



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Análisis de la variabilidad a nivel nucleotídico de la región *rp49* en *Drosophila subobscura*

Julio A. Rozas Liras



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

**Análisis de la variabilidad a nivel nucleotídico
de la región *rp49* en *Drosophila subobscura***

Julio A. Rozas Liras



Barcelona, Diciembre de 1989

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700183140

Análisis de la variabilidad a nivel nucleotídico de la región *rp49*
en *Drosophila subobscura*

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en
Biología por la Universidad de Barcelona por:
JULIO ANTONIO ROZAS LIRAS

Vº Bº



El Director de la Tesis
Dra. Montserrat Aguadé Porres
Catedrático de Genética
Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Barcelona, Diciembre de 1989

AGRADECIMIENTOS

Deseo ante todo mostrar mi gratitud a la Dra. Montserrat Aguadé Porres, directora del presente trabajo, por sus valiosos comentarios y constante estímulo durante la realización de la presente Tesis.

Deseo también expresar mi agradecimiento a J. Balanyà, F. Mestres, M. Monclús, A. Prevosti y Ll. Serra por compartir las líneas de la población de Ter Apel, así como las primeras fases de la extracción de cromosomas.

También quiero agradecer la ayuda de J. Balanyà y J. M. Comerón por su colaboración en las capturas de las poblaciones de Barcelona y Tenerife respectivamente.

Asimismo, deseo expresar mi reconocimiento a todos aquellos que de una u otra manera han contribuido a la realización de este trabajo, y en especial a los miembros del grupo de Genética de Poblaciones y Evolución.

Este trabajo ha sido subvencionado fundamentalmente por la CAYCIT PB85-0157 a M. Aguadé y parcialmente por la CIRIT AR88 a J. Rozas.

Para la realización de esta Tesis J. Rozas ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador desde 1986 a 1989.

INDICE

1 Introducción

1.1	Análisis de la variabilidad	2
1.1.1	Variabilidad a nivel proteico.....	4
1.1.2	Variabilidad a nivel del DNA.....	8
1.1.2.1	Análisis de la variabilidad mediante secuenciación del DNA	9
1.1.2.2	Análisis de la variabilidad mediante enzimas de restricción	11
1.2	La especie objeto de estudio: <i>Drosophila subobscura</i>	23
1.2.1	Colonización de América por <i>D. subobscura</i>	25
1.3	La región genómica objeto de estudio: <i>rp49</i>	27
1.4	Objetivos.....	28

2 Material y Métodos

2.1	Abreviaturas.....	32
2.2	Material.....	33
2.2.1	Productos químicos	33
2.2.2	Equipo instrumental.....	33
2.2.3	Soluciones base.....	34
2.2.4	Material biológico.....	36
2.2.4.1	Cepas de laboratorio.....	36

2.2.4.2 Poblaciones naturales analizadas.....	38
2.2.5 Región genómica estudiada	39
2.3 Métodos	43
2.3.1 Procedimientos generales	43
2.3.1.1 Medio y condiciones de cultivo	43
2.3.1.2 Electroforesis en geles de agarosa	43
2.3.2 Análisis de la variabilidad mediante la técnica de "four-cutter analysis"	46
2.3.2.1 Análisis de ordenaciones cromosómicas	46
2.3.2.2 Obtención de líneas isocromosómicas o heterocigotas sobre un cromosoma marcador.....	49
2.3.2.3 Extracción de DNA genómico.....	51
2.3.2.4 Digestiones de DNA con enzimas de restricción.....	53
2.3.2.5 Electroforesis de acrilamida	56
2.3.2.6 Electrotransferencia y fijación de DNA.....	59
2.3.2.7 Amplificación plasmídica	61
2.3.2.8 Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.....	67
2.3.2.9 Marcaje de DNA por "nick translation"	69
2.3.2.10Hibridación de DNA a filtros de nylon	71
2.3.3 Análisis de las autorradiografías	73
2.3.4 Análisis de los datos.....	74
2.3.4.1 Estimadores de la variabilidad genética.....	74
2.3.4.2 Desequilibrio de ligamiento.....	78
2.3.5 Tratamiento informático.....	80

3 Resultados

3.1 Polimorfismo cromosómico	82
3.2 Variabilidad nucleotídica detectable	85
3.3 Variabilidad en el mapa de restricción	89
3.3.1 Polimorfismos por sustitución nucleotídica	100
3.3.1.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas	105
3.3.1.2 Distribución por zonas funcionales	116
3.3.2 Polimorfismos por inserción-delección	117
3.4 Variabilidad haplotípica	122
3.4.1 Haplotipos por sustitución nucleotídica	122
3.4.1.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas	127
3.4.2 Haplotipos por inserción-delección	129
3.4.2.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas	134
3.4.3 Haplotipos por sustitución nucleotídica e inserción-delección..	135
3.4.3.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas	142
3.5 Identificación de sucesos recombinacionales	143
3.6 Estimación de la variabilidad genética	149
3.6.1 Diversidad haplotípica	149
3.6.1.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas	151
3.6.2 Heterozigosidad por nucleótido	151
3.6.2.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas	153

3.6.2.2 Distribución por zonas funcionales.....	154
3.7 Desequilibrio de ligamiento	158
4 Discusión	
4.1 Variabilidad en las poblaciones europeas	163
4.1.1 Variabilidad por sustitución nucleotídica	163
4.1.2 Variabilidad por inserciones-delecciones	171
4.1.3 Desequilibrio de ligamiento.....	173
4.2 Variabilidad y ordenaciones cromosómicas	176
4.2.1 Origen y diferenciación de las ordenaciones cromosómicas	176
4.2.2 Asociación de polimorfismos con ordenaciones cromosómicas	179
4.2.3 Ordenación cromosómica ancestral	180
4.3 Variabilidad en la población de Tenerife	185
4.4 Variabilidad en la población de Santiago	190
Conclusiones	202
Bibliografía	206

INTRODUCCION



1.1 ANALISIS DE LA VARIABILIDAD

La teoría de la evolución por selección natural sostiene que la evolución es la consecuencia de la interacción entre variación genética y selección. Según el Teorema Fundamental de la Selección Natural de Fisher (Fisher 1930) la tasa de evolución está limitada por la cantidad de variabilidad genética existente en la población. Experimentalmente, Ayala (1965) pudo demostrar que existe una relación directa entre variabilidad genética y tasa de evolución: cuanto mayor es la variabilidad genética que existe en la población mayor es su tasa de evolución. No es sorprendente, pues, que la caracterización de la variabilidad genética -como materia prima imprescindible para la evolución-, su origen, cuantificación, mantenimiento e importancia evolutiva, sea un importante objetivo de la genética de poblaciones.

Desde los inicios de la genética de poblaciones se ha constatado la existencia de una gran cantidad de variabilidad genética en las poblaciones naturales. En un principio, esta variabilidad genética principalmente se observó a través del estudio de caracteres morfológicos (variabilidad de forma, de tamaño, etc) y citológicos (polimorfismos por inversiones, translocaciones). Una aproximación experimental, que confirma la gran cantidad de variabilidad genética existente en las poblaciones naturales para caracteres cuantitativos, son los trabajos de selección artificial. A través de estos experimentos, en los que casi siempre se obtiene una respuesta positiva en el sentido del carácter seleccionado, se ha constatado la existencia de variabilidad genética para casi todos los caracteres cuantitativos.

Sin embargo, mediante este tipo de experimentos, no es posible cuantificar de una manera precisa la cantidad de variabilidad genética existente en las poblaciones naturales. Una importante limitación en la cuantificación de la variabilidad genética mediante los estudios clásicos, era el desconocimiento de la importancia relativa de los loci invariantes por ser únicamente detectables los polimórficos: sólo podían identificarse aquellos loci que presentaban variantes. Al no conocerse la relación de loci polimórficos respecto de monomórficos era imposible una cuantificación correcta de la variabilidad genética.

