partially financed by project CGL2006-13423-C02/BOS from Ministerio de Educación y Ciencia and 2009SGR 636 from Generalitat de Catalunya to the Grup de Biologia Evolutiva. The travel expenses of J. Máca were partially granted by European Distributed Institute for Taxonomy, Work Package 7, Stuttgart, Germany.

References

Amin ud Din M, Mazhar K, Haque S, Ahmed M, 2005. A preliminary report on *Drosophila* fauna of Islamabad (Capital, Pakistan). Drosoph. Inf. Serv. 88, 6–7.

Ashburner M, Golic K, Hawley SH, 2005. *Drosophila*: a laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Bächli G, 2010. TaxoDros, the database on taxonomy of Drosophilidae. http://taxodros.unizh.ch

Bock IR, Wheeler MR, 1972. The *Drosophila melanogaster* species group. In: Studies in genetics VII. Ed. by Wheeler MR, University of Texas, Texas, 1–102.

Bolda MP, 2010a. Further chemical efficacy trials for management of spotted wing Drosophila, *Drosophila suzukii*, in raspberries. http://ucanr.org/blogs/strawberries_caneberries/index.cfm.

Bolda MP, 2010b. Length and magnitude of fruit cooling and spotted wing Drosophila mortality. http://ucanr.org/blogs/strawberries_caneberries/index.cfm.

Bolda MP, Goodhue RE, Zalom FG, 2010. Spotted wing Drosophila: potential economic impact of a newly established pest. http://www.agecon.ucdavis.edu/extension/update/articles/v13n3_2.pdf.

Chung YJ, 1955. Collection of wild *Drosophila* on Quelpart Island, Korea. Drosoph. Inf. Serv. 29, 111.

Da Mata RA, Tidon R, Côrtes LG, de Marco P, Diniz-Filho JAF, 2010. Invasive and flexible: niche shift in the drosophilid *Zaprionus indianus* (Insecta, Diptera). Biol. Invasions 12, 5, 1231–1241.

David JR, Capy P, 1988. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. Trends Genet. 4, 106–111.

David JR, Araripe LO, Bitner-Mathé BC, Capy P, Goñi B, Klaczko LB, Legout H, Martins MB, Vouidibio J, Yassin A, Moreteau B, 2006. Quantitative trait analysis and geographic variability of natural populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader in Brazil. Heredity 96, 53–62.

Dreves AJ, Walton V, Fisher G, 2009. A new pest attacking healthy ripening fruit in Oregon. OSU Extension Service. http://ir.library.oregonstate.edu/jspui/bitstream/1957/13090/1/em8991.pdf

Fernández Iriarte PJ, Balanyà J, Pascual M, Mestres F, Hasson ER, Fontdevila A, Serra L, 2009. Tracking the origin of an invasive species: *Drosophila subobscura* in Argentina. J. Evol. Biol. 22, 650–658.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Marine Biol. Biotechnol. 3, 294–299.

Frydenberg J, Pertoldi C, Dahlgaard J, Loeschcke V, 2002. Genetic variation in original and colonizing *Drosophila buzzatii* populations analysed by microsatellite loci isolated with a new PCR screening method. Mol. Ecol. 11, 181–90.

Gloor GB, Preston CR, Johnson-Schlitz DM, Nassif NA, Phillis RW, Benz WK, Robertsons HM, Engel WR, 1993. Type I Repressors of *P* Element Mobility. Genetics 135, 81–95.

Goto SG, Kimura MT, 2001. Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. Mol. Phylogenet. Evol. 18, 404–422.

Grassi A, Palmieri L, Giongo L, 2009. *Drosophila* (Sophophora) *suzukii* (Matsumura) – new pest of small fruit crops in Trentino. Terra Trentina. 10, 19–23. (In Italian) http://www.ufficiostampa.provincia.tn.it/binary/pat_ufficio_stampa/terra_trentina/PATTN_Not_TerraTrentina_10.1259743077.pdf.

Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41, 95–98.

Hauser M, Gaimari S, Damus M, 2009. *Drosophila suzukii* new to North America. http://www.nadsdiptera.org/News/FlyTimes/issue43.pdf.

Kaneshiro KY, 1983. *Drosophila (Sophophora) suzukii* (Matsumura). Proc. Hawaiian Entomol. Soc. 24, 179.

Kang YS, Moon KW, 1968. Drosophilid fauna of six regions near the demilitarized zone in Korea. Korean J. Zool. 11, 65–68.

Kanzawa T, 1934. Studies on a fruit fly, *Drosophila sp.* (in Japanese). Kontyu. 8, 302–303.

Kanzawa T, 1936. Studies on *Drosophila suzukii* mats. J. Plant Prot.. 23, 66–70, 127–132, 183–191. Abstract in Rev. Appl. Entomol. 24, 315.

Kanzawa T, 1939. Studies on the fruit flies. Yamanashi-kenritsu Noji-shikenjo Gyomu-nenpo 49 pp. Rev. Appl. Entomol. 29, 622 [Abstract].

Kimura MT, 2004. Cold and heat tolerance of drosophilid flies with reference to their latitudinal distributions. Oecologia 140, 442–449.

Lachaise D, Tsacas L, 1983. Breeding-sites in tropical African drosophilids. In: The genetics and biology of *drosophila*. Vol. 3d, Ed. by Ashburner M, Carson HL, Thompson JN, Academic Press, London, 221–332.

Lee CE, 2002. Evolutionary genetics of invasive species. Trends Ecol. Evol. 17, 386–391.

Lin F-J, Tseng H-C, Lee W-Y, 1977. A catalogue of the family Drosophilidae in Taiwan (Diptera). Quarternary J. Taiwan Mus. 30, 345–372.

Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, Evans H, Clout M, Bazzaz FA, 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. Ecol. Appl. 10, 689–710.

Malacrida AR, Gomulski LM, Bonizzoni M, Bertin S, Gasperi G, Guglielmino CR, 2007. Globalization and fruitfly invasion and expansion: the medfly paradigm. Genetica 131, 1–9.

Matsumura S, 1931. 6000 illustrated insects of Japan-empire (in Japanese). Tokohshoin, Tokyo, 1497 pp.

Mitsui H, Takahashi KH, Kimura MT, 2006. Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. Popul. Ecol. 48, 233–237.

Mitsui H, Beppu K, Kimura MT, 2010. Seasonal life cycles and resource uses of flower- and fruit-feeding drosophilid flies (*Diptera: Drosophilidae*) in central Japan. Entomol. Sci. 13, 60–67.

O'Grady PM, Perreira WD, 2002. New records for introduced *Drosophilidae* (Diptera) in Hawai'i. Bishop Museum Occasional Papers 69, 34–35.

Okada T, 1956. Systematic study of *Drosophilidae* and allied families of Japan. Gihodo, Tokyo, 283 pp.

Okada T, 1976. New distribution records of the Drosophilids in the oriental region. (in Japanese). Makunagi. 8, 1–8.

Parshad R, Duggal KK, 1965. *Drosophilidae* of Kashmir, India. Drosoph. Inf. Serv. 40, 44.

Pascual M, Chapuis MP, Mestres F, Balanyà J, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L, Estoup A, 2007. Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. Mol. Ecol. 16, 3069–3083.

Peng FT, 1937. On some species of *Drosophila* from China. Annot. Zool. Jpn. 16, 20–27.

Rius M, Pascual M, Turón X, 2008. Phylogeography of the widespread marine invader *Microcosmus squamiger* (Ascidiacea) reveals high genetic diversity of introduced populations and non-independent colonizations. Diversity Distrib. 14, 818–828.

Sidorenko VS, 1992. New and unrecorded species of *Drosophilidae* from Soviet Far East (*Diptera, Brachycera*). Spixiana. 15, 93–95.

Steck GJ, Dixon W, Dean D, 2009. Spotted Wing Drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), a fruit pest new to North America. http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/ento/drosophila_suzukii.html [accessed on Feb 2010].

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–80.

Toda MJ, 1991. Drosophilidae (Diptera) in Myanmar (Burma) VII. The *Drosophila melanogaster* species-group, excepting the *D. montium* species-subgroup. Orient. Insects. 25, 69–94.

Vander Linde K, Steck GJ, Hibbard K, Birdsley JS, Alonso LM, Houle D, 2006. First records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pest species on commercial fruits from Panama and the United States of America. Fla. Entomol. 89, 402–404.

Vilela CR, 1999. Is *Zaprionus indianus* Gupta 1970 (Diptera: Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? Drosoph. Inf. Serv. 82, 37–39.

Yamakawa R, Watanabe K, 1991. Control and ecology of cherry *Drosophila*. Tohoku Nogyo Kenkyu (Tohogu Agric. res.) 44, 221–222.

Yang Y, Zhang Y, Qian Y, Zeng Q, 2004. Phylogenetic relationships of *Drosophila melanogaster* species group deduced from spacer regions of histone gene H2A-H2B. Mol. Phylogenet. Evol. 30, 336–343.

Yassin A, Capy P, Madi-Ravazzi L, Ogereau D, David JR, 2008. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. Mol Ecol Resour. 8, 491–501.

Author's personal copy

Journal of Thermal Biology 37 (2012) 432–437

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Thermal Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtherbio

Measurement error in heat tolerance assays

Luis E. Castañeda [a,b,*], Gemma Calabria [c], Luz A. Betancourt [a], Enrico L. Rezende [a], Mauro Santos [a]

[a] Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Biologia Evolutiva (GBE), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona) 08193, Spain
[b] Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile
[c] Departament de Genètica, Grup de Biologia Evolutiva (GBE)/Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 January 2012
Accepted 19 March 2012
Available online 21 April 2012

Keywords:
Measurement reliability
Measurement error
Intraclass correlation
Concordance correlation coefficient
Thermal limits
Thermotolerance

ABSTRACT

Biological measurements inherently involve some measurement error (ME), which is a major concern because measurement accuracy (how closely a measurement reproduces the true value of the attribute being measured) and statistical power steadily decrease with increasing ME. However, ME has been largely overlooked in the thermal biology literature, which can be explained by the fact that thermotolerance estimates often involve the collapse or death of the tested individuals and measurements cannot be repeated in vivo with the same specimen under identical conditions. Here we assess inter- and intra-researcher (test-retest) reliability of heat tolerance measured as knockdown time from digital recordings of *Drosophila subobscura* flies individually assayed in vials with a dynamic method. We provide a summary of various estimators used to compute measurement reliability (the degree to which the measurement is affected by ME) together with their statistical properties. Our results indicate that the estimation of heat knockdown time has poor reliability: intra-researcher ME=29% and inter-researcher ME=34%. This difference is attributed to lack of 'accurateness' (the difference in the marginal distributions of the measurements taken by the two researchers) because measurement imprecision was essentially the same in both estimates (27%). In view of our results we conclude that thermal biologists should report the reliability of thermotolerance estimates and, when necessary, adopt some straightforward guidelines suggested here to improve measurement reliability.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Spatiotemporal variation in environmental temperature is a key determinant of fitness because it imposes limits to organisms' performance (Huey and Kingsolver, 1989; Huey and Hertz, 1983; Angilletta, 2009). Therefore, thermal biologists have long been concerned with estimating thermal limits; in particular, obtaining reliable estimates of upper thermal limits is currently pressing in view of the ongoing effect of global warming in biological systems (Deutsch et al., 2008; Pörtner and Farrell, 2008; Huey et al., 2009). Heat tolerance can be quantified by subjecting the study organism to a constant stressful temperature and record the time to death (static method) or by gradually increasing the test temperature until the end-point is reached (dynamic method or 'CT_{max} method'; Lutterschmidt and Hutchinson, 1997). As all other estimators, these estimators of heat tolerance will be affected by measurement error (ME; defined as the variability of repeated measurements of a trait taken on the same individual that is solely a function of the investigator), which is a subject of major concern in various areas of biology; for instance, in analyses of morphometric data (Bailey and Byrnes, 1990; Yezerinac et al., 1992; Muñoz-Muñoz and Perpiñán, 2010) or fluctuating asymmetry (Björklund and Merilä, 1997; Palmer and Strobeck, 2003). Conversely, little attention has been paid to the extent of ME in the thermal biology literature possibly because the estimation of heat tolerance involves the collapse or death of the tested individual and measurements cannot be repeated with the same specimen under identical conditions (see also Rezende and Santos, 2012).

This is particularly odd because, contrary to morphological characters, which tend to show the highest repeatabilities (Wolak et al., 2011), the repeatability of heat tolerance is generally low (about 0.2; Krebs and Loeschcke, 1997). Therefore, whereas ME can be negligible for morphological traits relative to the variability among individuals (with the exception of fluctuating asymmetry because differences between sides are often very small) it might be substantial for heat tolerance estimates (Santos et al., 2011).

Here we evaluate inter- and intra-researcher reliability (i.e., the extent to which measurements are inherently reproducible or, alternatively, influenced by ME) of heat tolerance, estimated as knockdown time from digital recordings of *Drosophila subobscura* flies individually assayed in vials with a dynamic method.

* Correspondence author. Tel.: +34 93 581 4705; fax: +34 93 581 2387.
E-mail addresses: luiseduardo.castaneda@uab.cat, lecastane@gmail.com (L.E. Castañeda).

0306-4565/$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.03.005

Author's personal copy

We first provide a theoretical background that summarizes several concepts and techniques used to compute reliability. We explain the intraclass correlation coefficient originally proposed by Fisher (1946) and generally applied in biology (Lessells and Boag, 1987; Sokal and Rohlf, 1995, p. 213; Falconer and Mackay, 1996, pp. 145–146), and also discuss other coefficient mainly used in the social and clinical sciences to compute measurement reliability that has better properties than Fisher's coefficient. Finally, we show that the estimation of knockdown time in our assays with *D. subobscura* has poor reliability. This result suggests that ME is an important issue that has been unwarrantedly overlooked in the thermal biology literature.

2. Background theory

Terminology in the area of measurement accuracy is not always consistent; hence here we employ the usage in Hand (2004), which distinguishes between *accuracy*, *validity* and *reliability*. Accuracy is a general term that describes how closely a measurement reproduces the true value of the attribute being measured. This has two aspects: the extent to which a measurement procedure measures what we want to measure (validity, which is similar to bias), and the difference between multiple measures of an attribute (reliability, which is an estimate of the proportion of variation that is not due to ME). Let us assume that heat tolerance is independently estimated by two researchers as the temperature at which each tested individual succumbs to heat stress in a dynamic method (the attribute they want to measure is CT_{max}, defined as 'the maximum temperature that an organism might potentially tolerate given its physiological condition in the absence of any other hazard'; Santos et al., 2011). The records of the first and second researcher on the ith individual (y_{ij}; $i=1,2,\ldots,n$; $j=1,2$) can be modeled as follows:

$$y_{ij} = \tau_i + b_i + \varepsilon_{ij}, \tag{1}$$

where τ_i is the 'true value' (CT_{max}) of the individual that would be observed with a perfect measurement procedure (assuming one exists), b_i is the difference between the expected value obtained from the actual experimental protocol and the true value (bias), and ε_{ij} is the error of measurement. However, here we are mainly concerned about ME, or how reproducible measurements between researchers are when they involve the same tested individual under identical conditions (inter-researcher reliability or agreement), and no notion of 'true value' is needed in this case. Reliability can be estimated in several ways, one of which involves calculating the intraclass correlation coefficient (ICC) as originally defined by Fisher (1946) (see Lessells and Boag, 1987; Sokal and Rohlf, 1995, p. 213).

We can redefine Eq. (1) as follows:

$$y_{ij} = \delta_i + \varepsilon_{ij}, \tag{2}$$

where δ_i is the actual thermotolerance of the ith individual, which is taken to be the expectation of y_{ij} over the population of possible measurements for the ith individual. It follows that the expectation of the ME is zero; that is, $E_j(\varepsilon_{ij})=0$. Assuming that ME between researchers are independent and have constant variance, and that ME is also independent of the actual knockdown temperature or time, we have:

$$Var(y_{ij}) = \mathrm{Var}(\delta_i) + \mathrm{Var}(\varepsilon_{ij}). \tag{3}$$

The inter-researcher reliability can then be estimated as follows:

$$\mathrm{ICC} = \frac{\mathrm{Var}(\delta_i)}{\mathrm{Var}(\delta_i)+\mathrm{Var}(\varepsilon_{ij})} = 1 - \frac{\mathrm{Var}(\varepsilon_{ij})}{\mathrm{Var}(\delta_i)+\mathrm{Var}(\varepsilon_{ij})} = 1 - \mathrm{ME}, \tag{4}$$

(See Appendix A for the estimation of the variance and confidence intervals for ICC).