Paralelamente al trabajo de los experimentalistas, los teóricos iban desarrollando con gran rapidez la teoría matemática de la genética de poblaciones. Sin embargo, existió poca interacción en el trabajo de ambos grupos. Mientras la teoría trabajaba con el concepto de frecuencia génica, el estudio experimental se efectuaba a nivel fenotípico y salvo raros casos (alguna rara mutación visible, el polimorfismo de grupos sanguíneos, etc) era incapaz de proporcionar frecuencias génicas.

Se formularon dos hipótesis sobre la estructura genética de las poblaciones, la hipótesis clásica y la hipótesis equilibradora. La hipótesis clásica, propuesta por Muller, postulaba que cada individuo sería homocigoto en casi todos los loci para el alelo normal presentando en muy pocos el alelo mutante en heterocigosis; esto sería debido a que el alelo mutante, normalmente deletéreo, sería eliminado rápidamente de las poblaciones por selección negativa. El principal papel de la selección natural consistiría en la eliminación de los alelos deletéreos. Una consecuencia de esta hipótesis es que existiría poca variabilidad genética intrapoblacional; la mayor parte de la

variabilidad genética de una especie sería interpoblacional. La hipótesis equilibradora (o del polimorfismo equilibrado), propuesta por Dobzhansky, proponía, por el contrario, que los individuos serían heterocigotos para casi todos los loci y que estos polimorfismos se mantendrían por selección positiva. Como consecuencia, la variabilidad genética intrapoblacional sería muy grande. El origen de estas dos hipótesis proviene en gran medida del tipo de experiencia de sus autores. Así mientras Muller trabajaba en el laboratorio con mutantes de *Drosophila* con un efecto generalmente deletéreo, Dobzhansky al estudiar directamente las poblaciones naturales había observado una enorme cantidad de variabilidad morfológica.

1.1.1 VARIABILIDAD A NIVEL PROTEICO

Con el desarrollo de las técnicas moleculares, permitiendo analizar proteínas, hubo un gran cambio. Debido a la relación ya establecida entre genes y proteínas, puede inferirse la variación genética a partir de la proteica. Desde el momento en que se dispuso de la metodología necesaria para la secuenciación de proteínas, y a pesar de ser un procedimiento extraordinariamente laborioso, se empezaron a acumular secuencias de algunas proteínas en diferentes especies (para una revisión: Nolan & Margoliash 1968; Dayhoff 1972). Fruto del análisis de estas secuencias fué la hipótesis del reloj molecular (para una revisión: Zuckerkandl 1987) en la que se propone que la tasa de sustitución de aminoácidos en las proteínas es aproximadamente constante en el tiempo. Dicha hipótesis proporcionó un método, no basado en características morfológicas, para la construcción de árboles filogenéticos. Sin embargo, al ser la secuenciación de proteínas excesivamente lenta y costosa no ha tenido repercusión a nivel intraespecífico.

Hubby & Lewontin (1966) y Lewontin (1974) proponen los requisitos que debe satisfacer cualquier técnica para poder cuantificar la variabilidad genética existente en las poblaciones:

1. Las diferencias fenotípicas causadas por una substitución en un locus individual tienen que ser detectables en un individuo.
2. Las substituciones alélicas en un locus tienen que ser distinguibles de las ocurridas en otro locus.
3. Todas (o una parte substancial) de las substituciones alélicas deben de ser distinguibles entre sí, independientemente de la intensidad de sus efectos fisiológicos.
4. Los loci estudiados deben de ser una muestra representativa del genoma con respecto a los efectos fisiológicos y al grado de polimorfismo.

El gran cambio en el estudio de la variabilidad genética se produce en 1966 con la introducción de la técnica electroforética (Hubby & Lewontin 1966; Lewontin & Hubby 1966; Harris 1966). La electroforesis es una técnica potente, rápida y simple, que podía satisfacer, con algunas limitaciones -como se verá más adelante-, los cuatro requisitos anteriores; esto permitía obtener estimaciones de las frecuencias génicas y de la variabilidad genética existente en las poblaciones.

Con los primeros estudios realizados con las técnicas electroforéticas se puso de relieve que las poblaciones naturales poseían una enorme cantidad

de variabilidad genética (para una revisión: Wright 1978). Se ha estimado que entre el 20% y el 86% -con una media del 30%- de los loci son polimórficos en las poblaciones y que la heterozigosis por locus fluctúa entre el 6% y el 18% -con una media del 10%- (Lewontin 1974). Este descubrimiento parecía apoyar fuertemente la hipótesis del polimorfismo equilibrado. Sin embargo, la hipótesis clásica no fué rechazada al surgir la teoría neutralista (Kimura 1968; Kimura 1983), también denominada neoclásica, conceptualmente una herencia de la hipótesis clásica. Esta teoría, obviamente, no niega la existencia de la gran cantidad de variabilidad genética existente en las poblaciones -pues ha sido observada-, pero afirma que la mayor parte de la variabilidad detectada a nivel molecular (a nivel proteico por las técnicas electroforéticas, o a nivel del DNA por otras técnicas), es selectivamente neutra, siendo las variantes sometidas a la selección natural casi exclusivamente deletéreas, y por lo tanto, eliminadas por selección negativa. Para los partidarios de la teoría neutralista la mayoría de la variabilidad -a nivel molecular- se mantendría por un equilibrio entre la mutación y la deriva genética. Por el contrario, los partidarios de la hipótesis equilibradora a nivel molecular -o seleccionistas- proponen que la selección natural (selección positiva) sería el mecanismo responsable del mantenimiento de la variabilidad. La importancia de la variabilidad a nivel molecular y los mecanismos implicados en su mantenimiento ha originado una interesante controversia (para una revisión: Ayala 1972; Lewontin 1973, 1974) muy viva aún en la actualidad.

Con las técnicas electroforéticas iniciales sólo era detectable una parte de las substituciones de aminoácidos, -del orden de un tercio (Shaw 1970; Lewontin 1974). Los electromorfos detectados podían ser genéticamente heterogéneos, por lo que se aplicarían incorrectamente algunas fórmulas

teóricas a los datos (King & Ohta 1975). Además, sólo eran analizables las proteínas solubles de tipo enzimático. Para la detección de esta variabilidad oculta existente en las poblaciones naturales, y para evitar un sesgo en la muestra de los loci, se realizaron modificaciones en las condiciones de las técnicas electroforéticas iniciales. Así se utilizó la desnaturalización por calor (Bernstein et al. 1973), la electroforesis secuencial (Singh et al. 1976) -con una potencia suficiente como para detectar el 85% de la variabilidad por cambios de aminoácido en hemoglobinas humanas (Ramshaw et al. 1979)-, la electroforesis bidimensional (Leigh Brown & Langley 1979) o la desnaturalización por urea (Loukas et al. 1981). Otras técnicas experimentales utilizadas para analizar la variabilidad a nivel proteico han sido el análisis de los mapas peptídicos (Fletcher et al. 1978) y los estudios con técnicas inmunológicas -uso de anticuerpos monoclonales- (Slaughter et al. 1981).

Aún con la electroforesis secuencial, la cuantificación de la variabilidad genética existente en las poblaciones o especies quedaba sujeto a varias limitaciones:

- a) Posiblemente se está sesgando la cuantificación de la variabilidad por analizar -casi exclusivamente- proteínas solubles de tipo enzimático. Esta limitación puede superarse ya que es posible analizar la variabilidad en proteínas de tipo estructural, regulador, etc. -mediante técnicas como la electroforesis bidimensional, el análisis de los mapas peptídicos o los estudios con técnicas inmunológicas-; aún disponiéndose de las técnicas adecuadas, se han realizado muy pocos estudios.

- b) El análisis se ciñe exclusivamente a regiones codificadoras, aún cuando una parte muy importante del genoma no codifica para proteínas.
- c) Las técnicas electroforéticas no pueden detectar las sustituciones silenciosas del DNA, es decir aquellas que no provocan sustitución de aminoácido.

1.1.2 VARIABILIDAD A NIVEL DEL DNA

Los primeros estudios de la variabilidad a nivel del DNA se efectuaron mediante la técnica de hibridación DNA-DNA (Hoyer et al. 1964; Laird et al. 1969; Bonner et al. 1973). Este método que está basado en la capacidad del DNA desnaturalizado de renaturalizarse, permite cuantificar diferencias nucleotídicas mediante el análisis de la estabilidad térmica de cadenas de DNA híbridas. Esta técnica, con la que se puede estudiar la divergencia nucleotídica de todo el genoma, aún se utiliza como herramienta en la determinación de relaciones filogenéticas. Sin embargo, la técnica no tiene suficiente potencia para estudiar la variabilidad a nivel intraespecífico.

Es a partir de la utilización de las técnicas de ingeniería genética cuando los genéticos de poblaciones han tenido la posibilidad de analizar directamente la variabilidad a nivel del DNA en regiones concretas del genoma. Con estas técnicas se pueden superar las limitaciones que presentaba el análisis de la variabilidad proteica. Es posible analizar los polimorfismos en cualquier región del genoma -incluso desconociéndose su función- e independientemente de su expresión génica. Se puede analizar la variabilidad en diferentes regiones funcionales de un gen: exones, intrones, zonas transcritas y no traducidas, zonas colindantes, etc. Además, los cambios

nucleotídicos en la zona codificadora pueden desglosarse en silenciosos y no silenciosos. Por otra parte, estas técnicas han posibilitado el estudio y comparación de diferentes tipos de DNA (DNA nuclear, DNA mitocondrial, DNA del cloroplasto). Otra gran aportación de los estudios de la variabilidad al nivel del DNA es que proporcionan haplotipos por medio de los cuales se pueden construir filogenias, analizar posibles sucesos recombinacionales, estudiar el papel de la migración, etc.

La comparación de los primeros análisis nucleotídicos con los efectuados a nivel proteico ha mostrado que la variabilidad genética no detectada era enorme: a nivel del DNA los individuos son heterocigotos casi para todos sus loci, tal como propugnaban los partidarios más extremistas de la hipótesis equilibradora. El análisis a nivel del DNA ha revelado, además, una nueva fuente de variación, la debida a elementos transponibles; de hecho, un gran número de los mutantes clásicos de *Drosophila melanogaster* han resultado ser debidos a inserciones o deleciones imprecisas de estos elementos (Rubin 1983).

1.1.2.1 Análisis de la variabilidad mediante secuenciación del DNA

El rápido avance de las técnicas de ingeniería genética y en concreto el desarrollo de la metodología necesaria para la secuenciación de DNA (Maxam & Gilbert 1977; Sanger et al. 1977) ha posibilitado que en los últimos años se hayan acumulado un gran número de secuencias, tanto del DNA nuclear como mitocondrial, por lo que se han podido realizar numerosos análisis de secuencias desde una óptica evolutiva (Salser & Isaacson 1976; Kimura 1977; Kafatos et al. 1977; Goddard et al. 1981; Brown et al. 1982;

Aquadro & Greenberg 1983; Greenberg et al. 1983; para una revisión: Li et al. 1985; Brown 1985).

En *Drosophila* se han realizado varios trabajos de gran interés para la genética molecular evolutiva. A nivel interespecífico destacan los análisis de secuencias del locus *Adh* (Bodmer & Ashburner 1984; Cohn et al. 1984; Coyne & Kreitman 1986; Schaeffer & Aquadro 1987; Cohn & Moore 1988), *hsp82* (Blackman & Meselson 1986), *rp49* (Aguadé 1988a), *Xdh* (Riley 1989), *hsw* (Garbe et al. 1989); y el trabajo de Sharp & Li (1989) de comparación de tasas de sustitución nucleotídica entre el DNA mitocondrial y nuclear. Sin embargo, debido a que la inversión de tiempo y dinero es muy alta, a nivel intraespecífico casi no se ha efectuado ningún trabajo, destacándose los realizados en el locus *Adh* (Kreitman 1983); en el locus *Est6* (Cooke & Oakeshott 1989) y en el locus de la histona H3 (Matsuo & Yamazaki 1989). Estos trabajos han mostrado que las tasas de cambio nucleotídico son muy diferentes en distintas regiones funcionales. En las zonas codificadoras, por otra parte, los cambios silenciosos presentan una frecuencia superior a los no silenciosos.

El análisis de las secuencias de DNA no tan sólo ha posibilitado el estudio a niveles no accesibles hasta ese momento (comparación de las tasas de cambio nucleotídico silencioso respecto de no silencioso, comparación de la tasa de sustitución nucleotídica de los cuatro nucleótidos, etc.), sino que ha desvelado nuevas cuestiones (desvío en el uso de codones, desvío de transversiones respecto a transiciones). El estudio de estas cuestiones se prevé que aportará gran información sobre la importancia relativa de los distintos mecanismos evolutivos en la generación y mantenimiento del polimorfismo a

nivel de DNA, al permitir poner a prueba diferentes predicciones de las teorías neutralista y seleccionista.

La secuenciación del DNA es la técnica óptima para el estudio de la variabilidad genética del DNA por proporcionar una información completa de la región objeto de análisis. Aunque ha habido varias innovaciones que optimizan la técnica de secuenciación, al no poder secuenciarse varios alelos con un gasto de tiempo y dinero razonable, esta técnica ha resultado aún impracticable para la genética de poblaciones. Por eso, el análisis de la variabilidad nucleotídica a nivel poblacional se ha efectuado hasta la actualidad mediante comparación de mapas de restricción. Sin embargo, la reciente disponibilidad de la técnica PCR -"polymerase chain reaction"- (Saiki et al. 1985, 1988) va a posibilitar a los genéticos de poblaciones el análisis de la variabilidad nucleotídica mediante secuenciación. Esta técnica permite amplificar directamente una región concreta de DNA a partir del DNA total y su siguiente secuenciación (para una revisión: White et al. 1989). La técnica PCR hará posible la secuenciación de una región genómica en varios individuos de una población obviando la realización de genotecas y con una inversión razonable de tiempo y dinero.

1.1.2.2 Análisis de la variabilidad mediante enzimas de restricción

La comparación de mapas de restricción es la técnica más empleada para el análisis de la variabilidad genética a nivel del DNA. Esta técnica no detecta toda la variación genética, pero al ser mucho más rápida, simple y menos costosa que la secuenciación del DNA, hace que sea la técnica idónea para muchos estudios evolutivos al nivel del DNA.

a) VARIABILIDAD EN EL DNA MITOCONDRIAL

Como sistema de estudio el genoma mitocondrial es de gran interés por ser mucho más pequeño y menos complejo que el procariota o eucariota (para una revisión: Brown 1985; Wilson et al. 1985; Avise et al. 1987; Moritz et al. 1987). Debido a una mayor simplicidad técnica, los análisis de patrones de restricción se realizaron con anterioridad en este tipo de DNA que en el nuclear. Entre los primeros estudios destacan los efectuados en mamíferos (Brown & Vinograd 1974; Potter et al. 1975; Levings III & Pring 1976; Upholt & Dawid 1977; Buzzo et al. 1978; Brown & Wright 1979; Avise et al. 1979a, 1979b; Brown et al. 1979; Brown 1980; Brown & Simpson 1981; Denaro et al. 1981; Ferris et al. 1981a, 1981b). El análisis de la variabilidad en el DNA mitocondrial de *Drosophila* se inició con posterioridad (entre los primeros estudios: Shah & Langley 1979; Fauron & Wolstenholme 1980; Powell 1983; Solignac et al. 1983, 1984; Baba-Aïssa & Solignac 1984).

De los estudios realizados se desprende que existe una gran variabilidad genética en el DNA mitocondrial. En este genoma se ha observado tanto variabilidad intraespecífica, como intrapoblacional, habiéndose observado incluso variabilidad intraindividual (Solignac et al. 1983). Es sorprendente el descubrimiento de que en los vertebrados la tasa de cambio nucleotídico es mayor para este tipo de DNA que la del DNA nuclear (Brown et al. 1979), -particularidad no confirmada para otros organismos (Powell et al. 1986; Vawter & Brown 1986)-. Esta alta tasa evolutiva del DNA mitocondrial de los vertebrados contrasta con una rígida conservación en el tamaño y en la organización génica (Brown 1985).