Because the intraclass covariance (i.e., the covariance between the pair of measurements in the same individual) is $\mathrm{Cov}(y_{i1},y_{i2}) = \mathrm{Var}(\delta_i)$, it immediately follows that ICC is equal to the Pearson correlation coefficient ρ. However, this assumes that the δ_i are the same within each pair of repeated measurements, otherwise $\mathrm{ICC} \neq \rho$ (see below). Eq. (4) contains an important point that is particularly relevant for heat tolerance estimates. ICC and, hence, ME are not invariant to the particular method we use to estimate heat resistance because $\mathrm{Var}(\delta_i)$ will depend on the conditions of the assay. For instance, Chown et al. (2009) found that different heating rates in dynamic assays result in different phenotypic variances for knockdown temperature. If we assume that $\mathrm{Var}(\varepsilon_{ij})$ will be the same whatever the heating rate, ME will be larger when the variance in knockdown temperatures is smaller.

An alternative method to measure inter-researcher agreement is to use the concordance correlation coefficient CCC (Lin, 1989, 1992; Lin et al., 2002):

$$\mathrm{CCC} = \frac{2\mathrm{Cov}(y_{i1},y_{i2})}{\mathrm{Var}(y_{i1})+\mathrm{Var}(y_{i2})+(\overline{y_{i1}}-\overline{y_{i2}})^2} \tag{5}$$

where $\mathrm{Var}(y_{i1})$ [$\mathrm{Var}(y_{i2})$] is the variance of measurements taken by researcher 1 (2), and $\overline{y_{i1}}$ ($\overline{y_{i2}}$) is the average. CCC can also be written as follows:

$$\mathrm{CCC} = \chi_a \rho;$$

$$\chi_a = \frac{2}{w + 1/w + v^2},$$

$$w = \sqrt{\frac{\mathrm{Var}(y_{i1})}{\mathrm{Var}(y_{i2})}}, \quad v^2 = \frac{(\overline{y_{i1}}-\overline{y_{i2}})^2}{\sqrt{\mathrm{Var}(y_{i1})\mathrm{Var}(y_{i2})}} \tag{6}$$

where w is the scale shift that causes an angle deviation from the expected 45° line through the origin (assuming ME is absent) in the x–y coordinate plot of measurements, v is the location shift relative to the scale that places the expected 45° above or below the origin, and ρ is the Pearson correlation coefficient (Lin, 1989; Lin et al., 2002). CCC is closely related to ICC but has the advantage over ICC that CCC clearly decomposes the inter-researcher agreement in two components: inter-researcher 'accurateness' χ_a (i.e., the extent to which the marginal distributions of the measurement in the two researchers are equal) and inter-researcher precision (i.e., the Pearson correlation coefficient between the measurements of the two researchers). Inter-researcher accurateness χ_a is equal to one if and only if both means and variances are equal. In this case $\mathrm{ICC}=\mathrm{CCC}=\rho$. Overall ME is estimated as 1-CCC, but we can also have an idea where the main ME comes from (i.e., inter-researcher lack of accurateness or lack of precision). Expressions to estimate the variance and confidence intervals of CCC are given in Appendix A.

We can now understand why the use of ICC to compute reliability or agreement has been objected (Lin, 1989): whenever there is a shift in scale and/or location ICC captures these deviations and considers them as imprecision. However, we still retain the use of ICC because (i) its performance is very similar to that of CCC; (ii) in the biological sciences it is customary to employ ICC, and required sample sizes to obtain an estimate with the confidence interval width as small as possible are known (Bonett, 2002; see also figure 3 in Wolak et al. (2011)); and (iii) one problem with CCC is that it cannot evaluate agreements among more than two readings on the same individuals, whereas the standard one-way ANOVA used to compute ICC (Sokal and Rohlf, 1995, p. 213) is readily generalized to any number of researchers.

Author's personal copy

3. Material and methods

The *D. subobscura* flies used in this study originated from a laboratory stock established from wild flies collected near Barcelona (41°43′N, 2°13′E) in October 2007. The stock was maintained in bottle culture at 18 °C (12:12 light/dark cycle). Heat tolerance was measured on 120 flies individually placed in capped 5-mL glass vials and randomly allocated in two 4(files) × 15(columns) racks. Each rack was immersed in a $46 \times 35 \times 35$ cm^3 Plexiglas tank filled with ~40 L of water. The temperature of the water in the tank was controlled by a programmable heating unit (JULABO ED, JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Germany) that also ensured proper water circulation. The start temperature for the dynamic assay was $T_0=24$ °C. After an equilibration period of 10 min, temperature was increased at a rate $\Delta T=0.6$ °C min^{-1}. A thermocouple was placed in the water tanks and the flies were video-recorded during the assays with a digital HD video camera (SONY HDR-CX110E, Tokyo, Japan).

To assess inter-researcher reliability we first asked two coauthors (R1 and R2) to estimate knockdown times from the video-recorded flies. The coauthors did not know each other's identity and were instructed to estimate knockdown times as the time at which flies loss righting ability and ceased to move. Knockdown time provides a comparable estimate to knockdown temperature because they are co-linear in the dynamic method (see Rezende et al., 2011). Five weeks after the first measurements we asked R1 to estimate knockdown times again to assess intra-researcher reliability or test-retest reliability.

4. Results and discussion

4.1. Inter- and intra-researcher reliability or agreement

Table 1 (flies 1–60) and Table 2 (flies 61–120) give the knockdown times estimated by R1 (at times t_1 and t_2) and R2 (fly 113 was removed from the data set because it was apparently damaged during handling). The results are plotted in Fig. 1(a) (inter-researcher reliability; R1 at time t_1 vs. R2) and (b) (intra-researcher reliability; R1 at time t_1 vs. R1 at time t_2). Mean knockdown times estimated by R1 were on average higher than those estimated by R2 ($\overline{y_{i1(\mathrm{time}t1)}}=21.26$ min, $\overline{y_{i2}}=20.68$ min), and the difference was statistically significant ($F_{1,236}=10.28$, $P=0.002$). This implies that the inter-researcher ICC will capture this difference as imprecision and will be lower than the Pearson correlation coefficient (see Table 3), which ignores the inter-researcher accurateness component. For this reason, the use of CCC is preferable here. On the other hand, R1 estimated approximately the same average knockdown time in the two records ($\overline{y_{i1(\mathrm{time}t2)}}=21.54$ min; $F_{1,236}=1.75$, $P=0.187$). No heterogeneity of variances was detected between inter- [$\mathrm{Var}(y_{i1(\mathrm{time}t1)})2.10$ min^2, $\mathrm{Var}(y_{i2})=1.81$ min^2; Levene's $F_{1,236}=0.50, P=0.481$] and intra-researcher [$\mathrm{Var}(y_{i1(\mathrm{time}t2)})=2.89$ min^2; Levene's $F_{1,236}=0.26$, $P=0.611$] measurements.

Agreement statistics together with the 95% confidence limits are given in Table 3 (equations employed to calculate confidence intervals for ICC and CCC are provided in Appendix A). Inter-researcher ME (estimated as 1-ICC) was 34%, which is not substantially higher than the intra-researcher ME (29%). Importantly, inter- and intra-researcher precision was essentially the same ($\rho=0.73$) and the main difference between researchers was in the accurateness component, which reflects the difference between the average knockdown times estimated by both researchers (location shift relative to scale: $v=-0.4162$).

To sum up, our analyses suggest that the imprecision of heat tolerance estimates is substantial and will be about the same no

Table 1
Knockdown time (*kt* in min) of flies 1–60 measured by two researchers (R1, R2) to estimate inter-researcher agreement, or measured by the same researcher (R1) in two different times to estimate intra-researcher agreement.

Fly no.	First *kt* (R1 − t_1)	*kt* (R2)	Second *kt* (R1 − t_2)	Fly no.	First *kt* (R1 − t_1)	*kt* (R2)	Second *kt* (R1 − t_2)
1	23.27	21.5	23.27	31	21.53	21.55	22.07
2	21.9	19.68	20.53	32	21.58	21.58	22.55
3	21.55	19.42	21.57	33	21.82	21.83	21.82
4	23.03	22.33	23.07	34	21.47	20.17	21.37
5	21.68	20	22.05	35	19.47	19.58	21.95
6	22.33	21.33	22.32	36	20.7	20.72	20.73
7	23.3	21.85	23.98	37	20.42	20.45	20.45
8	22.12	21.68	21.97	38	20.68	20.25	20.6
9	21.7	21.67	21.72	39	22.25	22.28	22.27
10	22.27	22.3	22.28	40	19.2	18.72	18.67
11	22.15	22.18	22.18	41	20.63	20.28	27.08
12	20.18	20.23	20.18	42	24.97	23.1	25.17
13	20.2	20.27	21.93	43	21.7	20.62	20.75
14	22.45	20.22	22.47	44	23.62	23.12	23.45
15	21.65	22.37	21.62	45	20.6	20.42	20.55
16	23.13	20.85	23.17	46	20.3	20.07	19.93
17	19.02	19.05	21.38	47	20.83	20.72	21.48
18	22.22	20.32	20.65	48	20.55	18.5	20.57
19	20.8	20.82	20.8	49	21.57	19.78	21.42
20	20.78	20.17	20.97	50	20.83	20.77	20.78
21	20.12	20.12	20.12	51	22.55	19.72	22.13
22	24	20.13	24	52	20.33	20.37	20.33
23	21.13	21.15	21.15	53	15.93	15.97	15.95
24	21.77	21.78	22.37	54	15.05	15.1	15.07
25	22.15	21.88	22.13	55	22.32	21.32	22.3
26	22.45	22.47	22.92	56	21.57	21.57	21.63
27	22.23	22.17	22.17	57	18.17	18.37	18.2
28	22.85	21.32	22.52	58	20.02	20.05	20.05
29	21.88	21.37	22.08	59	21.13	21.18	20.87
30	21.65	21.68	21.65	60	20.13	20.15	20.15

Table 2
Knockdown time (*kt* in min) of flies 61–120 measured by two researchers (R1, R2) to estimate inter-researcher agreement, or measured by the same researcher (R1) in two different times to estimate intra-researcher agreement.

Fly no.	First *kt* (R1 − t_1)	*kt* (R2)	Second *kt* (R1 − t_2)	Fly no.	First *kt* (R1 − t_1)	*kt* (R2)	Second *kt* (R1 − t_2)
61	23.22	19.1	23.2	91	22.23	22.35	22.25
62	23.58	21.12	21.08	92	23.9	23.42	23.88
63	24.08	22.03	24.08	93	20.78	20.82	20.8
64	23.68	21.23	23.68	94	20.63	20.6	20.63
65	22.52	20.28	22.68	95	20.32	20.02	22.35
66	20.28	20.15	20.38	96	20.95	20.98	21.4
67	21.35	21.42	21.37	97	21.78	21.97	21.77
68	20.55	19.65	20.55	98	22.3	22.23	22.38
69	21.33	20.92	21.35	99	21.03	21.13	21.03
70	21.72	23.58	21.73	100	22.53	22.53	22.52
71	20.38	20.4	20.38	101	19.47	19.53	19.47
72	20.67	20.7	20.67	102	19.57	19.52	20.23
73	20.92	20.97	29.27	103	21.58	20.88	23.27
74	19.95	19.08	19.97	104	20.68	19.42	20.68
75	22.95	20.78	22.92	105	21.72	21.48	21.75
76	21.7	21.72	21.7	106	21.9	22.05	22.52
77	21.02	20.42	20.88	107	20.18	20.23	24.53
78	21.1	20.62	20.57	108	18.58	18.07	19.82
79	20.6	19.8	20.55	109	20.13	20.23	20.82
80	20.97	20.82	20.98	110	22.08	20.93	23.07
81	20.65	20.07	21.28	111	21.77	21.8	21.78
82	19.35	19.2	19.67	112	21.8	21.85	21.93
83	19.48	19.22	19.78	113	–	–	–
84	21.75	21.2	21.77	114	20.55	20.62	21.3
85	20.38	20.4	20.57	115	19.68	19.57	19.72
86	22.13	21.47	22.13	116	22.07	22.12	22.05
87	19.25	18.87	18.68	117	21.7	20.92	21.7
88	21.88	21.92	21.88	118	21.58	21.22	21.58
89	21.75	21.8	21.75	119	22.42	16.75	22.3
90	19.2	19.25	19.2	120	20.35	19.35	20.97

Author's personal copy

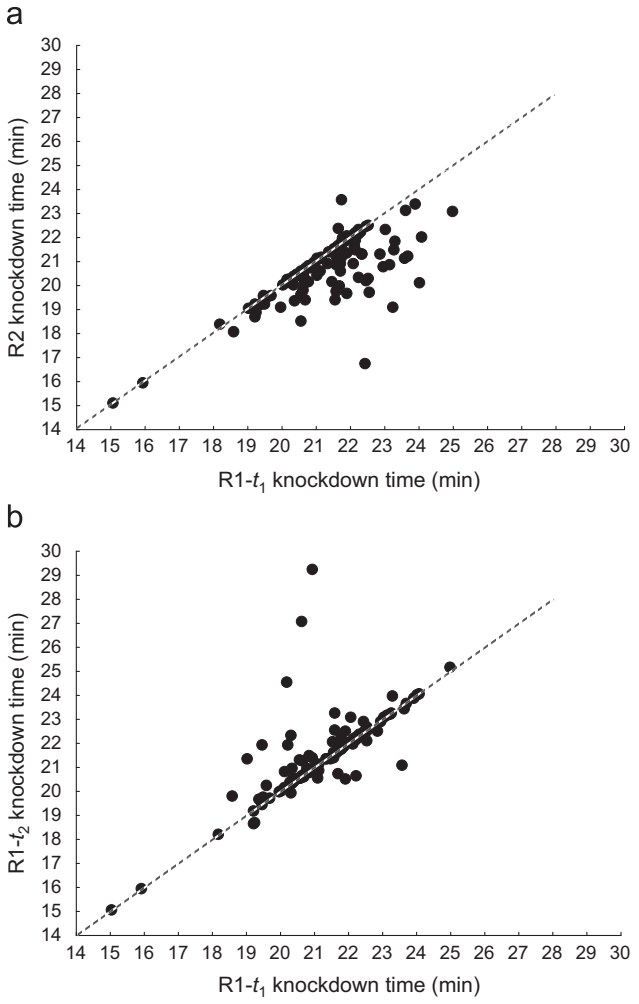


Fig. 1. Comparison of knockdown times (min) estimated by (a) R1 at time t_1 vs. R2 to assess inter-researcher reliability or agreement and (b) R1 at time t_1 vs. R1 at time t_2 to assess intra-researcher (test-retest) reliability. The dotted line in each plot indicates equality (perfect agreement) between estimates of knockdown times.

matter whether repeated measurements are taken by the same researcher or by two independent researchers.

4.2. Obtaining more accurate estimates

Suppose the first researcher (R1) is worried by the low precision of his/her estimates of heat tolerance and wants to increase measurement 'accuracy' (i.e., to obtain better estimates of the 'true' knockdown times). The immediate question is: how many measurements k should R1 take from each individual to minimize ME? It is evident that δ_i in Eq. (2) will be better estimated the higher is the number of measurements on each individual, but a proper determination of k is important to avoid a wasteful use of resources or time. An answer to this question is provided by recurring to the so-called 'Spearman–-Brown prophecy formula' (Lord and Novick, 1968; Winer, 1971; Hand, 2004), which allows obtaining the reliability of the mean of k replicated measurements as follows:

$$\rho_k = \frac{k \times \mathrm{ICC}}{(k-1)\mathrm{ICC}+1}. \quad (7)$$

Eq. (7) is an adjusted upward for the number of measurements on each fly, where ICC is the intraclass correlation coefficient that provides an index of reliability for a single measurement.

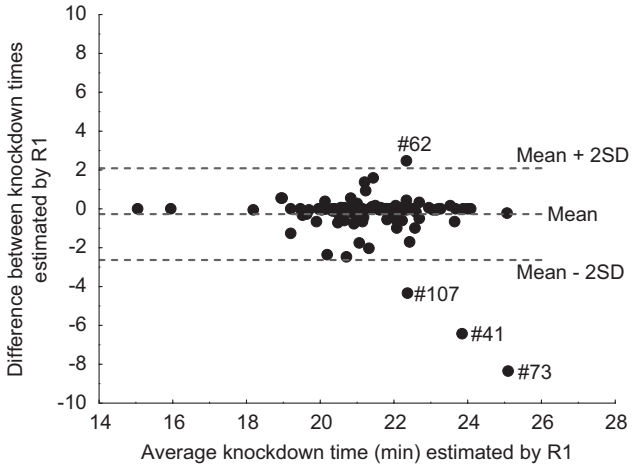


Fig. 2. Bland and Altman (1986) agreement test to assess 95% limits of agreement (mean ± 2SD). The test is applied to the repeated measurements taken by R1 at two time intervals, and the labels refer to those flies in Tables 1 and 2 that appear as outliers due to erroneous measurements or data entry mistakes (see text for further details).

More specifically, assume R1 wants measurement error to be ME ≤ 0.10 (i.e., $\rho_k \geq 0.90$). Solving Eq. (7) for k we have:

$$k \geq \frac{0.90(1-\mathrm{ICC})}{\mathrm{ICC}(1-0.90)}. \quad (8)$$

As ICC = 0.71 (intra-researcher agreement in Table 3), R1 should take $k = 4$ measurements for each fly. If R1 adopts this strategy he/she can report that the reliability of heat tolerance (estimated as the average of $k = 4$ measurements) is $\rho_k = 0.91$. However, it will always be prudent to conduct a reliability analysis to verify that this is indeed the case (Lachin, 2004).

Although increasing the number of measurement per fly is an obvious approach to improve reliability, it is always convenient to check for outliers due to erroneous measurements or data entry mistakes in the data set. Thus, a close inspection of Fig. 1(b) shows that most measurements fall close to the 45° line through the origin but there are a few points that substantially deviate from this line. R1 may then use Bland and Altman (1986) agreement test to provide 95% limits of agreement. The test works as follows. First, the differences between the two measurements taken by R1 are plotted against their average. Second, the mean and standard deviation of the differences between measurements are calculated. Third and finally, 95% limits of agreement (mean difference plus minus two standard deviations of the differences) are calculated and plotted. This approach is shown in Fig. 2. It is clear that most ME comes from the repeated measurements on flies 41, 73, 107 and, to a lesser extent, fly 62. If the first three flies are removed from the analysis measurement reliability considerably increases (ICC = 0.9116; 95% confidence limits: 0.8751–0.9378).

To sum up, plotting the data as in Fig. 2 has the advantage that they can be visually interpreted and the presence of outliers easily observed. If necessary, a desired level of reliability can be obtained by estimating the number of replicated measurements on each individual from the Spearman–-Brown formula (Eq. (7)).

5. Conclusions

Assessing measuring reliability is important because inferences from statistical analysis and estimates of underlying causal variance components depend directly on the reliability coefficient. For instance, if narrow sense heritability is estimated from

Author's personal copy

the regression of offspring on parents the least square regression coefficient would be attenuated toward zero as a function of the reliability by which the parental phenotype is measured (Fuller, 1987). The issue of reliability is even more pressing when dealing with physiological or behavioral traits that apparently have low repeatabilities (Wolak et al., 2011). The variance resulting from ME will render estimates of repeatability that are also downwardly-biased (Lynch and Walsh, 1998) and the question is to what extent these traits have an inherently low repeatability or are measured with a higher ME than morphological characters. Furthermore, even if there was a perfect measurement procedure that estimates the 'true' value of the trait we want to measure, it can be readily shown that measurement validity cannot be higher than measurement reliability (Lachin, 2004). Therefore, estimates that are unreliable are also invalid.

A search in ISI Web of Science using as a search criterion several combinations of the key words 'measurement error', 'reliability', 'thermotolerance', 'heat tolerance', 'heat resistance', 'cold tolerance', 'cold resistance' or 'cold hardiness' only retrieved one relevant paper that reports repeatability of heat tolerance in *Drosophila buzzatii* but not measurement reliability (Krebs and Loeschcke, 1997). Thus, it seems that no single paper to date has computed the reliability or measurement error of thermotolerance estimates (for estimates of measurement error on other traits, see Wolak et al., 2011). Our results have demonstrated that the estimation of knockdown time has poor reliability even when the investigators are provided with digital video recordings of assayed individuals, which could be expected to be more precise than the direct 'in vivo testing'. Some readers might object that the low reliability reported here can be due to a poor training of the people involved in assessing knockdown times. This is not the case. We unveil that R1 in Tables 1 and 2 is L. E. Castañeda, who is a well-trained ecophysiologist that has published several papers working with aphids, crickets, isopods, tadpoles, swans and flies (http://www.researcherid.com/rid/G-5340-2011). It seems safe to conclude that measurement error in studies of thermotolerance as performed here is in the order of 30% for *D. subobscura* (and possibly for other *Drosophila* and insects measured with a similar procedure). Note however that %ME depends on the relative size of the variance of 'true' knockdown times (see Table 3).

Finally, for laboratory measurements it seems that a good practice would be to have a reliability coefficient of 0.90 or higher. If the reliability of single thermotolerance estimates is low, then sample size requirements will need to be larger to assess meaningful differences between groups because statistical power decreases with decreasing reliability (figure 3 in Lachin (2004)). We suggest that it should be common practice to include an analysis of reliability in thermotolerance assays. This would help to appraise the quality of the data collected in comparative studies (e.g., Sunday et al., 2011; for issues related to the *validity* of heat tolerance estimates, see Lutterschmidt and Hutchinson, 1997; Santos et al., 2011), understand possible sources of error that could explain negative or contradictory results, and allow researchers to determine proper sample sizes in the design of future studies.

Table 3
Agreement statistics and their confidence limits for knockdown times in Tables 1 and 2.

Statistics	Estimate	95% confidence limits
Inter-researcher agreement		
ICC	0.6614	0.5478, 0.7511
CCC	0.6732	0.5648, 0.7587
accurateness χ_a	0.9179	
precision ρ	0.7334	
Intra-researcher agreement		
ICC	0.7095	0.6082, 0.7880
CCC	0.7096	0.6100, 0.7871
accurateness χ_a	0.9732	
precision ρ	0.7291	

Acknowledgments

We thank Joel Kingsolver for his constructive criticisms on an earlier draft that helped to improve the paper. L. E. Castañeda is supported by a Juan de la Cierva fellowship (JCI-2010-06156) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). G. Calabria is supported by a pre-doctoral fellowship (BES-2007-15096) from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). E. L. Rezende is supported by a Ramón y Cajal contract and by grant BFU2009-07564 from the Ministerio de Ciencia e Innovación. M. Santos is supported by grant CGL2010-15395 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and by the ICREA Acadèmia program. Financial support by grant 2009SGR 636 from Generalitat de Catalunya to the Grup de Biologia Evolutiva is also gratefully acknowledged.

Appendix A. Confident limits for reliability coefficients

In the special case of duplicate measurements considered here the variance of Fisher's (1946) intraclass correlation coefficient ICC is estimated as follows (Lachin, 2004):

$$\mathrm{Var(ICC)} = \frac{(1-\mathrm{ICC})^2}{2}\left(\frac{(1+\mathrm{ICC})^2}{n} + \frac{(1-\mathrm{ICC})(1+3\times\mathrm{ICC})+4\times\mathrm{ICC}^2}{n-1}\right), \tag{A.1}$$

where n is the sample size. From Eq. (A.1) confidence intervals $(\mathrm{ICC}_L,\mathrm{ICC}_U)$ can be estimated as follows (Lachin, 2004; a SAS macro is provided by Lu and Shara (2007)):

$$(\theta_L,\theta_U) = \tfrac{1}{2}\ln\left(\tfrac{1+\mathrm{ICC}}{1-\mathrm{ICC}}\right) \pm \tfrac{Z_{1-\alpha/2}\sqrt{\mathrm{Var(ICC)}}}{(1+\mathrm{ICC})(1-\mathrm{ICC})},$$

$$(\mathrm{ICC}_L,\mathrm{ICC}_U) = \frac{e^{2(\theta_L,\theta_U)}-1}{e^{2(\theta_L,\theta_U)}+1}, \tag{A.2}$$

where $Z_{1-\alpha/2}$ is the point on a standard normal distribution exceeded with probability $\alpha/2$ (e.g., $Z_{1-\alpha/2}=1.96$ for $\alpha=0.05$).

The variance of the concordance correlation coefficient (CCC) is as follows (Lin, 1989):

$$Var(\mathrm{CCC}) = \frac{1}{n-2}\left(\frac{(1-\rho^2)\mathrm{CCC}^2(1-\mathrm{CCC}^2)}{\rho^2} + \frac{4\mathrm{CCC}^3(1-\mathrm{CCC})v^2}{\rho} - \frac{2\mathrm{CCC}^4v^4}{\rho^2}\right), \tag{A.3}$$

where ρ is the Pearson correlation coefficient. Confidence intervals for CCC can also be approximated from Eq. (A.2) after replacing ICC by CCC, and Var(ICC) by Var(CCC).

References

Angilletta, M.J., 2009. Thermal Adaptation. A Theoretical and Empirical Synthesis. Oxford University Press, New York.
Bailey, R.C., Byrnes, J., 1990. A new, old method for assessing measurement error in both univariate and multivariate morphometric studies. Syst. Zool. 39, 124–130.
Bland, J.M., Altman, D.G., 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet i, 307–310.
Björklund, M., Merilä, J., 1997. Why some measures of fluctuating asymmetry are so sensitive to measurement error. Ann. Zool. Fenn. 34, 133–137.
Bonett, D.G., 2002. Sample size requirements for estimating the intraclass correlations with desired precision. Statist. Med. 21, 1331–1335.
Chown, S.L., Jumbam, K.R., Sørensen, J.G., Terblanche, J.S., 2009. Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. Funct. Ecol. 23, 133–140.

Author's personal copy

Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C., Martin, P.R., 2008. Impacts of climatic warming on terrestrial ectotherms across latitude. Proc. Nat. Acad. Sci. 105, 6668–6672.
Falconer, D.S., Mackay, T.F., 1996. Introduction to quantitative genetics, 4th edn. Longman, Essex, England.
Fisher, R.A., 1946. Statistical Methods for Research Workers, 3rd edn. Oliver and Boyd, Edinburgh.
Fuller, W.A., 1987. Measurement Error Models. John Wiley and Sons, New York.
Hand, D.J., 2004. Measurement Theory and Practice. The World through Quantification. John Wiley & Sons, Chichester, U.K.
Huey, R.B., Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Vitt, L.J., Hertz, P.E., Álvarez Pérez, H.J., Garland Jr., T., 2009. Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. Proc. R. Soc. B: Biol. Sci. 276, 1939–1948.
Huey, R.B., Hertz, P.E., 1983. Is a jack-of-all-temperatures a master of none? Evolution 38, 441–444.
Huey, R.B., Kingsolver, J.G., 1989. Evolution of thermal sensitivity of ectotherms performance. Trends Ecol. Evol. 4, 131–135.
Krebs, R.A., Loeschcke, V., 1997. Estimating heritability in a threshold trait: heat-shock tolerance in *Drosophila buzzatii*. Heredity 79, 252–259.
Lachin, J.M., 2004. The role of measurement reliability in clinical trials. Clin. Trials 1, 553–566.
Lessells, C.M., Boag, P.T., 1987. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. The Auk 104, 116–121.
Lin, L.I., 1989. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. Biometrics 45, 255–268.
Lin, L.I., 1992. Validation using the concordance correlation coefficient. Biometrics 48, 599–604.
Lin, L., Hedayat, A.S., Sinha, B., Yang, M., 2002. Statistical methods in assessing agreement: models, issues, and tools. J. Am. Stat. Assoc. 97, 257–270.
Lord, F.M., Novick, M.R., 1968. Statistical Theories of Mental Test Scores. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts.
Lu, L., Shara, N., 2007. Reliability analysis: calculate and compare intra-class correlation coefficients (ICC) in SAS. Northeast SAS Users Group, 14.
Lutterschmidt, W.I., Hutchinson, V.H., 1997. The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. Can. J. Zool. 75, 1553–1560.
Lynch, M., Walsh, B., 1998. Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
Muñoz-Muñoz, F., Perpiñán, D., 2010. Measurement error in morphometric studies: comparison between manual and computerized methods. Ann. Zool. Fenn. 47, 46–56.
Palmer, A.R., Strobeck, C., 2003. Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: Polak, M. (Ed.), Developmental Instability: Causes and Consequences. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K, pp. 279–319.
Pörtner, H.O., Farrell, A.P., 2008. Physiology and climate change. Science 322, 690–691.
Rezende, E.L., Santos, M., 2012. Comment on 'Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures'. J. Exp. Biol. 215, 702–703.
Rezende, E.L., Tejedo, M., Santos, M., 2011. Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: methodological problems and evolutionary implications. Funct. Ecol. 25, 111–121.
Santos, M., Castañeda, L.E., Rezende, E.L., 2011. Making sense of heat tolerance estimates in ectotherms: lessons from *Drosophila*. Funct. Ecol. 25, 1169–1180.
Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry, 3rd.edn. Freeman, New York.
Sunday, J.M., Bates, A.E., Dulvy, N.K., 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. Proc. R. Soc. B 278, 1823–1830.
Yezerinac, S.M., Lougheed, S.C., Handford, P., 1992. Measurement error and morphometric studies: statistical power and observer experience. Syst. Biol. 41. 471–471.
Winer, B.J., 1971. Statistical Principles in Experimental Design, 2nd edn. McGraw-Hill, New York.
Wolak, M.E., Fairbairn, D.J., Paulsen, Y.R., 2011. Guidelines for estimating repeatability. Methods Ecol. Evol. 3, 129–137.

Dolgova et al. BMC Evolutionary Biology 2010, 10:363
http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/363

BMC Evolutionary Biology

RESEARCH ARTICLE Open Access

Genetic constraints for thermal coadaptation in *Drosophila subobscura*

Olga Dolgova[1], Carla Rego[2], Gemma Calabria[3,4], Joan Balanyà[3,4], Marta Pascual[3,4], Enrico L Rezende[1], Mauro Santos[1*]

Abstract

Background: Behaviour has been traditionally viewed as a driver of subsequent evolution because behavioural adjustments expose organisms to novel environments, which may result in a correlated evolution on other traits. In *Drosophila subobscura*, thermal preference and heat tolerance are linked to chromosomal inversion polymorphisms that show parallel latitudinal clines worldwide, such that "cold-climate" ("warm-climate") chromosome arrangements collectively favour a coherent response to colder (warmer) settings as flies carrying them prefer colder (warmer) conditions and have lower (higher) knock out temperatures. Yet, it is not clear whether a genetic correlation between thermal preference and heat tolerance can partially underlie such response.

Results: We have analyzed the genetic basis of thermal preference and heat tolerance using isochromosomal lines in *D. subobscura*. Chromosome arrangements on the O chromosome were known to have a biometrical effect on thermal preference in a laboratory temperature gradient, and also harbour several genes involved in the heat shock response; in particular, the genes *Hsp68* and *Hsp70*. Our results corroborate that arrangements on chromosome O affect adult thermal preference in a laboratory temperature gradient, with cold-climate O_{st} carriers displaying a lower thermal preference than their warm-climate O_{3+4} and O_{3+4+8} counterparts. However, these chromosome arrangements did not have any effect on adult heat tolerance and, hence, we putatively discard a genetic covariance between both traits arising from linkage disequilibrium between genes affecting thermal preference and candidate genes for heat shock resistance. Nonetheless, a possible association of juvenile thermal preference and heat resistance warrants further analysis.

Conclusions: Thermal preference and heat tolerance in the isochromosomal lines of *D. subobscura* appear to be genetically independent, which might potentially prevent a coherent response of behaviour and physiology (i.e., coadaptation) to thermal selection. If this pattern is general to all chromosomes, then any correlation between thermal preference and heat resistance across latitudinal gradients would likely reflect a pattern of correlated selection rather than genetic correlation.