La información proporcionada en los análisis del DNA mitocondrial es cualitativamente diferente a la del DNA nuclear, debido a su mecanismo de transmisión genética -presenta herencia uniparental- y a la inexistencia de recombinación (salvo en algún caso extraño). Estas características del DNA mitocondrial, junto a la mayor tasa de cambio en algunos organismos, hacen que este tipo de DNA sea una herramienta útil para la genética evolutiva. Por un lado, se pueden realizar filogenias tanto a nivel interespecífico como intraespecífico evitándose las ambigüedades que puede producir la recombinación. Por otro lado, al ser el DNA mitocondrial más sensible a los cuellos de botella poblacionales -debido a su mecanismo de herencia-, se pueden efectuar interesantes estudios sobre la estructura de las poblaciones, en especial sobre la importancia de la migración y de los procesos colonizadores.

b) VARIABILIDAD EN EL DNA NUCLEAR

El análisis de variabilidad a nivel del DNA nuclear por enzimas de restricción se realiza clásicamente mediante la técnica de Southern (Southern 1975). Al ser el análisis del DNA nuclear técnicamente más complejo que el del DNA mitocondrial no es de extrañar que aún en la actualidad existan menos estudios. Entre los estudios iniciales sobresalen los realizados en humanos en el "cluster" del gen de la β -globina (Kan & Dozy 1978; Jeffreys 1979; Antonarakis et al. 1982a, 1982b), en la α -globina (Higgs et al. 1981; Orkin et al. 1982), en la *insulina* (Rotwein et al. 1981) y en una región de función desconocida (Wyman & White 1980). Sin embargo, los trabajos de análisis de la variabilidad con mayor repercusión para la genética de poblaciones se han realizado en *Drosophila*, tanto a nivel interespecífico como intraespecífico. Entre los trabajos iniciales cabe destacar los de Leigh Brown

& Ish-Horowicz (1981), Langley et al. (1982), Leigh Brown (1983), Birley (1984), Aquadro et al. (1986) y Kreitman & Aguadé (1986b).

Estos estudios han proporcionado una gran información tanto cualitativa como cuantitativa sobre la variabilidad nucleotídica. Se ha comprobado que una fracción importante de la variabilidad es debida a inserciones-delecciones de gran tamaño que presumiblemente corresponden a elementos transponibles, como han podido confirmar Leigh Brown (1983) y Aquadro et al. (1986). A nivel de sustituciones nucleotídicas se ha encontrado que como promedio uno de cada 40 nucleótidos es polimórfico en una población determinada. Sin embargo, son pocos los trabajos que se han realizado hasta nuestros días: por un lado, hace falta estudiar diferentes tipos de loci situados en distintas posiciones cromosómicas y en varias especies y por otro desarrollar métodos de contraste de los diferentes niveles de variabilidad obtenidos.

1. Técnicas utilizadas

El análisis de la variabilidad en loci nucleares mediante enzimas de restricción se ha efectuado a través de dos técnicas: la técnica de Southern (Southern 1975) y la técnica "four-cutter analysis" (Kreitman & Aguadé 1986a). Ambas técnicas permiten el análisis de varios alelos en un tiempo relativamente corto de tiempo. Sin embargo, la técnica "four-cutter analysis" tiene un potencia mucho mayor en la identificación de polimorfismos.

En el análisis de la variabilidad nucleotídica mediante la técnica de Southern se utilizan geles de agarosa para separar electroforéticamente el DNA

digerido con enzimas de restricción. Debido a la poca resolución de los geles de agarosa para fragmentos de DNA de tamaño pequeño, no se pueden detectar ni los fragmentos pequeños de DNA ni inserciones o deleciones de pocos pares de bases. Además esta técnica, debido a la limitación de los geles de agarosa, típicamente utiliza enzimas de restricción que reconocen dianas de 6 pares de bases por lo que son pocas las posiciones de restricción detectables en un fragmento determinado de DNA. Un enzima de restricción que reconozca una diana de 6 pares de bases cortará el DNA cada 4096 nucleótidos si los cuatro nucleótidos fueran equifrecuentes y se distribuyeran al azar en el DNA.

La técnica "Four-cutter analysis" (para una revisión: Aguadé 1987) obvia algunas limitaciones importantes de la técnica de Southern para el análisis de la variabilidad genética. Utiliza geles de secuenciación, que proporcionan una buena resolución para fragmentos pequeños, y enzimas de restricción que reconocen dianas de 4 pares de bases. Un enzima de restricción que reconozca una diana de 4 pares de bases cortará el DNA cada 256 nucleótidos suponiendo equifrecuencia y distribución nucleotídica al azar (cortando el DNA con una frecuencia 16 veces superior a la de los enzimas de restricción que reconozcan dianas de 6 pares de bases). Permite identificar un elevado número de posiciones variables en regiones pequeñas del genoma (de 1 a 4 kilobases), siendo capaz de detectar de un 15% a un 30% de todos los cambios nucleotídicos de una región determinada. Con esta técnica prácticamente es posible detectar todas las inserciones-deleciones incluso las de tan sólo un par de bases. Además, al posibilitar el análisis a un nivel muy fino, es posible distribuir los niveles de variabilidad obtenidos entre diferentes regiones funcionales (región codificadora, regiones flanqueantes, etc.).

En la mayoría de los análisis de la variabilidad en el DNA nuclear de *Drosophila* se han comparado los mapas de restricción efectuados según la técnica de Southern. Por la técnica de "four-cutter analysis" existen, no obstante, 6 trabajos, 5 de ellos realizados en *D. melanogaster* -en la región *Adh* (Kreitman & Aguadé 1986a, 1986b; Aguadé 1988b; Simmons et al. 1989) y en la región *white* (Miyashita & Langley 1988)- y uno en *D. pseudoobscura* -en la región *rosy* (Riley et al. 1989)-.

2. Aportaciones más relevantes

Langley et al. (1982) fueron los pioneros en analizar los polimorfismos nucleotídicos existentes en un locus nuclear de *Drosophila*. En su estudio de la región *Adh*, constataron la existencia de una gran variabilidad genética -en las 18 líneas analizadas en *D. melanogaster* detectaron 4 polimorfismos por sustitución nucleotídica y 5 por inserción-delección, identificando 11 haplotipos distintos-. La heterocigosidad por nucleótido (probabilidad de que para un par nucleotídico concreto se tenga un heterocigoto al tomar dos cromosomas homólogos al azar) estimada fué de 0.006 (dos cromosomas homólogos escogidos al azar difieren en uno de cada 167 nucleótidos).

En posteriores estudios de otras poblaciones en la región *Adh* de *D. melanogaster* se han obtenido niveles similares de variabilidad (Birley 1984; Cross & Birley 1986; Aquadro et al. 1986; Kreitman & Aguadé 1986a; Jiang et al. 1988). Además, este nivel de polimorfismo es de un mismo orden en la mayoría de regiones de *D. melanogaster* -*Amy* (Langley et al. 1988), *Notch* (Schaeffer et al. 1988), *rosy* (Aquadro et al. 1988), *white* (Langley & Aquadro

1987; Miyashita & Langley 1988), *zeste-tko* (Aguadé et al. 1989b)- con la clara excepción de la región *yellow-achaete-scute* (Aguadé et al. 1989a) con un menor nivel de variabilidad.