Background

Ectotherms exhibit a suite of behavioural and physiological strategies to cope with spatiotemporal variation in ambient temperature [1]. For instance, behavioural adjustments (e.g. modifying daily activity patterns and selecting favourable microclimates; [2]) can buffer the impact of sub-optimal temperatures, and are the main means of thermoregulation in small insects [3-5]. Although such adjustments can enable ectotherms to maintain relatively constant body temperatures (T_b) at different seasons and/or latitudes [2,6], the observation of cyclical seasonal changes in genetic markers putatively related to thermal adaptation [7,8] and the clinal variation in thermal stress tolerance in some *Drosophila* species [9-11] suggest that behavioural thermoregulation may be insufficient to fully compensate shifts in environmental temperature [12].

If behavioural thermoregulation is not fully compensatory and climate variation influences the actual T_b and physiological performance of organisms distributed over broad latitudinal ranges (i.e., performance falls below its optimum during cooling and warming), then temperature

* Correspondence: mauro.santos@uab.es
[1]Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Biologia Evolutiva (GBE), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2010 Dolgova et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

is more than just a key environmental factor that affects development, growth, and survival of individuals [13,14]: it is likely the main selective agent that drives - directly or indirectly - the evolution of clinal patterns in genetic, phenotypic, and life history traits. Furthermore, the divergence of thermal optima in the different subpopulations according to the T_b experienced by the organism is expected to bolster a covariance between behavioural shifts (thermal preference) and performance [6,15]. This is related to the idea of "coadaptation" [16], where natural selection is supposed to favour the harmonious adjustment among the suite of (co-)evolving traits [7,17]. Parallel clines on different continents or along independent temperature gradients can thus offer an invaluable opportunity to study thermal coadaptation since the role of temperature in driving those clines is quite compelling.

Some widespread latitudinal clines in *Drosophila* also provide an additional advantage for studies of thermal coadaptation: there is a relatively well-known historical record following the invasion of a new geographical region (e.g. [18,19]). Perhaps the best example is that of *Drosophila subobscura*, a native Palaearctic species that invaded the Americas about 30 years ago, and spread rapidly on both South and North America. Clinal patterns for phenotypic traits and genetic polymorphisms emerged very rapidly during these two independent colonization events [20-22]. For instance, North American populations soon evolved decreased desiccation resistance with increasing latitude as expected, which matches the pattern found in Old World populations and suggests that strong selection for thermal-related traits along latitudinal gradients is taking place. On the other hand, in South America this trait shows the opposite pattern: higher desiccation tolerance is observed in colder areas [23]. Contrasting outcomes were also observed for other clinally varying traits - wing cell size and cell number [24], and wing shape [20,25] - where the role of temperature remains elusive, which apparently suggests that selective pressures vary in the different clines. An alternative explanation, however, is that evolution can sometimes be constrained by antagonistic genetic correlations (i.e., genetic correlations among traits that are not in accord with the direction of selection [26,27]) arising from linkage disequilibrium between alleles at different loci, and patterns of linkage disequilibrium can vary among populations or seasons [28,29]. In this context, we now know that contrasting wing shape clines in *D. subobscura* came out as a correlated response of the world-wide parallel inversion clines [21] because inversion-shape relationships in native and colonizing populations are opposite (presumably due to the different associations between inversions and particular alleles which influence the trait), probably as a result of the bottleneck effect that occurred during the colonization of America [30]. Besides, different patterns of linkage disequilibrium could result from variability in migration rates between genetically differentiated populations in the various latitudinal clines [31]. In summary, conflicting outcomes between old and rapidly evolving new clines should probably not be viewed as a nuisance, but as reminder that an appropriate knowledge of the underlying genetic architecture is required to further understand why (or why not) these inconsistencies arise. More specifically, if behaviour "drives" the subsequent parallel evolution in morphology and physiology as predicted ([6]; but see [32]), it is essential to analyze the genetic basis of thermal preference and temperature-related traits to see whether or not thermal coadaptation can happen along a cline.

We have recently undertaken a within-population large-scale study to analyze the association between chromosomal inversion polymorphisms that show parallel latitudinal clines in native and colonizing populations of *D. subobscura*, with the thermal preferences (T_p: the preferred body temperature in a laboratory thermal gradient, which we expect to correlate with the thermal optimum for performance; [33]) and knock out temperatures (T_{ko}: the temperature required to knock out a fly in a water-bath) of their carriers [34]. The main results can be summarized as follows: (*i*) flies carrying "cold-adapted" or "cold-climate" chromosome arrangements (i.e., those chromosome arrangements in all five major acrocentric chromosomes that show a negative correlation coefficient with maximum temperatures along the cline, or a positive correlation coefficient with latitude in Palaearctic populations; [35,36]) prefer a lower T_p and had a lower T_{ko}, in accordance with the natural patterns; (*ii*) different chromosomes were responsible for the bulk of the genetic variation in T_p (chromosomes A and O) and T_{ko} (chromosome E); and (*iii*) T_p and T_{ko} were phenotypically uncorrelated, which agrees with the observation that different independently segregating chromosomes were mainly responsible for the corresponding associations. Taken at a face value, behavioural thermoregulation and performance were indeed "coadapted" in the sense that cold-climate (warm-climate) chromosome arrangements collectively favour a coherent response to colder (warmer) environments, but this was not due to a genetic covariance of behaviour and physiology. There were, however, two potential limitations in the study. First, each individual fly was scored for only one chromosome of its diploid set and, hence, dominance effects (if any) where hidden in the analysis. Second, both intra- and interchromosomal contributions were mixed because the assayed flies had the genetic background from the sampled wild population. Although it might be argued that this protocol is somehow closer to what happens in nature, these uncontrolled factors might have precluded

a better characterization of the underlying genetic effects. Accordingly, although the amount of genetic variation on T_p and T_{ko} explained by the combined effect of all chromosomes carrying at least one cold-climate gene arrangement was statistically significant, it only accounted for 1% of the total phenotypic variation [34].

Here we examine if T_p and T_{ko} are genetically correlated and might evolve in a coherent fashion in response to selection; i.e., whether behaviour and physiology are coadapted at the genetic level. We take advantage of the fact that the polymorphic inversions on chromosome O appear to be associated with behavioural thermoregulation in *D. subobscura* [34], and that this is the only chromosome that can be used to measure the expression of associated traits in replicated inbred and outbred genotypes. Namely, chromosome O is the only one for which a balancer stock (*Va*/*Ba*: *Varicose*/*Bare*; [37]) is available (a balancer is a specially constructed chromosome that carries a dominant morphological marker that is homozygous lethal and multiple inversions to suppress recombination). This is the longest chromosome in *D. subobscura* (190 cM which correspond to approximately 31 Mb [38]), and is homologous to arm 3R in *D. melanogaster* [39,40]. Some chromosome arrangements (O_{st} and O_{3+4}) show conspicuous northwest-southwest latitudinal clines in Palaearctic populations (Figure 1a). Chromosome O harbours several genes involved in the heat shock response [41]; in particular, gene *Hsp*68 (located in section O(89A) [42,43] and relatively close to the proximal breakpoint of inversion O_8 [44]), and gene *Hsp*70 (located in section O(94A) [42,43] and included inside the warm-climate chromosomal arrangement O_{3+4}, and close to the distal breakpoint of inversion O_8 [44]) (Figure 1b). Hsp70 appears to be the primary protein involved in thermotolerance in *D. melanogaster* [45] - though apparently not in other *Drosophila* species [46] -, and *Hsp70* allele frequencies show latitudinal clines and change in response to thermal evolution in the laboratory [47]. In addition, correlated responses to selection for knock down resistance at 39°C have also been found for *Hsp68* in *D. melanogaster* [48].

Previous work also showed that *D. subobscura* flies carrying O chromosomes derived from replicated thermal lines [49,50] that had evolved in the laboratory at warm temperatures (22°C) had a higher total net fitness than its cold-adapted (13°C) counterparts; that is, a significant shift in thermal optima was observed [51]. All in all, it seems that there is indeed room for the coevolution of behaviour and physiological tolerance in *D. subobscura*. However, we show here that thermal preference and heat tolerance appear to be genetically independent. Therefore, any latitudinal correlation between both traits would likely reflect a pattern of correlated selection across populations rather than within-population genetic correlations.

Experimental settings

In south-western European populations, the most frequent chromosome arrangements for chromosome O are O_{st}, O_{3+4}, O_{3+4+7}, and O_{3+4+8} [52]. The first two arrangements show a clear contrasting clinal pattern in original Palaearctic populations, with O_{st} increasing and O_{3+4} decreasing in frequency with increasing latitude [35,56] (Figure 1a). Arrangement O_{3+4+8} is also interesting because in historical times it was mainly restricted to the Mediterranean region, being the most abundant chromosomal arrangement in northern Africa [53]. However, in the last decades its distribution has changed dramatically and recent surveys revealed frequencies as high as 22.6% in Groningen, Netherlands, where it was previously absent [22,54]. Six independent isochromosomal lines for each of these three arrangements (i.e., $O_j^1,...,O_j^6$; j = st, 3 + 4, 3 + 4 + 8) were used in the present experiments. Extensive genetic differentiation of up to 4 Mb (i.e., about 15% of the euchromatic portion) has been detected among these arrangements [55]. In other words, there are compelling reasons to think that the chromosome arrangements used in this work are genetically differentiated for *Hsp*70, and probably also for *Hsp68* since inversion effects can extend as far as 1000 kilobases outside from breakpoints [56,57].

Following Santos et al. [58] the experimental flies were obtained from 54 crosses, which will be referred to as inbred (isogenic: $O_j^1 \times O_j^1, O_j^2 \times O_j^2, ..., O_j^6 \times O_j^6$ with 18 crosses in total), or as outbred including both structural homokaryotypes ($O_j^1 \times O_j^2, O_j^2 \times O_j^3, ..., O_j^6 \times O_j^1$ with 18 cyclically permuted reciprocal crosses in total) and heterokaryotypes ($O_j^1 \times O_k^1, O_j^2 \times O_k^2, ..., O_j^6 \times O_k^6$; $j \neq k$; with 18 reciprocal crosses in total). Two developmental temperatures were used in the experiment to study potentially important effects of phenotypic plasticity: 18°C and 22°C. The reason for this was the huge difference (about 7°C-8°C) between our previous estimate of T_p (pooled average 16.6°C; [34]) in *D. subobscura* flies raised at 18°C, and that obtained by Huey and Pascual (23.7°C; [12]) where flies were raised at 22°C. Even though the flies assayed came from different sources - south-western Europe in Rego et al. [34], and North America in Huey and Pascual [12] -, which could account for the observed difference because thermal responses can vary between populations [59], it remains to be seen whether developmental plasticity can affect estimates of thermal preference and heat tolerance.

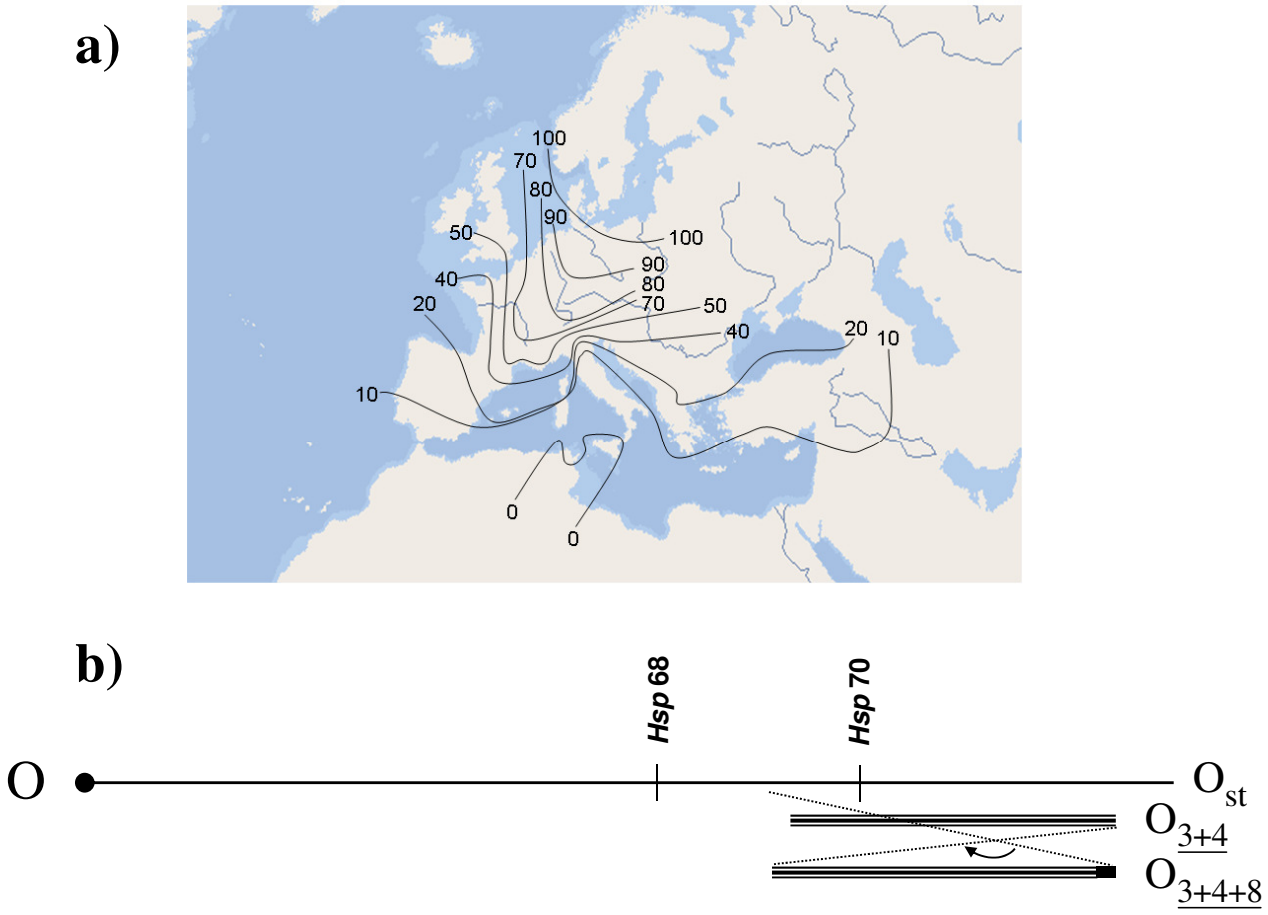


Figure 1 Latitudinal cline of O_{st} gene arrangement and schematic of chromosome O in *Drosophila subobscura*. (a) Lines in the Palaearctic region connect places at which O_{st} depicts similar frequencies, and show a clear northwest-southwest cline (O_{3+4} shows an opposite cline). (b) Approximate location of genes *Hsp*68 and *Hsp*70 on chromosome O. The three gene arrangements used in the experiment are labelled on the right side of the schematic representation, with the centromere placed on the left (solid circle) and the telomere on the right. O_{3+4} consists of two overlapping inversions, and O_{3+4+8} of three.

Results

Association between thermal preference and knock out temperature

The phenotypic correlation between T_p and T_{ko} was assessed from their partial correlation coefficient, holding constant the variables developmental temperature, sex, plate hour, and water bath (see Methods). In no case were the partial correlations statistically significant: inbred crosses $r_{T_p \cdot T_{ko}} = 0.065$, t = 1.21, df = 347, P = 0.226; outbred crosses $r_{T_p \cdot T_{ko}} = -0.030$, t = 0.79, df = 701, P = 0.429. Furthermore, as expected from the low values of the phenotypic correlation, the genetic (karyotypic) correlation for the outbred flies was also close to zero (r_k = -0.068, P = 0.914). The conclusion is that both traits are nearly orthogonal to each other (pooled $r_{T_p \cdot T_{ko}} = 1.2 \times 10^{-4}$, t = 0.004, df = 1054, P = 0.997) and, hence, they will be analyzed separately in what follows.

Consanguinity and developmental effects

a) Thermal preference

Inbreeding and developmental temperature effects on T_p were simultaneously analyzed by contrasting isogenic *vs*. outbred homokaryotypic flies reared at both experimental temperatures (Figure 2). The factorial analysis of covariance (ANCOVA) only detected statistically significant differences for karyotypes, karyotype × inbreeding interaction, and karyotype × developmental temperature interaction effects (Table 1). Average (± SD) T_p was not different between rearing temperatures (flies reared at 18°C: 18.7°C ± 4.1°C; flies reared at 22°C: 18.8°C ± 3.1°C) or

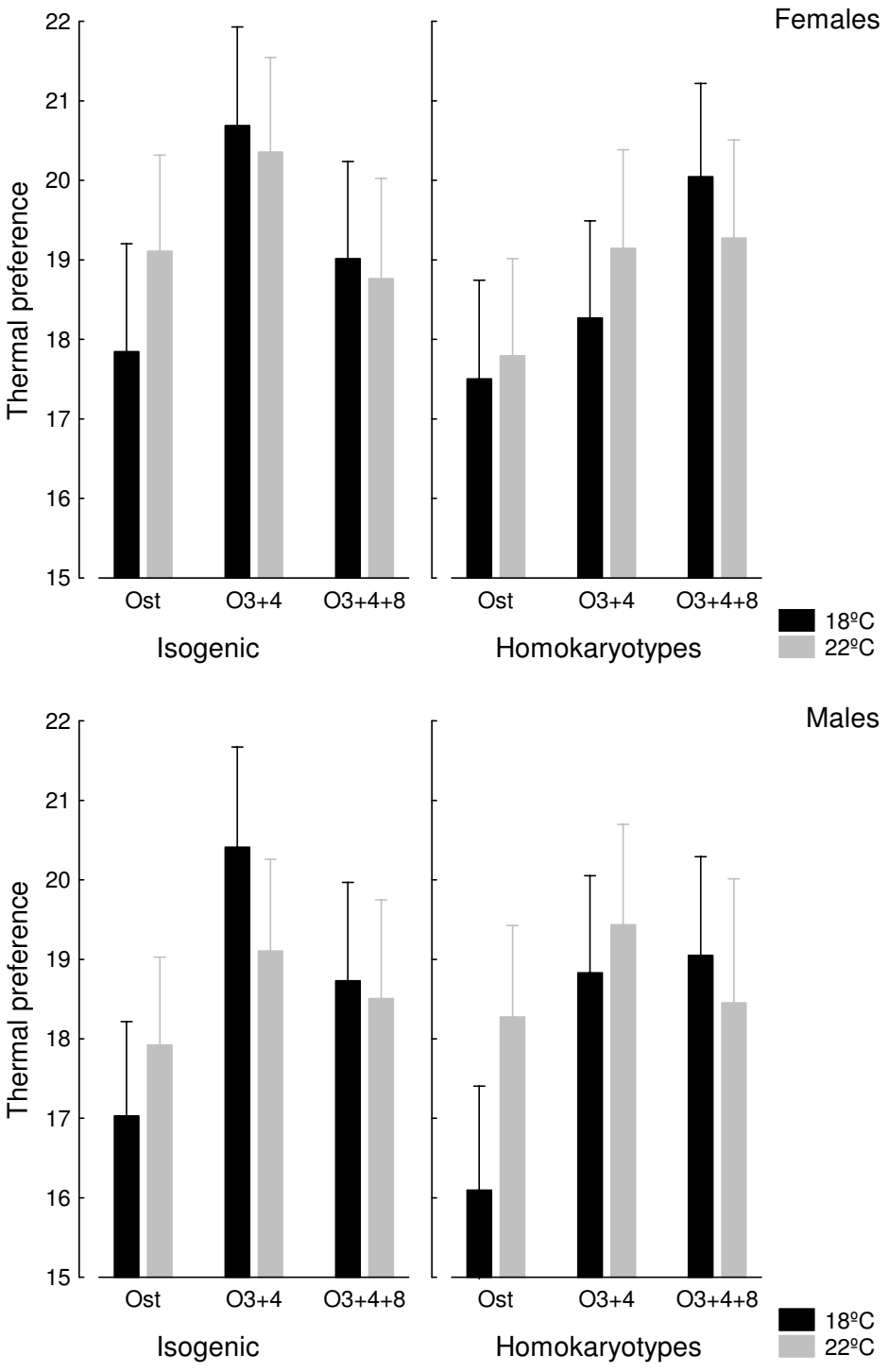


Figure 2 Inbreeding and temperature effects on thermal preference. Homokaryotipic averages for T_p (in °C with 95% confidence intervals) in inbred (left panels) and outbred (right panels) crosses according to sex and developmental temperature.

sexes (females: 19.0°C ± 3.6°C; males: 18.5°C ± 3.6°C), although in this last case the effect was marginally non-significant (P = 0.053). Permutation tests (see Methods) corroborated that the three assayed karyotypes differ in T_p (P = 0.001).

Scheffé post hoc tests using the mean square of the nested "cross" effect as the error term showed that the thermal preference of O_{st}/O_{st} flies was significantly lower when compared to those of O_{3+4}/O_{3+4} and O_{3+4+8}/O_{3+4+8} homokaryotypes, which did not differ between

Table 1 Inbreeding and temperature effects on thermal preference

Source of variation	d.f.	Mean Square	F	P
Covariate (plate hour)	1	25.502	2.07	0.151
Karyotype (κ)	2	231.515	18.29	<0.001
Cross $\subset \kappa$	15	12.676	1.03	0.425
Inbreeding (ι)	1	30.514	2.47	0.116
Temperature (τ)	1	4.119	0.33	0.564
Sex (ς)	1	46.227	3.74	0.053
$\kappa \times \iota$	2	40.337	3.27	0.039
$\kappa \times \tau$	2	40.031	3.24	0.040
$\kappa \times \varsigma$	2	6.195	0.50	0.606
$\iota \times \tau$	1	11.063	0.90	0.344
$\iota \times \varsigma$	1	6.257	0.51	0.477
$\tau \times \varsigma$	1	0.408	0.03	0.856
$\kappa \times \iota \times \tau$	2	17.477	1.42	0.243
$\kappa \times \iota \times \varsigma$	2	11.532	0.93	0.393
$\kappa \times \tau \times \varsigma$	2	7.600	0.62	0.541
$\iota \times \tau \times \varsigma$	1	12.123	0.98	0.322
$\kappa \times \iota \times \tau \times \varsigma$	2	4.245	0.34	0.709
Error	717	12.346		

Flies raised from inbred (isogenic) and outbred crosses of *Drosophila subobscura* reared at 18°C and 22°C. Karyotypes being compared are O_{st}/O_{st}, O_{3+4}/O_{3+4}, and O_{3+4+8}/O_{3+4+8}. ($\subset$ means "nested in".)

them. The difference is consistent for both isogenic and outbred flies (Figure 2). From the present data we can conclude that the preferred temperature ranges or "set point" (T_{set}) ranges (central 50% of preferred body temperatures; [60]) are bounded by 15.1°C - 20.5°C for O_{st}/O_{st} karyotypes, and 16.6°C - 22.2°C for the other two karyotypes.

The karyotype × inbreeding interaction arises from the somewhat different behaviour between O_{st}/O_{st} and O_{3+4}/O_{3+4} karyotypes on one side, and O_{3+4+8}/O_{3+4+8} on the other: for the first two karyotypes T_p was slightly higher in inbred crosses when compared to their outbred counterparts, whereas the opposite was true for the O_{3+4+8}/O_{3+4+8} karyotype. Average T_p was, however, almost identical for inbred (18.9°C ± 3.6°C) and outbred (18.5°C ± 3.6°C) flies. On the other hand, O_{st}/O_{st} flies raised at 22°C had a higher T_p than those raised at 18°C, but no clear trend was observed for O_{3+4}/O_{3+4} and O_{3+4+8}/O_{3+4+8} karyotypes.

b) Knock out temperature

Knock out temperatures are plotted in Figure 3. The ANCOVA (Table 2) detected statistically significant differences for the effects of rearing temperature and sex. Flies reared at 18°C had a higher T_{ko} than flies reared at 22°C (mean ± SD: 33.3°C ± 2.1°C *vs*. 32.6°C ± 2.3°C), and females had a higher T_{ko} than males (33.4°C ± 1.9°C *vs*. 32.5°C ± 2.4°C). Even though T_{ko} was slightly lower for the isogenic lines when compared to their outbred counterparts (32.8°C ± 2.2°C *vs*. 33.1°C ± 2.2°C), inbreeding effects were clearly non-significant (P = 0.136).

Gene arrangement effects in the outbred lines

a) Thermal preference

The genetic and environmental (developmental temperature) contributions of chromosome O to T_p (and T_{ko}; below) was assessed from the outbred crosses including all possible karyotypes. Outbred crosses are obviously more relevant to the real situation because inbred genotypes are homozygous for deleterious alleles, and also for alleles that might display heterozygote advantage in the original outbred population. The only statistically significant effects detected by the ANCOVA model (Table 3) were those arising from genetic differences among karyotypes (permutation tests corroborated that the three assayed karyotypes differ in T_p; $P = 0.0018$) and sexes, with females having a higher T_p (mean ± SD: 18.7°C ± 3.6°C) than males (18.0°C ± 3.6°C). As above, average T_p was slightly lower for flies reared at 18°C (18.1°C ± 4.0°C) than at 22°C (18.6°C ± 3.2°C), but the difference was marginally non-significant ($P = 0.069$).

The linear contrast between the two O_{st}/O^{*}_{3+4} heterokaryotypes (O^{*}_{3+4} pools into a single class the arrangements that share O_{3+4}; see Methods) reveals that O_{st}/O_{3+4} and O_{st}/O_{3+4+8} flies displayed a similar average T_p (18.5°C ± 3.8°C *vs*. 18.0°C ± 3.7°C, respectively). However, some differences were detected among the three O^{*}_{3+4}/O^{*}_{3+4} karyotypes, which can be attributed to some under-dominance because average T_p for O_{3+4}/O_{3+4+8} flies (18.1°C ± 3.4°C) was lower than that for the corresponding homokaryotypes (O_{3+4}/O_{3+4}: 18.9°C ± 3.5°C; O_{3+4+8}/O_{3+4+8}: 19.3°C ± 3.6°C). In any case, the main difference was between O_{st} and O^{*}_{3+4} carriers, with mainly additive genetic effects (Figure 4). As already indicated, O_{st}/O_{st} flies clearly preferred lower temperatures than O_{3+4}/O_{3+4} or O_{3+4+8}/O_{3+4+8} flies.

b) Knock out temperature

The ANCOVA for T_{ko} (Table 4) did not detect any difference among karyotypes, in accordance with the previous findings for the inbred crosses. Similarly, the main differences arose between developmental temperature (flies reared at 18°C: 33.6°C ± 1.9°C; flies reared at 22°C: 32.8°C ± 2.3°C) and sex (females: 33.7°C ± 1.8°C; males: 32.7°C ± 2.4°C).

The genetic correlation between T_p and T_{ko} after pooling O_{3+4} and $O_{3+4+8}$was r_p = -0.130 (P = 0.917). Again, the conclusion is that these two traits are uncorrelated. Figure 4 plots the genotypic values in the

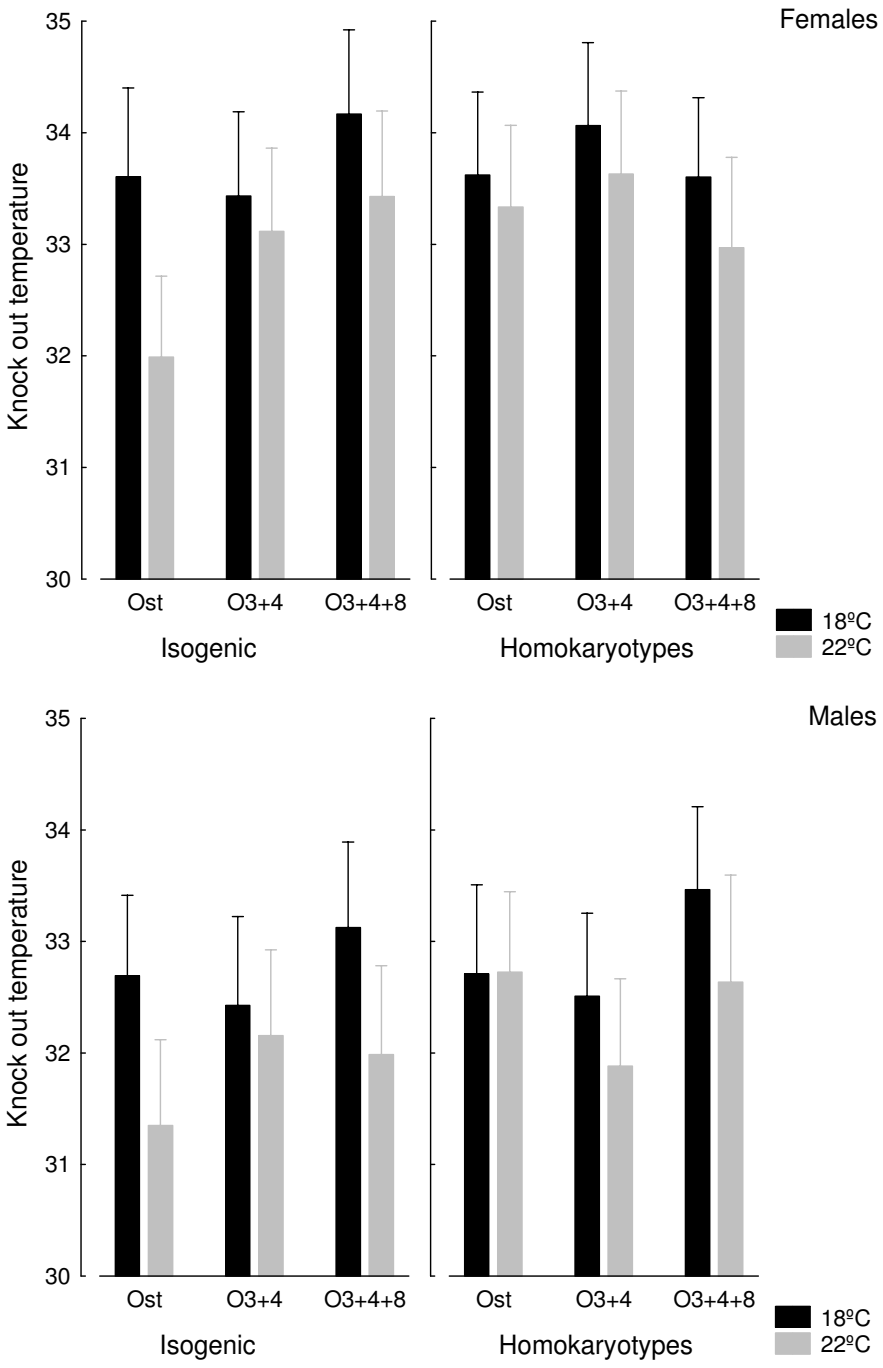


Figure 3 Inbreeding and temperature effects on knock out temperature. Homokaryotipic averages for T_{ko} (in °C with 95% confidence intervals) in inbred (left panels) and outbred (right panels) crosses according to sex and developmental temperature.

additive-dominance scales for T_p and T_{ko}, together with their statistical significance obtained from the appropriate contrasts (Table 3, 4).

c) Average effects on thermal preference

Our experiment only provides an estimation of the gene (chromosome O) action on T_p and does not allow inferences to the base population. It is possible, however, to obtain estimates of the average effects, or "statistically additive effects", by taking into account the gene action and allelic (chromosome arrangement) frequencies in the natural populations [61]. Assuming that the chromosome arrangement effects are roughly the same along the cline (for a measure of climatic temperatures along the Palaearctic cline see Figure 1 in [62]), Table 5 gives

Table 2 Inbreeding and temperature effects on knockout temperature

Source of variation	d.f.	Mean Square	*F*	*P*
Covariate (water bath)	1	103.117	24.04	<0.001
Karyotype (κ)	2	3.878	0.36	0.704
Cross $\subset \kappa$	15	11.027	2.57	0.001
Inbreeding (ι)	1	9.538	2.22	0.136
Temperature (τ)	1	77.034	17.96	<0.001
Sex (ς)	1	154.979	36.13	<0.001
$\kappa \times \iota$	2	4.176	0.97	0.378
$\kappa \times \tau$	2	1.999	0.47	0.628
$\kappa \times \varsigma$	2	8.106	1.89	0.152
$\iota \times \tau$	1	1.047	0.24	0.621
$\iota \times \varsigma$	1	0.435	0.10	0.750
$\tau \times \varsigma$	1	0.022	0.01	0.943
$\kappa \times \iota \times \tau$	2	7.798	1.82	0.163
$\kappa \times \iota \times \varsigma$	2	8.926	2.08	0.126
$\kappa \times \tau \times \varsigma$	2	1.693	0.39	0.674
$\iota \times \tau \times \varsigma$	1	0.241	0.06	0.813
$\kappa \times \iota \times \tau \times \varsigma$	2	0.159	0.04	0.964
Error	668	4.289		

Flies raised from inbred (isogenic) and outbred crosses of *Drosophila subobscura* reared at 18°C and 22°C. Karyotypes being compared are O_{st}/O_{st}, O_{3+4}/O_{3+4}, and O_{3+4+8}/O_{3+4+8}. ($\subset$ means "nested in".)

the average effects (females and males pooled) estimated from the frequencies of the different arrangements in European populations spanning about 17° latitude [52,54]. The interpretation is that flies inheriting a O_{st} chromosome will choose a temperature ranging from around 0.31°C - 0.45°C below the average temperature chosen by the population (conversely, flies carrying warm-climate chromosome arrangements will choose a temperature ranging from around 0.03°C - 0.52°C above the average).