Los niveles de variabilidad nucleotídica, sin embargo, son diferentes en otras especies de *Drosophila*. Schaeffer et al. (1987) en un estudio de la región *Adh* de *D. pseudoobscura* han obtenido un mayor polimorfismo que en *D. melanogaster* -identificaron 19 haplotipos distintos en las 19 líneas analizadas- estimando en 0.023 la heterozigosidad por nucleótido. No obstante, Riley et al. (1989) han estimado una heterozigosidad menor (0.010) en la región *rosy* también de *D. pseudoobscura*. Esta menor heterozigosidad de la región *rosy* respecto a la de la región *Adh* puede en parte explicarse por el hecho de que la fracción genómica analizada por Riley et al. (1989) fué mayoritariamente codificadora, y probablemente con una mayor limitación al cambio que en el estudio de Schaeffer et al. (1987) que analizaron principalmente zonas no codificadoras. Aquadro et al. (1988) en la región *rosy* de *D. simulans* también han obtenido unos niveles de polimorfismo nucleotídico mayores que en *D. melanogaster*. Sin embargo, en un estudio realizado en las regiones *forked* y *vermillion* de *D. ananassae*, Stephan & Langley (1989) han obtenido unos niveles de variabilidad similares a los de *D. melanogaster*.

Kreitman & Aguadé (1986b) han estudiado la variabilidad nucleotídica en distintas zonas funcionales de la región *Adh* de *D. melanogaster*, y al compararla con la divergencia nucleotídica existente en la secuencia de esta misma región entre *D. melanogaster* y *D. simulans* han detectado un exceso significativo de polimorfismos silenciosos en la región

codificadora respecto a las zonas flanqueantes. Hudson et al. (1987) han desarrollado un test basado en la predicción de la teoría neutralista de que las regiones que a nivel interespecífico evolucionan a una alta tasa, a nivel intraespecífico deberían presentar niveles altos de polimorfismo. Tras aplicar el test a los datos de la divergencia de la región 5' y codificadora del locus *Adh* entre *D. melanogaster* y *D. sechellia* y los del polimorfismo de *D. melanogaster* en estas mismas regiones, concluyen que existe una desviación de la predicción de la teoría neutralista, siendo los datos compatibles con la existencia de un polimorfismo equilibrado. Miyashita & Langley (1988) en su estudio a nivel intraespecífico del locus *white* de *D. melanogaster*, por el contrario, han observado un nivel similar de polimorfismos silenciosos en la región 5' que en la unidad transcripcional.

Quizás, el aspecto más novedoso de los estudios de la variabilidad nucleotídica es el referente a la alta incidencia de inserciones y deleciones en las poblaciones naturales, habiéndose detectado, prácticamente, en todos los estudios realizados. Langley et al. (1982) observaron inserciones-deleciones de 20 hasta 900 pares de bases en la región *Adh* de *D. melanogaster*. Leigh Brown (1983) en la región *hsp70* de *D. melanogaster* ha detectado también varias inserciones-deleciones, desde 100 pares de bases hasta 7.5 kb; una de estas inserciones ha sido identificada como un elemento transponible -el elemento *mdg-4* de 7.5 kb, un elemento clasificado como "copia-like"-. Aquadro et al. (1986) han analizado la variabilidad nucleotídica en la región *Adh* en 48 líneas de *D. melanogaster*, observando que el 85% de las líneas presentaban al menos una inserción o deleción -desde 21 pb hasta 10.5 kb- respecto a la secuencia consensuada. En este estudio, además, se ha comprobado que todas las inserciones mayores de 200 pb tenían homología

con algún elemento transponible (*copia*, *B104*, *2161*, *101F*). Si bien las inserciones-delecciones de tamaño grande en conjunto son comunes en las poblaciones, individualmente cada una de ellas segrega a una baja frecuencia -normalmente son únicas- por lo que se ha sugerido que tendrían un efecto deletéreo (Langley et al. 1982; Aquadro et al. 1986; Golding et al. 1986).

Sin embargo, esta alta incidencia de las inserciones-delecciones no está presente en todas las especies de *Drosophila*. Mientras en *D. ananassae* (Stephan & Langley 1989) las inserciones-delecciones se presentan con una tasa similar a la de *D. melanogaster*, en *D. simulans* (Aquadro et al. 1988) y *D. pseudoobscura* (Schaeffer et al. 1987) apenas existen. Aquadro et al. (1988) han comparado la variabilidad existente en la región *rosy* de *D. simulans* con la de *D. melanogaster*, no observando ninguna inserción-delección en la primera especie pese a presentar una tasa de sustitución nucleotídica seis veces mayor que la de *D. melanogaster*, mientras que en *D. melanogaster* detectaron 4 inserciones-delecciones distintas. En la región *Adh* de *D. pseudoobscura*, también con una alta tasa de polimorfismo por sustitución nucleotídica, Schaeffer et al. (1987) sólo han observado dos pequeñas inserciones-delecciones (de 50 y 200 pb).

Aquadro et al. (1988) comentan que tanto esta reducción del polimorfismo por inserciones-delecciones como el también observado aumento del polimorfismo por sustitución nucleotídica observado en la región *rosy* de *D. simulans* y *Adh* de *D. pseudoobscura* respecto a las mismas regiones de *D. melanogaster* pueden ser explicados por un mayor tamaño efectivo poblacional. Según la teoría neutralista la heterozigosidad esperada es aproximadamente igual a $4N_e\mu$, donde N_e es el tamaño efectivo poblacional y μ es la tasa de

mutación por nucleótido hacia alternativas selectivamente neutras. Por lo tanto, un aumento del tamaño efectivo tiene como consecuencia un aumento de la heterozigosidad si las tasas de mutación son iguales. Además, si las variantes no son estrictamente neutras sino ligeramente deletéreas (Ohta 1976), este mayor tamaño efectivo poblacional también tendría como consecuencia un aumento de la selección purificadora, que haría disminuir la tasa de inserciones-delecciones. Estas variantes ligeramente deletéreas se comportarían como neutras si $2N_e s < 1$, donde s es la desventaja selectiva. Por lo tanto, al aumentar el tamaño efectivo poblacional algunas variantes que se comportaban como neutras se comportarán como deletéreas, por lo que aumentará la intensidad de la selección purificadora. Según Kimura (1979) a pesar de este aumento en la intensidad de selección, la heterozigosidad también aumentaría aunque más lentamente.

Varios autores han observado la existencia de desequilibrios de ligamiento entre polimorfismos nucleotídicos en *D. melanogaster*, en la región *Adh* (Langley et al. 1982; Birley 1984; Cross & Birley 1986; Aquadro et al. 1986), en la región *white* (Miyashita & Langley 1988) y en la región *yellow-achaete-scute* (Aguadé et al. 1989a; Beech & Leigh Brown 1989). En las regiones *Amy* (Langley et al. 1988), *Notch* (Schaeffer et al. 1988) y *zeste-tko* (Aguadé et al. 1989b) existe una menor incidencia de desequilibrios de ligamiento. Los desequilibrios de ligamiento entre posiciones polimórficas muy cercanas (del orden de pocas kilobases), por lo tanto con una baja recombinación entre ellas, pueden ser explicados fácilmente por mecanismos no selectivos (deriva, endogamia, migración, "hitch-hiking", subdivisión de poblaciones). Miyashita & Langley (1988), en el estudio de la región *white*, observaron una disminución progresiva del desequilibrio al aumentar la

distancia entre los polimorfismos, tal como se esperaría según las predicciones teóricas (Hill & Robertson 1968). En este trabajo se constató que el equilibrio de ligamiento se alcanzaba a partir de distancias de tan sólo 2 kb. Si la tasa de recombinación fuera más baja se esperaría detectar desequilibrios significativos entre posiciones polimórficas más alejadas. Esta predicción ha sido confirmada en la región *yellow-achaete-scute* de *D. melanogaster* en donde posiciones separadas por unas 80 kb se muestran en desequilibrio de ligamiento (Aguadé et al. 1989a; Beech & Leigh Brown 1989; Eanes et al. 1989b). Sin embargo, Aquadro et al. (1986) indican que los mecanismos no selectivos no pueden explicar por si solos los desequilibrios de ligamiento observados en la región *Adh* de *D. melanogaster*; estos desequilibrios serían el producto de una historia evolutiva compleja influenciada por "hitch-hiking" con alguna variante selectivamente favorecida. Los resultados de Miyashita & Langley (1988) que han observado un mayor acúmulo de desequilibrios de ligamiento entre posiciones polimórficas localizadas en la zona transcripcional, tampoco son fácilmente explicables por mecanismos no selectivos. Estos autores comentan que este acúmulo podría ser explicado por epistasis entre polimorfismos y "hitch-hiking" de las regiones cercanas.