Combined with our previous results with chromosome A (which is the sex chromosome and additive values can be estimated using males' T_p; [34]), where gene arrangement A_{st} exhibits a similar latitudinal pattern than O_{st} and flies carrying A_{st} also display a laboratory thermal preference towards colder temperature, the conclusion is that flies inheriting simultaneously A_{st} and O_{st} will choose temperatures ranging from approximately 0.5°C - 1.0°C below the average (these estimates assume perfect additivity).

Discussion

The present results with isogenic lines and their crosses corroborate and extend our previous work with wild flies from south-western Europe [34]. They confirm that arrangements on chromosome O have a biometrical effect on thermal preference in a laboratory temperature gradient, with cold-climate O_{st} carriers displaying a lower T_p than their warm-climate O_{3+4} and O_{3+4+8} counterparts. In addition, T_p and T_{ko} were again found to be uncorrelated, and we can now discard a potential genetic covariance between both traits arising from linkage disequilibrium between genes affecting thermal preference and candidate genes for heat shock resistance (i.e., *Hsp*68 and *Hsp70*; [42,43]) located inside of, or close to, the chromosome regions covered by the inversions analyzed here (see Background). In other words, we conclude that variation on O chromosome arrangements does not have any effect on knock out temperature (but see below). Note, however, that this does not imply that genes on chromosome O have no effect on

Table 3 Karyotype and temperature effects on thermal preference

Source of variation	d.f.	Mean Square	*F*	*P*
Covariate (plate hour)	1	147.947	11.84	<0.001
Karyotype (κ)	5	60.774	4.97	0.002
O_{st}/O^{*}_{3+4}	1	0.853	0.07	0.793
O^{*}_{3+4}/O^{*}_{3+4}	2	42.884	3.51	0.043
O_{st}/O_{st}, O_{st}/O^{*}_{3+4}, O^{*}_{3+4}/O^{*}_{3+4}	2	106.330	8.70	0.001
additive effect	1	205.854	16.85	<0.001
dominance effect	1	3.532	0.29	0.595
Cross $\subset \kappa$	30	12.220	0.98	0.502
Temperature (τ)	1	41.328	3.31	0.069
Sex (ς)	1	91.221	7.30	0.007
$\kappa \times \tau$	5	19.791	1.58	0.162
$\kappa \times \varsigma$	5	10.805	0.86	0.505
$\tau \times \varsigma$	1	4.948	0.40	0.529
$\kappa \times \tau \times \varsigma$	5	8.863	0.71	0.617
Error	691	12.498		

Flies raised from outbred crosses of *Drosophila subobscura* reared at 18°C and 22°C. Karyotypes being compared are O_{st}/O_{st}, O_{3+4}/O_{3+4}, O_{3+4+8}/O_{3+4+8}, O_{st}/O_{3+4}, O_{st}/O_{3+4+8} and O_{3+4}/O_{3+4+8}. O^{*}_{3+4} stands for O_{3+4} + O_{3+4+8}. ($\subset$ means "nested in".)

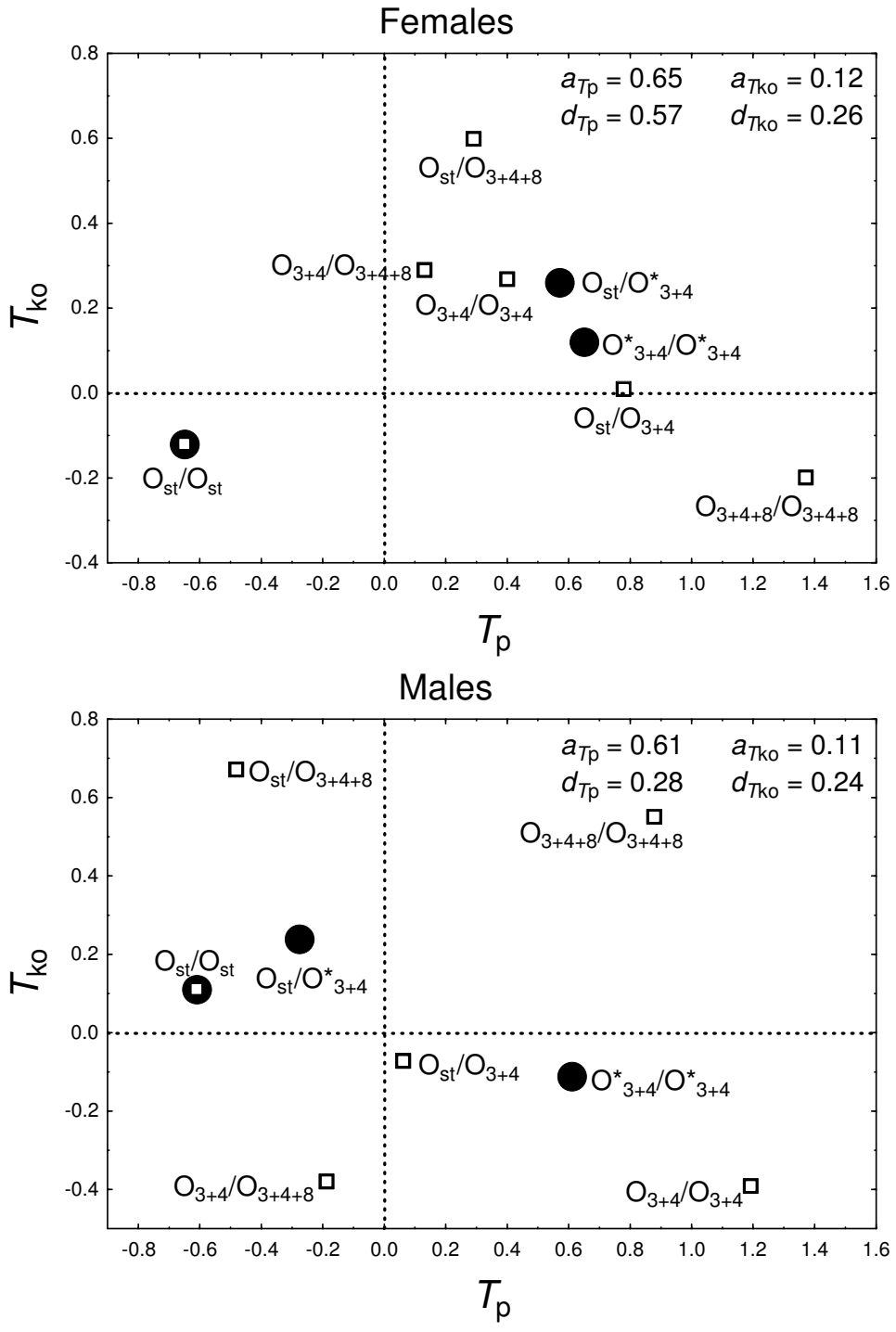


Figure 4 Karyotypic values in the additive-dominance scale. Deviation values for thermal preference (T_p) and knockout temperature (T_{ko}) were measured after pooling arrangements O_{3+4} and O_{3+4+8} into a single class (O^*_{3+4}), and the coordinate point (0, 0) was taken as the midparent (i.e., the average of T_p and T_{ko} for the two karyotypes O_{st}/O_{st} and O^*_{3+4}/O^*_{3+4}). Females (upper panel) and males (lower panel) are plotted separately because the interaction karyotype × sex was statistically significant for T_{ko} (Table 4). In the original scale the (0, 0) point corresponds to an average T_p of 18.31°C for females and 17.91°C for males, and an average T_{ko} of 33.58°C for females and 32.61°C for males. Open squares give the values for all six karyotypes to appreciate their dispersion from the midparent, as well as their dispersion from the pooled O_{st}/O^*_{3+4} and O^*_{3+4}/O^*_{3+4} karyotypes (black circles). Statistical significance for additive (a_{T_p}, $a_{T_{ko}}$) and dominance (d_{T_p}, $d_{T_{ko}}$) effects are given in Tables 3 and 4. Note also that the phenotypic ($r_{T_p \cdot T_{ko}} = -0.030$) and genetic ($r_k$ = -0.068, r_p = -0.130; see Methods) correlations were non-significantly different from zero (see text for details).

Table 4 Karyotype and temperature effects on knockout temperature

Source of variation	d.f.	Mean Square	*F*	*P*
Covariate (water bath)	1	101.377	25.87	<0.001
Karyotype (κ)	5	4.295	0.57	0.724
O_{st}/O^{*}_{3+4}	1	11.598	1.52	0.228
O^{*}_{3+4}/O^{*}_{3+4}	2	0.016	0.002	0.998
O_{st}/O_{st}, O_{st}/O^{*}_{3+4}, O^{*}_{3+4}/O^{*}_{3+4}	2	4.872	0.64	0.536
additive effect	1	0.015	0.001	0.965
dominance effect	1	8.632	1.13	0.296
Cross $\subset \kappa$	30	7.641	1.95	0.002
Temperature (τ)	1	107.075	27.33	<0.001
Sex (ς)	1	180.874	46.16	<0.001
$\kappa \times \tau$	5	7.576	1.93	0.087
$\kappa \times \varsigma$	5	8.777	2.24	0.049
$\tau \times \varsigma$	1	1.650	0.42	0.517
$\kappa \times \tau \times \varsigma$	5	2.329	0.59	0.704
Error	654	3.918		

Flies raised from outbred crosses of *Drosophila subobscura* reared at 18°C and 22°C. Karyotypes being compared are O_{st}/O_{st}, O_{3+4}/O_{3+4}, O_{3+4+8}/O_{3+4+8}, O_{st}/O_{3+4+8}, and O_{3+4}/O_{3+4+8}. O^{*}_{3+4} stands for O_{3+4} + O_{3+4+8}. ($\subset$ means "nested in".)

T_{ko} (actually, statistically significant differences were detected among crosses within karyotypes; Table 4); it simply indicates that any allelic variation of putative genes influencing this trait is not in linkage disequilibrium with inversions on this chromosome.

The new findings were: (*i*) a lack of inbreeding depression for both T_p and T_{ko}; (*ii*) a lack of phenotypic plasticity for T_p according to the temperature at which the flies were raised (18°C and 22°C); and (*iii*) a substantial effect of developmental temperature on T_{ko}. The absence of inbreeding depression for T_p agrees with the genetic analysis from outbred flies, where a dominance effect after pooling chromosome arrangements O_{3+4} and O_{3+4+8} into a single class (O^{*}_{3+4}) was absent (Table 3; note that the differences detected among the three O^{*}_{3+4}/O^{*}_{3+4} karyotypes, and attributed to some underdominance, could not be appreciated in the inbreeding analysis because it only included inbred and outbred homokaryotypes). On the other hand, the lack of inbreeding depression for T_{ko} is expected and does not mean anything here, simply because no "gene" effects linked to chromosomal arrangements on chromosome O were detected. At first sight this might be surprising because a well-characterized cellular defence mechanism once environmental temperature approaches the upper

Table 5 Average effect of chromosome O on thermal preferences (°C)

		Frequency		Average effect	
Population	Coordinates	O_{st}	O^{*}_{3+4}	O_{st}	Rest
Málaga (Spain)	36°43'N–4°25'W	0.080	0.407	-0.4506	0.0392
Punta Umbría (Spain)	37°10'N–6°57'W	0.066	0.410	-0.4494	0.0318
Calviá (Spain)	39°33'N–2°29'E	0.057	0.590	-0.4485	0.0271
Riba-roja (Spain)	39°33'N–0°34'W	0.148	0.324	-0.4530	0.0787
Queralbs (Spain)	42°13'N–2°10'E	0.290	0.493	-0.4395	0.1795
Lagrasse (France)	43°05'N–2°37'E	0.330	0.590	-0.4312	0.2124
Montpellier (France)	43°36'N–3°53'E	0.362	0.557	-0.4232	0.2401
Villars (France)	45°26'N–0°44'E	0.389	0.581	-0.4155	0.2645
Leuk (Switzerland)	46°19'N–7°39'E	0.595	0.365	-0.3267	0.4800
Vienna (Austria)	48°13'N–16°22'E	0.625	0.270	-0.3095	0.5158
Tübingen (Germany)	48°32'N–9°04'E	0.606	0.351	-0.3205	0.4930
Louvain-la-Neuve (Belgique)	50°43'N–4°37'E	0.397	0.540	-0.4130	0.2719
Groningen (The Netherlands)	53°13'N–6°35'E	0.502	0.405	-0.3733	0.3763

O^{*}_{3+4} pools gene arragements O_{3+4} and O_{3+4+8} used in the present work. Together with O_{st}, their combined frequency is ≥ 0.90 in central European populations and drops to approximately 0.50 in south-western Europe, where arrangement O_{3+4+7} is also frequent. However, from our previous data [34] no difference in T_p is detected between O_{3+4+7} and O^{*}_{3+4}, which justifies their pooling and allows estimating average effects assuming two gene arrangements: O_{st} and the rest. Gene arrangement frequencies where taken from the "new collections" in Solé et al. [52] and Balanyà et al. [54].

thermal limits is the heat shock response, and in *D. melanogaster* the major inducible heat shock protein Hsp70 appears to be the primary protein involved in thermotolerance [45,63]. Recent work, however, questions the pervasive role of Hsp70 in the mediation of the heat stress response and suggests that it may be life-stage specific, being important in larvae but not in adults [64]. Our results are apparently consistent with the lack of association between Hsp70 and adult heat resistance (but see further discussion below), although also raise a caveat to the conclusion that there is no covariance between T_p and T_{ko}. Thus, it could be the case that Hsp70 variation across karyotypes is associated with juvenile tolerance to heat stress, an important trait in *Drosophila* particularly in summer when larval feeding patches can become lethally hot [65]. This possibility warrants further analysis.

An important concern here is that Hsp70 production might not be inducible in the dynamic experimental protocol we used to estimate upper thermal tolerance, where temperature increased 0.1°C min^{-1}. One apparently compelling reason for this is that the estimated maximum thermal limits that *D. melanogaster* can tolerate decrease from approximately 39.9°C with heating rate 0.5°C min^{-1} to 38.7°C with heating rate 0.1°C min^{-1} [66], a puzzling result because slower heating rates should allow individuals to acclimatize to new temperatures and also because slow heating rates pre-exposes individuals to non-lethal high temperatures ("hardening"), which increases heat shock resistance [10]. We have recently discussed why these conflicting outcomes arise, and suggest that the contribution of other stressors (e.g. higher desiccation in long thermal tolerance assays associated with slow warming rates) can potentially overshadow thermal acclimation effects in dynamic assays with varying heating rates [67]. In other words, we challenge the idea that induced thermotolerance does not occur in dynamic assays with slow heating rates. At this stage this is just speculative because Hsp70 production was not measured in our flies, but the problem is important because *Drosophila* adults are likely to experience slow heating rates in nature of 0.06 - 0.1°C min^{-1} [66,68] and further empirical studies are required to explain the apparently inconsistent findings.

The pooled average T_p here was (mean ± SD) 18.4°C ± 3.6°C (T_{set}: 15.4°C - 21.2°C; these figures include only outbred lines) and about the same at both rearing temperatures. The difference with our previous estimate for wild-flies from Adraga (16.6°C, T_{set}:12.4°C - 20.4°C; [34]) does not seem to be overreached, and could be partially explained by the fact that the present flies were genetically homogeneous for all chromosomes from the *ch-cu* marker strain but chromosome O (recall that the sex chromosome A also had a significant effect on T_p; [34]). This strain has a long history of maintenance at 18°C in the laboratory. In any case, our estimates remain substantially lower than that from Huey and Pascual (23.7°C, T_{set}: 21.2°C - 25.9°C; [12]), and the difference cannot be accounted by flies' rearing temperature. No reasonable explanation for the discrepancy can be offered at this moment, but the additional result that developmental temperature substantially affected T_{ko} makes us confidently conclude that our estimates are indeed closer to the actual T_p of the species. Flies reared at 22°C showed lower heat resistance than their counterparts reared at 18°C (32.8°C *vs.* 33.6°C; outbred lines), which could be a consequence of their smaller size due to the inverse relationship between body size and developmental temperature [69,70]. However, resistance to heat does not seem to be associated with body size [71] - we have also analyzed the association between T_{ko} and wing size from our previous experiment where both traits were recorded [30,34] and found no relationship whatsoever (results not shown). Most likely, 22°C was a suboptimal and potentially stressful temperature for our flies, making them to be weaker and less resistant to the heat shock. Note, however, that this conclusion might not be extrapolated to wild flies that harbour higher levels of genetic variability than our chromosomal lines.

To interpret the interplay between thermal preference and heat stress resistance, an understanding of the environmental temperatures experienced by *D. subobscura* along climatic gradients is required. As far as we are aware, the only data available on T_b for active flies along a latitudinal gradient (spanning 12°) come from recent work by Huey and Pascual [12] in western North America. They found that mean T_b varies by as much as 21°C (from 8°C to 29°C), and that the temporal activity of flies during the day did not match predictions from optimal temperature regulation or desiccation avoidance. Temperatures of maximum activity in summer (Figure 2 in [12]) - when wild flies are smaller probably due to their higher developmental temperatures and/or crowding conditions [72]; and crowding is known to affect adult thermal stress resistance in *Drosophila* [73] - are dangerously close to the T_{ko} obtained here for the outbred flies raised at 22°C. This suggests that active *D. subobscura* flies can experience extreme conditions in the wild, and one would expect flies' activity to be correlated with heat resistance under these conditions if behaviour and physiology were coadapted. Some evidence indicates that diurnal activity patterns in summer can vary according to inversion polymorphism, and chromosome arrangements on the O chromosome seem to behave as expected from our data: O_{st} is more frequent towards the evening while chromosomes carrying gene arrangement O_{3+4} are most frequently sampled at midday [74]. This behavioural thermoregulation,

however, would not confer less susceptibility to high temperatures because the genetic basis of both traits does not seem to allow for the building up of "coadaptation". It is well known from basic population genetics theory that genetic covariance between traits can arise when alleles at different loci are associated (linkage disequilibrium), and this critically depends on relatively low recombination rates [75]. The lack of association between T_p and T_{ko} in *D. subobscura* is fully consistent with their genetic basis as independently segregating chromosomes are involved [34]. Yet, a correlation between these traits can be expected at the interpopulational level due to patterns of correlated selection (rather than genetic correlations) across a latitudinal gradient because of the congruent latitudinal clinal variation for chromosome arrangements on the E (which influences T_{ko} [34]), and on the A and O chromosomes (which influence T_p [[34], this work]).

We now speculate that the mismatch between T_p and T_{ko} could apparently generate an interesting dynamics in the population frequencies of different chromosome arrangements on chromosome O. Suppose the daily activity of flies in the warmest months of the year follows the previously described pattern; that is, flies carrying gene arrangement O_{3+4} are more active at midday and, therefore, have a higher risk of a heat shock than O_{st} and are selected against. On the other hand, assuming T_p corresponds closely with temperatures that maximize fitness O_{3+4} flies likely enjoy a fitness advantage in summer. The net effect would be a compromise between "behaviour unresponsiveness" and general performance, which means that chromosome arrangements on chromosome O may or may not cycle seasonally according to average environmental temperature (i.e., O_{3+4} could be expected to increase in frequency in summer and decrease in winter if general performance is what matters). Interestingly, both patterns have been detected: consistent seasonal cycling at a north-western population in Spain [8] and apparently no seasonal variation at a north-eastern population also in Spain [76]. The point here is that parallel seasonal changes should also be detected for chromosome A since it also affects T_p [34]. In accordance with this prediction, no seasonal cycling was detected for chromosome A in the north-eastern population, but unfortunately no information is available for the other population because chromosome O was the only chromosome scored. It would be very interesting to see what happens for chromosome A in the cycling population.

Conclusions

For ectotherms facing spatiotemporal variation in environmental temperature theory predicts that a coevolution between thermal preference and physiological performance can occur [1]. In the widespread species *D. subobscura* behavioural thermoregulation and heat tolerance are "coadapted" in the sense that flies carrying cold-climate (warm-climate) chromosome arrangements tend to choose colder (warmer) temperatures and have lower (higher) heat stress tolerance [34]. We have analyzed the genetic basis of these thermal traits using isochromosomal lines for the O chromosome. This chromosome was known to affect thermal preference [34], and also harbours several genes involved in the heat shock response (*Hsp68* and *Hsp70*) [42,43]. These genes are located inside of, or close to, the chromosome regions covered by inversions that show conspicuous northwest-southwest latitudinal clines in Palaearctic populations, as well as seasonal fluctuations that are in agreement with the latitudinal patterns [22]. Our results corroborate that arrangements on chromosome O affect adult thermal preference: flies inheriting the cold-climate O_{st} chromosome are predicted to choose a temperature around 0.31°C - 0.45°C below the average temperature chosen by the population and, conversely, flies inheriting the warm-climate O_{3+4} and O_{3+4+8} chromosomes are expected to choose a temperature ranging from around 0.03°C - 0.52°C above the average. However, these chromosome arrangements did not have any differential effect on adult heat tolerance. We conclude that thermal preference and heat tolerance in *D. subobscura* appear to be genetically independent and, therefore, any latitudinal correlation between both traits would likely reflect a pattern of correlated selection across populations rather than within-population genetic correlations.

Methods

Origin of flies and experimental procedures

D. subobscura wild flies were collected near Barcelona (41°43'N, 2°13'E) in October 2007. More than 200 isofemale lines were derived and used to obtain isochromosomal lines for the O chromosome in an otherwise homogeneous genetic background following standard protocols [77]. Briefly, one offspring male from each isofemale line was crossed to three or four virgin females from the *ch-cu* marker strain, which is homozygous for the morphological recessive markers on the O chromosome *cherry* eyes (*ch*) and *curled* wings (*cu*) and the chromosomal arrangement O_{3+4}. A single wild-type male from each cross was repeatedly backcrossed to three or four *ch-cu* females for at least five generations in order to homogenize the genetic background, and the chromosomal arrangement carried by the wild chromosome was identified after the second backcross. To derive the isochromosomal lines, wild-type males from each line were crossed with the *Va*/*Ba* balancer stock [78], which has the same genetic background as the

ch-cu strain. Once obtained, the isochromosomal lines were genotyped for 13 microsatellite loci located on the O chromosome to check that no recombination events occurred during the different crosses. The 18 independent isochromosomal lines used in this study (see Experimental settings) were found to be homozygous for all the loci. The lines were kept at 18°C (12:12 light/dark cycle) in 130-mL bottles with low adult density (around 20 pairs/bottle) to standardize the rearing conditions before egg collections.

To obtain the experimental flies, all 54 crosses (inbred and outbred) were performed at 18°C by mating 4 days-old virgin males and females from the corresponding isochromosomal lines. After six days the males were discarded and the females (an equal number from each reciprocal cross in the outbred combinations) were transferred to egg-laying chambers containing fresh food and charcoal colouring. Eggs were placed in vials (45 eggs/vial containing 6 mL of food) at two rearing temperatures: 18°C and 22°C. Non-anaesthetized emerging flies were stored in bottles at low adult density and used to evaluate laboratory thermal preference (T_p) and knock out temperature (T_{ko}) for each cross (see below). All fly handling was done at room temperature using CO_2 anaesthesia only to sort virgin flies and to place females in the egg-laying chambers.

Thermal preference behaviour in a laboratory gradient and heat resistance

Laboratory T_p was measured as previously described [34]. Briefly, adult flies (about 7 days old) were individually placed in separate lanes on an aluminium base plate where a thermal gradient with temperatures ranging from 11°C to 29°C was generated. Adults were given approximately 1 h to adjust, and afterwards their positions were recorded four times every 10 min. We used the median of the four measurements to estimate T_p of each fly. Measurements were performed in a room with constant temperature (22°C - 23°C), and the flies were assayed under white light illumination. This protocol renders a repeatable assessment of flies' thermal preferences [34]. After the thermal preference assay, each fly was gently removed from the lane and individually placed in a vial with fresh food for the subsequent assay of heat stress tolerance.

One day after measurements of thermal preference flies were assayed for heat resistance also as previously described [34]. Adults were individually placed in sealed empty vials and immersed in water-baths at T_{min} = 24°C. Every 10 min individuals were scored for mobility (fly active or knocked out) and the temperature of the water was increased by ΔT = +1°C. The procedure was repeated until the water-baths reached T_{max}, defined as the temperature when the last active fly was knocked out (T_{max} = 38°C was the upper limit in the assays; median T_{max} = 33°C). For each fly T_{ko} was estimated as the temperature taken to knock it out (defined as the onset of muscle spasms; [79]).

Statistical methods

The experimental setup was devised to assay one male and one female from each cross and temperature per day (five blocks) for both T_p and T_{ko}, amounting to 1,080 flies in total. Some mishaps (e.g. individuals flew away or just died during the assays) were, however, unavoidable and the final data set contains a few more than or a few less than 10 flies in several crosses (the harmonic means of flies per cross and temperature were: T_p assay, 5.04 females and 4.80 males; T_{ko} assay, 4.89 females and 4.37 males). Statistical analysis with and without block design qualitatively yielded the same results. Therefore, to simplify matters blocks were not considered in the linear models below.

a) Consanguinity and temperature effects

Inbreeding and temperature effects were simultaneously analyzed by contrasting isogenic *vs.* outbred homokaryotypic flies reared at both developmental temperatures. The linear model used was:

$$T_{p(ijklmn)} = \mu + \kappa_i + C_{j(i)} + \tau_k + \iota_l + \varsigma_m + \kappa\tau_{ik} + \kappa\iota_{il} + \kappa\varsigma_{im} + \tau\iota_{kl} + \tau\varsigma_{km} + \ldots + \iota\varsigma_{lm} + \kappa\tau\iota_{ikl} + \kappa\tau\varsigma_{ikm} + \kappa\iota\varsigma_{ilm} + \tau\iota\varsigma_{klm} + \kappa\tau\iota\varsigma_{iklm} + \varepsilon_{ijklmn}, \quad (1)$$

where μ is the overall grand mean, κ_i is the fixed effect of the karyotype (i =1, 2, 3), $C_{j(i)}$ is the random effect of the jth cross (j = 1, 2, ..., 6) within karyotype i, τ_k is the fixed effect of the developmental temperature (18°C or 22°C), ι_l is the fixed effect of inbreeding (isogenic or outbred homokaryotypic flies), ς_m is the fixed effect of sex, and ε_{ijklmn} is the residual error associated with the thermal preference (T_p) of the nth fly from the mth sex with the ith karyotype from the jth cross that was derived from the ιth group of crosses and assayed at the kth temperature. The covariate plate-hour was also introduced in the model to control for differences in circadian activity since several trials were conducted during each day. A similar linear model was used for knock out temperature, also introducing water-bath as a covariate since T_{ko} was assessed in different water-baths.

Notice that for the main effect "karyotype" the linear model (1) can be conveniently reduced to the following two-level nested ANOVA model:

$$T_{p(ijk)} = \mu + \kappa_i + C_{j(i)} + e_{ijk}, \quad (2)$$

where the sum of squares for the error term e_{ijk} is simply the sum of the sum of squares for the remainder terms in (1). The usefulness of this model reduction is to efficiently perform randomization tests to test the

null hypothesis about karyotype effects in a randomized (i.e., random assignment) experiment [80]. Permutation tests are far less sensitive to the presence of outliers than parametric tests. The null hypothesis of no karyotype effect was tested here after performing random permutations among replicate and selection temperature for the among selection temperature *F*-statistics. Each test used 10,000 random permutations.

b) Karyotype variation

To asses the effect of O chromosome karyotypes on T_p and T_{ko} we have focused in the outbred crosses, including both structural homo- and heterokaryotypes. The linear model used was similar to (1) including the fixed effect of karyotype (κ_i; i = 1, 2, ..., 6), the random effect of cross within karyotypes ($C_{j(i)}$; j = 1, 2, ..., 6), the fixed effect of developmental temperature, and the fixed effect of sex. The covariate plate-hour was also introduced in the model. As above, a similar linear model was used for knock out temperature, also introducing water-bath as a covariate.

In the original Palaearctic populations chromosome arrangements O_{3+4} and O_{3+4+8} have a higher frequency at lower latitudes than arrangement O_{st}, and the converse is true a higher latitudes [35,36]. For this reason, the variation explained by the six karyotypes was further decomposed after pooling the first two arrangements into a single class (O^*_{3+4}) as follows: between the two O_{st}/O^*_{3+4} heterokaryotypes; among the three O^*_{3+4}/O^*_{3+4} karyotypes; and among O_{st}/O_{st}, O_{st}/O^*_{3+4}, O^*_{3+4}/O^*_{3+4}. The karyotypic values for T_p and T_{ko} were also estimated in the additive-dominance scale [81,82] after pooling the two chromosome arrangements that share O_{3+4} (each comparison or contrast between two means has one degree of freedom).

The genetic correlation between T_p and T_{ko} can be approached as indicated in Betrán et al. [26]. Assuming that the components of the between karyotypes sums of squares and cross-products (SSCP) hypothesis matrix ($\mathbf{H}_k$) are entirely genetic in origin, the correlation coefficient between the means of all six outbred karyotypes is given by:

$$r_k = \frac{\mathbf{H}_k(1,2)}{\sqrt{\mathbf{H}_k(1,1)\mathbf{H}_k(2,2)}}, \quad (3)$$

where $\mathbf{H}_k$ (1, 2) is the off-diagonal element (sum of products of karyotype averages), and $\mathbf{H}_k$ (i, i) is a diagonal element (sum of squares of karyotypes averages) for the ith variable. This correlation coefficient is obviously an approximation to the genetic correlation because the $\mathbf{H}_k$ matrix also contains a fraction of the variation among the isogenic lines used to obtain the outbred flies (see Experimental settings). The correlation coefficient can be tested as:

$$t = r\sqrt{\frac{k-2}{1-r^2}}, \quad (4)$$

where k is the number of karyotypes [83]. After pooling the arrangements that share arrangement O_{3+4} into a single class, we can now obtain the new hypothesis matrix $\mathbf{H}_p$. The correlation coefficient between the pooled averages can be estimated as:

$$r_p = \frac{\mathbf{H}_p(1,2)}{\sqrt{\mathbf{H}_k(1,1)\mathbf{H}_k(2,2)}}. \quad (5)$$

The square of this correlation can be interpreted as that fraction of the total variation among karyotypes that is explained by O_{st}/O_{st}, O_{st}/O^*_{3+4}, O^*_{3+4}/O^*_{3+4}.

c) Computer software for statistical analysis

The computer programs used for statistical data analyses were MATLAB algebra program environment (ver. 7.0.4 [84]) together with the collection of tools supplied by the Statistics Toolbox. The statistical software packages STATISTICA version 9 [85] and SPSS version 15 [86] were also used.

Acknowledgements

We thank three anonymous reviewers for comments on the manuscript. OD is supported by a pre-doctoral fellowship (BES-2007-17438) from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). CR is supported by a post-doctoral fellowship (SFRH/BPD/39998/2007) from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal). GC is supported by a pre-doctoral fellowship (BES-2007-15096) from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). ELR is supported by a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). This research was supported by grants CGL2006-13423-C01 and CGL2006-13423-C02-02 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain); CGL2009-12912-C03-01, CGL2010-15395 and BFU2009-07564 from the Ministerio de Ciencia e Innovación; and 2009SGR 636 from Generalitat de Catalunya to the Grup de Biologia Evolutiva.

Author details

[1]Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Biologia Evolutiva (GBE), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain. [2]Departamento de Ciências Agrárias, Azorean Biodiversity Group-CITAA, Universidade dos Açores, Terra-Chã, 9701-851 Angra do Heroísmo, Portugal. [3]Departament de Genètica, Grup de Biologia Evolutiva (GBE), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08071 Barcelona, Spain. [4]Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona, 08071 Barcelona, Spain.