Simmons et al. (1989) han estudiado extensamente la variabilidad nucleotídica en la región *Adh* en tres poblaciones de *D. melanogaster*, con variación en la frecuencia de los electromorfos *fast* y *slow* a lo largo de una clina. Los resultados de este estudio, tras analizar las similitudes y diferencias entre las poblaciones, apoyan la participación de la selección natural en el mantenimiento de la clina.

También se ha estudiado la variabilidad nucleotídica de una región determinada en diferentes ordenaciones cromosómicas. Aquadro et al. (1986) han analizado la variabilidad en la región *Adh* en 49 líneas de *D. melanogaster* identificando 2 haplotipos distintos entre las 5 líneas que presentaban la ordenación cromosómica *In(2L)t* (el resto de las líneas presentaban la ordenación *St*). Estos autores comentan que si las ordenaciones cromosómicas tienen un origen único, uno de los haplotipos se tuvo que originar por recombinación entre las dos ordenaciones cromosómicas. Agudé (1988b) en un estudio mucho más amplio, analizó la variabilidad nucleotídica en la región *Adh* en 79 líneas (40 de la ordenación *In(2L)t* y 39 de la ordenación *St*) de *D. melanogaster* y su distribución por diferentes ordenaciones cromosómicas. Dicho estudio permitió detectar la existencia de polimorfismos compartidos y por tanto de recombinación o conversión génica entre ordenaciones cromosómicas diferentes.

1.2 LA ESPECIE OBJETO DE ESTUDIO: *DROSOPHILA SUBOBSCURA*

Drosophila subobscura es una especie paleártica del grupo *obscura* que presenta una amplia área de distribución. Se extiende por toda Europa -excepto en el norte y centro de Escandinavia-, norte de Africa, próximo oriente -aunque no se conoce bien su límite oriental- y en las islas Azores, Canarias y Madeira. Debido a su gran abundancia en gran parte del área de distribución, *D. subobscura* constituye un material idóneo para los genéticos de poblaciones y ha representado en Europa un papel similar al de *D. pseudoobscura* para los investigadores de Norteamérica.

A causa de esta idoneidad se han realizado una gran cantidad de trabajos de interés genético, ecológico y evolutivo. Los aspectos genéticos más estudiados han sido los referentes al polimorfismo cromosómico, enzimático así como las asociaciones entre ambos.

D. subobscura presenta un cariotipo de 5 cromosomas acrocéntricos -denominados A, E, J, O y U- y uno puntiforme. Todos los cromosomas acrocéntricos presentan polimorfismo para inversiones, habiéndose detectado unas 80 ordenaciones cromosómicas diferentes. Las distintas ordenaciones cromosómicas muestran una distribución clinal: las ordenaciones standard de todos los cromosomas segregan a una alta frecuencia en el norte de Europa, disminuyendo su frecuencia con la latitud (para una revisión: Krimbas & Loukas 1980).

El polimorfismo enzimático (Lakovaara & Saura 1971; Saura et al. 1973; Loukas et al. 1979b; Pinsker & Sperlich 1979), así como las

asociaciones entre los polimorfismos cromosómico y enzimático (Zouros & Krimbas 1973; Zouros et al. 1974; Loukas & Krimbas 1975; Charlesworth et al. 1979; Loukas et al. 1979a, 1980b; García & Prevosti 1981; Prevosti et al. 1983b) también han sido estudiados extensamente. A partir de estos estudios se ha constatado la existencia de fuertes asociaciones entre ambos tipos de polimorfismo en *D. subobscura*; sin embargo, dentro de una ordenación cromosómica raramente se han detectado asociaciones entre loci enzimáticos (para una revisión: Zapata & Alvarez 1987).

Otros estudios que se han abordado en *D. subobscura* han sido: la variabilidad genética en caracteres cuantitativos (Prevosti 1955), distintos aspectos ecológicos (Monclús 1964; Begon 1976; Shorrocks 1977; Loukas & Krimbas 1979; Serra et al. 1987), la variabilidad genética que afecta a la viabilidad (Sperlich et al. 1977; Loukas et al. 1980a; Pfriem & Sperlich 1982; Mestres et al. 1990), el aislamiento y selección sexual (Constantí et al. 1986; Pascual et al. 1986; Santos et al. 1986), y el patrón de actividad de los "puffs" en distintas ordenaciones cromosómicas (De Frutos & Latorre 1982; De Frutos et al. 1987; Latorre et al. 1988b).

En *D. subobscura* se ha iniciado también el estudio de la variabilidad a nivel del DNA. A nivel intraespecífico, se ha analizado la variabilidad existente en el DNA mitocondrial mediante enzimas de restricción (Latorre et al. 1986; Afonso et al. 1990; Rozas et al. 1990). A partir de estos estudios, en los que se han detectado 26 haplotipos distintos, se ha puesto de manifiesto la existencia de una gran variabilidad genética en el DNA mitocondrial de esta especie. A nivel interespecífico, han sido comparados los mapas de restricción de diferentes especies del grupo *obscura*, entre ellas *D.*

subobscura (Latorre et al. 1988a). También se han realizado comparaciones interespecíficas de secuencias de genes nucleares: en el locus *rp49* -*D. subobscura* con *D. melanogaster*- (Aguadé 1988a) y los loci *s15*, *s16* y *s19* -*D. subobscura*, *D. virilis*, *D. grimshawi* y *D. melanogaster*- (Martínez-Cruzado et al. 1988; Fenerjian et al. 1989). Por último, cabe mencionar el trabajo efectuado por Loukas et al. (1986) que han abordado el análisis de la variabilidad en el DNA nuclear de 27 especies distintas de *Drosophila*, entre ellas *D. subobscura*, mediante la cuantificación del nivel de hibridación del DNA genómico de estas especies con varios clones de secuencia única de *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura* y *D. grimshawi*.

1.2.1. COLONIZACIÓN DE AMERICA POR *D. SUBOBSCURA*.

En febrero de 1978, *Drosophila subobscura* se encontró por primera vez en Puerto Montt (Chile) (Brncic et al. 1981). A partir de entonces *D. subobscura* se fué extendiendo y asentando establemente por todo Chile y parte de Argentina, siendo incluso la especie dominante en algunas poblaciones, en un área en la que anteriormente nunca se había encontrado (Budnik & Brncic 1982; Prevosti et al. 1983a; López 1985; Brncic et al. 1985; Prevosti et al. 1987).

Posteriormente, en 1982, se encontró también en Norteamérica (Beckenbach 1984; Beckenbach & Prevosti 1986), donde, al igual que en Sudamérica, nunca se había hallado esta especie con anterioridad y donde se extendió y asentó establemente en la costa occidental, llegando a ser dominante en algunas localidades (Prevosti et al. 1987).

Esta rara doble colonización natural en una especie bien caracterizada en su área original, brinda una maravillosa oportunidad para los genéticos de poblaciones al permitirles abordar diferentes preguntas de gran importancia evolutiva sobre el proceso de la colonización. Además, puede proporcionar respuesta a la problemática del valor adaptativo de algunos polimorfismos. Con este fin se han realizado una serie de estudios para obtener información sobre el número de colonizadores, posible área de origen de éstos, comparación de las dos colonizaciones, etc.

Los resultados obtenidos a partir de los análisis efectuados en el polimorfismo cromosómico, enzimático y del DNA mitocondrial en Norte y Sudamérica apoyan la hipótesis de un mismo proceso colonizador, aunque, sin embargo, no han permitido determinar el área de procedencia de los individuos colonizadores (Brncic et al. 1982; Prevosti et al. 1982 y 1983b; Beckenbach & Prevosti 1986; Latorre et al. 1986; Prevosti et al. 1988; Rozas et al. 1990).

Los datos del polimorfismo cromosómico por inversiones de las poblaciones colonizadoras han evidenciado la existencia de correlaciones entre la frecuencia de las ordenaciones cromosómicas (tanto en las poblaciones de Norteamérica como de Sudamérica) y la latitud. Al ser estas correlaciones del mismo signo que las encontradas en el área original de distribución de la especie han sido interpretadas como un soporte importante del valor adaptativo del polimorfismo cromosómico por inversiones (Prevosti et al. 1985 y 1988).

1.3 LA REGION GENOMICA OBJETO DE ESTUDIO: *rp49*

El locus *rp49* de *Drosophila* es un locus de secuencia única que codifica para la proteína ribosómica 49. Este locus fué el primer locus codificador de una proteína ribosómica clonado en *Drosophila* (en *D. melanogaster*) (Vaslet et al. 1980). El gen *rp49* de *D. melanogaster*, localizado en la posición 99D (brazo derecho del cromosoma 3), consta de 2 exones de 31 y 103 codones, separados de un pequeño intrón de 59 pares de bases (O'Connell & Rosbash 1984; Aguadé 1988a). Kongsuwan et al. (1985) han comprobado mediante experimentos de "rescate" por transformación que el locus *rp49* corresponde al locus *Minute* localizado en posición 99D de *D. melanogaster*: la ausencia de esta proteína determinaría un fenotipo *Minute*. Por lo tanto, existe identidad entre el locus *Minute* 99D y el locus *rp49*.

El locus *rp49* de *D. subobscura*, al igual que el de *D. melanogaster*, es de secuencia única y presenta 2 exones de 31 y 103 codones. En *D. subobscura* la longitud del intrón es de 62 pares de bases (Aguadé 1988a). Este gen está localizado en la posición 91C, en el cromosoma O, muy cerca del punto de rotura de la inversión cromosómica O₃.

La elección de este locus tiene un doble interés. Por un lado, al codificar para una proteína estructural, pertenece a un tipo de loci del que apenas se ha estudiado su variabilidad a nivel nucleotídico. Por otro, al estar localizado en una región cromosómica con un gran polimorfismo cromosómico por inversiones (segmento I del cromosoma O, muy cerca del punto de rotura de la inversión cromosómica O₃) permite que sea utilizado como marcador de diferentes ordenaciones cromosómicas.

1.4 OBJETIVOS

En este trabajo se ha analizado, mediante comparación de mapas de restricción según la técnica "four-cutter analysis", la variabilidad nucleotídica existente en la región *rp49* en poblaciones naturales de *Drosophila subobscura*. Se han estudiado 4 poblaciones naturales, dos poblaciones del área central de distribución de la especie (Barcelona y Ter Apel -localidad del norte Holanda-), una población insular (Tenerife) y una población del área recientemente colonizada por la especie (Santiago de Chile). Los objetivos que se persiguen con este análisis son los siguientes:

1) Estudio de la variabilidad nucleotídica existente en poblaciones naturales del área central de *D. subobscura*.

Se pretende analizar la variabilidad nucleotídica existente (substituciones nucleotídicas, inserciones, deleciones) así como su distribución en las distintas zonas funcionales del locus *rp49* (zonas flanqueantes 5' y 3', zona codificadora) y comparar dichos resultados con los obtenidos por otros investigadores en distintas especies.

En la actualidad se han realizado pocos trabajos de análisis de la variabilidad a nivel del DNA nuclear en *Drosophila* y de ellos tan sólo cuatro lo han sido en una especie distinta de *D. melanogaster*: *D. pseudoobscura* (Schaeffer et al. 1987; Riley et al. 1989), *D. simulans* (Aquadro et al. 1988) y *D. ananassae* (Stephan & Langley 1989). En *D. subobscura* no existe ningún análisis a este nivel; este trabajo, por lo tanto, constituye el primer análisis en esta especie. El locus *rp49* presenta el interés de pertenecer a un tipo de loci

del que apenas se conoce su variabilidad genética, aún cuando se prevé un bajo polimorfismo al codificar para una proteína estructural. En este sentido, la técnica "four-cutter analysis" es muy apropiada por ser capaz de detectar una fracción muy importante de los polimorfismos por sustitución nucleotídica existentes, así como la práctica totalidad de las inserciones-delecciones.

2) Análisis de la variabilidad en diferentes ordenaciones cromosómicas que afectan al locus *rp49*.

Se quiere analizar la distribución de la variabilidad nucleotídica en diferentes ordenaciones cromosómicas de *D. subobscura*, con objeto de obtener información acerca del origen, diferenciación y edad relativa de las inversiones cromosómicas.

Drosophila subobscura es un material idóneo al presentar un rico polimorfismo cromosómico. La localización cromosómica del locus *rp49* -banda 91C en el segmento I del cromosoma O de *D. subobscura*, muy cercana al punto de rotura de la inversión cromosómica O₃- hace que sea este locus particularmente interesante para este objetivo. Debido a esta posición, el locus *rp49* se utilizará como marcador de tres ordenaciones cromosómicas: O_{st}, O₃₊₄ y O₃₊₄₊₈.

3) Estudio de la variabilidad nucleotídica en una población insular.

Se intenta analizar la variabilidad presente en una población de las islas Canarias (Tenerife) y compararla con la existente en las poblaciones del área central de distribución de *D. subobscura*.

Las poblaciones de *D. subobscura* de Canarias han sido estudiadas a los nivel cromosómico, enzimático y del DNA mitocondrial. En todos los casos se ha observado un gran aislamiento de dichas poblaciones respecto a las poblaciones continentales evidenciando la existencia de barreras que impiden el flujo génico. Los datos de este estudio, a un nivel todavía no abordado, permitirán contrastar los obtenidos en estudios anteriores.

4) Estudio de la colonización de América por *D. subobscura*.

La colonización del continente americano por *D. subobscura* ha estado fuertemente estudiada por el grupo dirigido por el Dr. A. Prevosti. En la caracterización genética inicial de las poblaciones colonizadoras, todavía no se había efectuado ningún análisis de variabilidad para una región específica del DNA nuclear. El análisis de los polimorfismos nucleotídicos y de los haplotipos generados permitirá una comparación cualitativa y cuantitativa de la variabilidad en una población colonizadora respecto a poblaciones del área central de distribución de la especie. Esta comparación puede dar información respecto al efecto fundador en la colonización así como permitir una estima del número de individuos que colonizaron el continente americano. Este estudio de la variabilidad en la región *rp49* de una población americana no tan sólo puede aportar una valiosa información, sino que además constituirá el punto inicial para el posterior seguimiento en el tiempo de la evolución de dichas poblaciones.

MATERIAL Y METODOS

2.1 ABREVIATURAS

BSA	: Albúmina de suero bovino
DNAsa	: Desoxirribonucleasa
DTT	: Ditioneitol
EDTA	: Etilendiaminotetraacetato disódico
h	: Hora
kb	: Kilobase
mn	: Minuto
pb	: Par de bases
RNAsa	: Ribonucleasa
rpm	: Revoluciones por minuto
SDS	: Duodecil sulfato sódico
sg	: Segundo
TMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TRIS	: Tris(hidroximetil)aminometano

2.2 MATERIAL

2.2.1 PRODUCTOS QUIMICOS

La mayoría de los reactivos químicos utilizados fueron de las firmas Merck, Sigma y Fluka. La procedencia de otros productos y materiales fué la siguiente:

- Productos necesarios para realizar los geles de acrilamida (acrilamida, bis-acrilamida y urea), así como azul de bromofenol y xilencianol... BIO-RAD.
- Enzimas de restricción... AMERSHAM, BOEHRINGER-MANHEIM y NEW ENGLAND BIOLABS INC.
- Sephadex G-50 y Ficoll... PHARMACIA.
- Repel-silane... LKB.
- Material radioactivo... AMERSHAM.
- Marcadores de tamaño de DNA... BRL.
- Membranas de nylon Gene-Screen... DU-PONT.
- Hojas de papel pobre en cenizas... SCHLEICHER & SCHUELL.