Authors' contributions

OD, GC, JB, MP and MS sampled flies from the natural population and setup isofemale lines. OD and GC obtained the isochromosomal lines. JB helped in gene arrangement identification. GC and MP assayed the isochromosomal lines for microsatellites. OD, CR and GC carried out experimental crosses and egg collections. OD, GC, JB, and MS assayed the flies for thermal preference and knock out temperature. OD, CR, ELR and MS conceived the study. OD, CR, and MS carried out statistical analyses and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 12 July 2010 Accepted: 25 November 2010
Published: 25 November 2010

References

1. Angilletta MJ: *Thermal Adaptation. A Theoretical and Empirical Synthesis* Oxford: Oxford Univ Press; 2009.
2. Stevenson RD: **The relative importance of behavioral and physiological adjustments controlling body temperature in terrestrial ectotherms.** *Am Nat* 1985, **126**:362-386.
3. Casey TM, Hegel JR: **Caterpillar setae: insulation for an ectotherm.** *Science* 1981, **214**:1131-1133.
4. Kingsolver JG, Watt WB: **Thermoregulatory strategies in *Colias* butterflies: thermal stress and limits to adaptation in temporally varying environments.** *Am Nat* 1983, **121**:32-35.
5. Willmer PG, Unwin S: **Field analyses of insect heat budget: reflectance, size and heating rates.** *Oecologia* 1981, **50**:250-255.
6. Huey RB, Hertz PE, Sinervo B: **Behavioral drive versus behavioral inertia in evolution: a null model approach.** *Am Nat* 2003, **161**:357-366.
7. Dobzhansky Th: *Genetics of the Evolutionary Process* New York: Columbia Univ Press; 1970.
8. 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.
9. Coyne JA, Bundgaard J, Prout T: **Geographic variation of tolerance to environmental stress in *Drosophila pseudoobscura*.** *Am Nat* 1983, **122**:474-488.
10. Hoffmann AA, Sørensen JG, Loeschcke V: **Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches.** *J Therm Biol* 2003, **28**:175-216.
11. Hoffmann AA: **Physiological climatic limits in *Drosophila*: patterns and implications.** *J Exp Biol* 2010, **213**:870-880.
12. Huey RB, Pascual M: **Partial thermoregulatory compensation along a latitudinal cline in a rapidly evolving invasive species. *Drosophila subobscura* in North America.** *Ecology* 2009, **90**:1715-1720.
13. Sinclair BJ, Vernon P, Klok CJ, Chown SL: **Insects at low temperatures: an ecological perspective.** *Trends Ecol Evol* 2003, **18**:257-262.
14. Hofmann GE, Todgham AE: **Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment.** *Annu Rev Physiol* 2010, **72**:127-145.
15. Huey RB, Bennett AF: **Phylogenetic studies of coadaptation: preferred temperatures versus optimal performance temperatures of lizards.** *Evolution* 1987, **41**:1098-1115.
16. Angilletta MJ, Bennett AF, Guderley H, Navas CA, Seebacher F, Wilson RS: **Coadaptation: a unified principle in evolutionary thermal biology.** *Physiol Biochem Zool* 2006, **79**:282-294.
17. Mayr E: *Animal Species and Evolution* Cambridge, Harvard Univ Press; 1963.
18. Ayala FJ, Serra L, Prevosti A: **A grand experiment in evolution *Drosophila subobscura* colonization of the Americas.** *Genome* 1989, **31**:246-255.
19. Hoffmann AA, Weeks AR: **Climatic selection on genes and traits after 100 year-old invasion: a critical look at the temperate-tropical clines in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia.** *Genetica* 2007, **129**:133-147.
20. Huey RB, Gilchrist GW, Carlson ML, Berrigan D, Serra L: **Rapid evolution of a geographical cline in size in an introduced fly.** *Science* 2000, **287**:308-309.
21. Balanyà J, Serra L, Gilchrist GW, Huey RB, Pascual M, Mestres F, Solé E: **Evolutionary pace of chromosomal polymorphism in colonizing populations of *Drosophila subobscura*: an evolutionary time series.** *Evolution* 2003, **57**:1837-1845.
22. Rezende EL, Balanyà J, Rodríguez-Trelles F, Rego C, Fragata I, Matos M, Serra L, Santos M: **Climate change and chromosomal inversions in *Drosophila subobscura*.** *Clim Res* 2010, **43**:103-114.
23. Gilchrist G, Jeffers L, West B, Folk D, Suess J, Huey RB: **Clinal patterns of desiccation and starvation resistance in ancestral and invading populations of *Drosophila subobscura*.** *Evol Appl* 2008, **1**:513-23.
24. Calboli FCF, Gilchrist GW, Partridge L: **Different cell size and cell number contribution in two newly established and one ancient body size cline of *Drosophila subobscura*.** *Evolution* 2003, **57**:566-573.
25. Gilchrist GW, Huey RB, Serra L: **Rapid evolution of wing size clines in *Drosophila subobscura*.** *Genetica* 2001, **112-113**:273-286.
26. Betrán E, Santos M, Ruiz A: **Antagonistic pleiotropic effect of second-chromosome inversions on body size and early life-history traits in *Drosophila buzzatii*.** *Evolution* 1998, **52**:144-154.
27. Etterson JR, Shaw RG: **Constraint to adaptive evolution in response to global warming.** *Science* 2001, **294**:151-154.
28. Fontdevila A, Zapata C, Alvarez G, Sanchez L, Méndez J, Enriquez I: **Genetic coadaptation in the chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura*. I. Seasonal changes of gametic disequilibrium in a natural population.** *Genetics* 1983, **105**:935-955.
29. Rodríguez-Trelles F: **Seasonal cycles of allozyme-by-chromosomal-inversion gametic disequilibrium in *Drosophila subobscura*.** *Evolution* 2003, **57**:839-848.
30. Fragata I, Balanyà J, Rego C, Matos M, Rezende EL, Santos M: **Contrasting patterns of phenotypic variation linked to chromosomal inversions in native and colonizing populations of *Drosophila subobscura*.** *J Evol Biol* 2010, **23**:112-123.
31. Nosil P, Crespi BJ, Sandoval CP, Kirkpatrick M: **Migration and the genetic covariance between habitat preference and performance.** *Am Nat* 2006, **167**:E66-E78.
32. Duckworth RE: **The role of behavior in evolution: a search for mechanism.** *Evol Ecol* 2009, **23**:513-531.
33. Dillon ME, Wang G, Garrity PA, Huey RB: **Thermal preference in *Drosophila*.** *J Therm Biol* 2009, **34**:109-119.
34. Rego C, Balanyà J, Fragata I, Matos M, Rezende EL, Santos M: **Clinal patterns of chromosomal inversion polymorphisms in *Drosophila subobscura* are partly associated with thermal preferences and heat stress resistance.** *Evolution* 2010, **64**:385-397.
35. Menozzi P, Krimbas CB: **The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura* revisited: synthetic maps of gene arrangement frequencies and their interpretation.** *J Evol Biol* 1992, **5**:625-641.
36. Krimbas CB: **The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*.** In *Drosophila Inversion Polymorphism.* Edited by: Krimbas CB, Powell JR. Boca Raton: CRC Press; 1992:127-220.
37. Sperlich D, Feuerbach-Mravlag H, Lange P, Michaelidis A, Pentzos-Daponte A: **Genetic load and viability distribution in central and marginal populations of *Drosophila subobscura*.** *Genetics* 1977, **86**:835-848.
38. Pegueroles C, Araúz PA, Pascual M, Mestres F: **A recombination survey using microsatellites: the O chromosome of *Drosophila subobscura*.** *Genetica* 2010, **138**:795-804.
39. Powell JR: *Progress and Prospects in Evolutionary Biology. The Drosophila Model* New York: Oxford Univ Press; 1997.
40. Santos J, Serra L, Solé E, Pascual M: **FISH mapping of microsatellite loci from *Drosophila subobscura* and its comparison to related species.** *Chromosome Res* 2010, **18**:213-226.
41. Laayouni H, García-Franco F, Chávez-Sandoval BE, Trotta V, Beltran S, Corominas M, Santos M: **Thermal evolution of gene expression profiles in *Drosophila subobscura*.** *BMC Evol Biol* 2007, **7**:42.
42. Moltó MD, Pascual L, Martínez-Sebastián MJ, de Frutos R: **Genetic analysis of the heat shock response in three *Drosophila* species of the *obscura* group.** *Genome* 1992, **35**:870-880.
43. Cuenca JB, Galindo MI, Saura AO, Sorsa V, de Frutos R: **Ultrastructure of regions containing homologous loci in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila subobscura*.** *Chromosoma* 1998, **107**:113-126.
44. Kunze-Mühl E, Müller E: **Weitere Untersuchungen über die chromosomale Struktur und natürlichen Strukturtypen von *D. subobscura*.** *Chromosoma* 1958, **9**:559-570.
45. Parsell DA, Taulien J, Lindquist S: **The role of heat-shock proteins in thermotolerance.** *Phil Trans Roy Soc London Series B* 1993, **339**:279-286.
46. Krebs RA: **A comparison of Hsp70 expression and thermotolerance in adults and larvae of three *Drosophila* species.** *Cell Stress Chaperones* 1999, **4**:243-249.
47. Bettencourt BR, Kim I, Hoffmann AA, Feder ME: **Response to natural and laboratory selection at the *Drosophila hsp70* genes.** *Evolution* 2002, **56**:1796-1801.
48. McColl G, Hoffmann AA, McKechnie SW: **Response of two heat shock genes to selection for knockdown heat resistance in *Drosophila melanogaster*.** *Genetics* 1996, **143**:1615-1627.
49. Santos M, Iriarte PF, Céspedes W, Balanyà J, Fontdevila A, Serra L: **Swift laboratory thermal evolution of wing shape (but not size) in *Drosophila***

subobscura and its relationship with chromosomal inversion polymorphism. *J Evol Biol* 2004, **17**:841-855.
50. Santos M, Céspedes W, Balanyà J, Trotta V, Calboli FCF, Fontdevila A, Serra L: **Temperature-related genetic changes in laboratory populations of *Drosophila subobscura*: evidence against simple climatic-based explanations for latitudinal clines.** *Am Nat* 2005, **165**:258-273.
51. Santos M: **Evolution of total net fitness in thermal lines: *Drosophila subobscura* likes it "warm".** *J Evol Biol* 2007, **20**:2361-2370.
52. Solé E, Balanyà J, Sperlich D, Serra L: **Long-term changes in the chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. I. Mediterranean populations from southwestern Europe.** *Evolution* 2002, **56**:830-835.
53. Prevosti A: **Chromosomal inversion polymorphism in the southwestern range of *Drosophila subobscura* distribution area.** *Genetica* 1974, **45**:111-124.
54. Balanyà J, Solé E, Oller JM, Sperlich D, Serra L: **Long-term changes in the chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. II. European populations.** *J Zool Syst Evol Res* 2004, **42**:191-201.
55. Munté A, Rozas J, Aguadé M, Segarra C: **Chromosomal inversion polymorphism leads to extensive genetic structure: a multilocus survey in *Drosophila subobscura*.** *Genetics* 2005, **69**:1573-1581.
56. Andolfatto P, Depaulis F, Navarro A: **Inversion polymorphism and nucleotide variability in *Drosophila*.** *Genet Res* 2001, **77**:1-8.
57. Laayouni H, Hasson E, Santos M, Fontdevila A: **Inversion polymorphism and nucleotide variability in different regions of the second-chromosome in *Drosophila buzzatii*.** *Mol Biol Evol* 2003, **20**:931-944.
58. Santos M, Iriarte PF, Cespedes W: **Genetics and geometry of canalization and developmental stability in *Drosophila subobscura*.** *BMC Evol Biol* 2005, **5**:7.
59. Yamamoto AH: **Temperature preference of *Drosophila immigrans* and *D. virilis*: Intra- and inter-population genetic variation.** *Jpn J Genet* 1994, **69**:67-76.
60. Hertz PE, Huey RB, Stevenson RD: **Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question.** *Am Nat* 1993, **142**:796-818.
61. Falconer DS, Mackay TF: *Introduction to Quantitative Genetics.* 4 edition. Essex, England: Longman; 1996.
62. Balanyà J, Oller JM, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L: **Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*.** *Science* 2006, **313**:1773-1775.
63. Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V: **The evolutionary and ecological role of heat shock proteins.** *Ecol Lett* 2003, **6**:1025-1037.
64. Jensen LT, Cockerell FE, Kristensen TN, Rako L, Loeschcke V, McKechnie SW, Hoffmann AA: **Adult heat tolerance variation in *Drosophila melanogaster* is not related with Hsp70 expression.** *J Exp Zool* 2010, **313A**:35-44.
65. Feder ME, Blair N, Figueras H: **Oviposition site selection: unresponsiveness of *Drosophila* to cues of potential thermal stress.** *Anim Behav* 1997, **53**:585-588.
66. Chown SL, Jumbam KR, Sørensen JG, Terblanche JS: **Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context.** *Funct Ecol* 2009, **23**:133-140.
67. Rezende EL, Tejedo M, Santos M: **Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: methodological problems and evolutionary implications.** *Funct Ecol* 2010.
68. Mitchell KA, Hoffmann AA: **Thermal ramping rate influences evolutionary potential and species differences for upper thermal limits in *Drosophila*.** *Funct Ecol* 2010, **24**:694-700.
69. Moreteau B, Morin J-P, Gibert P, Petavy G, Pla E, David JR: **Evolutionary changes of nonlinear reaction norms according to thermal adaptation: a comparison of two *Drosophila* species.** *C R Acad Sci Paris* 1997, **320**:833-841.
70. Santos M, Brites D, Laayouni L: **Thermal evolution of pre-adult life history traits, geometric size and shape, and developmental stability in *Drosophila subobscura*.** *J Evol Biol* 2006, **19**:2006-2021.
71. Bubli OL, Imasheva AG, Loeschcke V: **Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities.** *Evolution* 1998, **52**:619-625.
72. Kari JS, Huey RB: **Size and seasonal temperature in free-ranging *Drosophila subobscura*.** *J Therm Biol* 2000, **25**:267-272.
73. Sørensen JG, Loeschcke V: **Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance.** *J Insect Physiol* 2001, **47**:1301-1307.
74. Savković V, Stamenkovic-Radak M, Andjelkovic M: **Diurnal variability of gene arrangement frequencies in *Drosophila subobscura* populations from two habitats.** *J Zool Syst Evol Res* 2004, **42**:208-214.
75. Hedick PW: *Genetics of Populations.* 2 edition. Boston: Jones and Bartlett Publ; 2000.
76. de Frutos R, Prevosti A: **Temporal changes of chromosomal polymorphism in natural populations of *Drosophila subobscura*.** *Genetica* 1984, **63**:181-187.
77. Iriarte FP, Céspedes W, Santos M: **Quantitative-genetic analysis of wing form and bilateral asymmetry in isochromosomal lines of *Drosophila subobscura* using the Procrustes methods.** *J Genet* 2003, **82**:95-113.
78. Mestres F, Pegueroles G, Prevosti A, Serra L: **Colonization of America by *Drosophila subobscura*: lethal genes and the problem of the O5 inversion.** *Evolution* 1990, **44**:1823-1836.
79. Lutterschmidt WI, Hutchinson VH: **The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point.** *Can J Zool* 1997, **75**:1553-1560.
80. Edgington ES: *Randomization Tests.* 3 edition. New York: Marcel Dekker; 1995.
81. Mather K, Jinks JL: *Introduction to Biometrical Genetics* London: Chapman and Hall; 1977.
82. Mather K, Jinks JL: *Biometrical Genetics: The Study of Continuous Variation.* 3 edition. London: Chapman and Hall; 1982.
83. Sokal RR, Rohlf FJ: *Biometry.* 3 edition. New York: Freeman; 1995.
84. MathWorks Inc: **Matlab, V. 7.5.0.342 (R2007b).** *The Language of Technical Computing* 2007 [http://www.mathworks.com].
85. StatSoft Inc: **STATISTICA (*data analysis software system*), version 9.** 2009 [http://www.statsoft.com].
86. SPSS Inc: *SPSS for Windows* 2006 [http://www.spss.com].

doi:10.1186/1471-2148-10-363
Cite this article as: Dolgova *et al.*: Genetic constraints for thermal coadaptation in *Drosophila subobscura*. *BMC Evolutionary Biology* 2010 **10**:363.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central