2.2.2 EQUIPO INSTRUMENTAL

Los principales equipos utilizados fueron:

- Centrífuga Eppendorf Mod. S414S.
- Centrífuga Kontron H-401. Rotor AS4.13.

- Centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B. Rotores SS34 y GSA.
- Centrífuga tipo Eppendorf. Sigma 202 M Rotor 11010.
- Congelador -70°C. Radiber.
- Congelador -70°C. Revco.
- Contador de centelleo Kontron Betamatic.
- Equipo fotográfico Polaroid MP4 Land Camera L2B.
- Espectrofotómetro LKB Ultrospec 4050.
- Fuente de alimentación de alto Voltaje Groc. G-205.
- Fuente de alimentación de Electrónica Argemí.
- Incubador agitador G25 New Brunswick Scientific Co., Inc.
- Ultracentrífuga Kontron T-2055. Rotor TFT-50.13.

2.2.3 SOLUCIONES BASE

- | | | | |
|---|-----------------------|--|----------|
| - | 40% Acrilamida | Acrilamida/bis-acrilamida en proporción 19:1
Desionizar con Amberlita | 10 g/l |
| - | EDTA 0.5M
pH = 8.0 | EDTA disódica
Ajustar el pH con NaOH | 0.5M |
| - | KOAc 5M | Acetato potásico
Acido acético glacial | 3M
2M |

-	LB	Triptona	10 g/l
		Levadura	5 g/l
		NaCl	5 g/l
		Ajustar el pH a 7.5 con NaOH.	
-	NaOAc 3M	Acetato sódico	3M
	pH = 5.2	Ajustar el pH con ácido acético glacial.	
-	Tampón Pi 1M	Fosfato disódico	0.5M
	pH = 7.2	Acido fosfórico 85%	70mM
-	10 X TBE	Tris	890mM
		Acido bórico	890mM
		EDTA disódico	25mM
-	T.E	Tris HCl 1M pH 8.0	10mM
		EDTA pH 8.0	0.1mM
-	TE	Tris HCl 1M pH 8.0	10mM
		EDTA pH 8.0	1mM
-	Tris HCl 1M	Tris	1M
		Ajustar a distintos pH con HCl concentrado.	

2.2.4 MATERIAL BIOLÓGICO

2.2.4.1 Cepas de laboratorio

Se utilizaron las siguientes cepas:

a) *ch cu*

Cepa de *Drosophila subobscura* homocigótica para los alelos recesivos *cherry* y *curled*, situados en el cromosoma O. Además esta cepa es homocigótica para la ordenación standard de los cromosomas A, E, J y U, poseyendo la ordenación O_{3+4} para el cromosoma O.

b) H27

Cepa de *D. subobscura*, obtenida por el Departamento de Genética de la Universidad de Valencia mediante cruzamientos consanguíneos de una línea procedente de Helsinki. A partir de dicha línea se aisló el locus *rp49* secuenciado por Aguadé (1988a).

c) *Va/Ba*

Cepa de letales equilibrados de *Drosophila subobscura* sintetizada por Sperlich et al. (1977), (figura 1). Las cepas de letales equilibrados se caracterizan por presentar: 1) por lo menos un mutante dominante en cada cromosoma, el cual sirve para identificar la presencia del cromosoma en heterocigosis; 2) un gen letal recesivo distinto para cada cromosoma equilibrado, que hace que los individuos homocigóticos para un cromosoma equilibrado sean letales; y 3) una o varias inversiones cromosómicas, cuyo fin es inhibir la recombinación genética en los heterocigotos. La cepa *Va/Ba* es la

única cepa de letales equilibrados existente en *D. subobscura*, y afecta únicamente al cromosoma O.

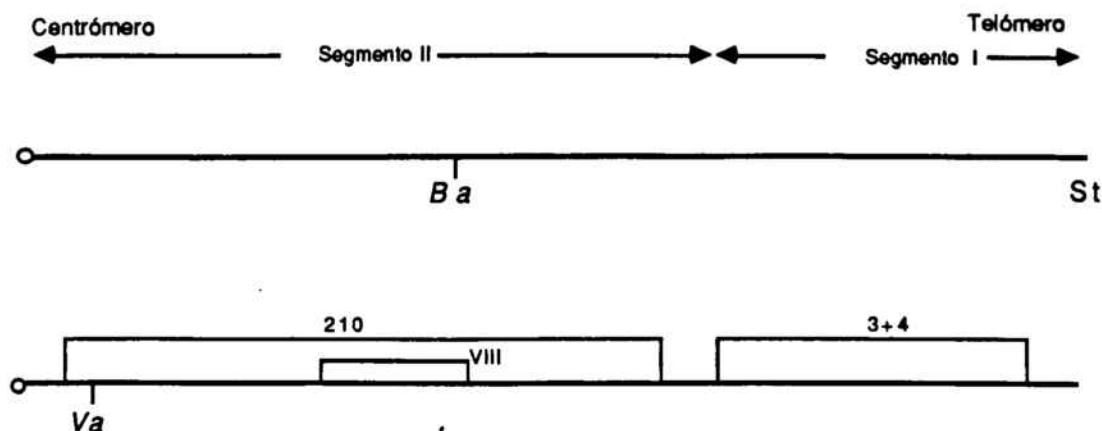


Figura 1. Estructura de los dos cromosomas de la cepa de letales equilibrados *Va/Ba* (Sperlich et al. 1977; Zouros et al. 1974; Kohonen-Corish et al. 1985). La localización del marcador *Va* en el cromosoma *Va* es la correspondiente a la de un cromosoma *St*.

Un cromosoma de la cepa lleva el marcador dominante *Varicose* (*Va*) que produce engrosamientos irregulares en las intersecciones de las venas alares así como en sus extremos. El marcador dominante del otro cromosoma es el *Bare* (*Ba*). Su efecto fenotípico es la reducción variable en el número de macroquetas. Ambos marcadores son letales en homocigosis. Además el cromosoma que presenta el marcador *Varicose* lleva también los marcadores recesivos *cherry* y *curled*.

El cromosoma *Varicose*, además de la ordenación natural O_{3+4} , presenta 2 inversiones artificiales, la O_{VIII} y la O_{210} . La primera está localizada en la región 85A-87A del mapa cromosómico de Kunze-Mühl & Müller (1958). La segunda abarca la región 78C-90B e incluye por completo a la anterior. El cromosoma *Bare* presenta la ordenación standard.

Esta cepa presenta algunos inconvenientes que merecen ser destacados. Por un lado está la penetración y expresividad variable tanto del marcador *Varicose* como del *Bare*. Para el primero la penetración es completa aunque su expresividad tiene cierta variabilidad. No obstante, siempre se puede reconocer la presencia del cromosoma *Varicose*. Más preocupante es el caso del cromosoma *Bare*, ya que esporádicamente se encuentran individuos a los que tan sólo les faltan 1 ó 2 macroquetas. Esto obliga a una cuidadosa observación de gran número de macroquetas por individuo para evitar confundir un individuo normal con uno portador del cromosoma *Bare*.

El otro inconveniente importante reside en el hecho de que el cromosoma *Varicose* sea portador de la ordenación cromosómica natural O_{3+4} . Esta ordenación es relativamente frecuente en el sur de la distribución de *D. subobscura*, (para una revisión ver Krimbas & Loukas 1980), por lo que se podrían tener serios problemas debido a la recombinación genética al trabajar con cromosomas que lleven esta ordenación. Como se explicará más adelante, el diseño experimental que se realizó soslaya dicho inconveniente, permitiendo el análisis de individuos portadores de esta ordenación cromosómica.

2.2.4.2 Poblaciones naturales analizadas

Se analizaron individuos procedentes de 4 poblaciones naturales distintas. Las capturas se efectuaron utilizando como cebo unas trampas consistentes en bolsas con plátano maduro previamente fermentado con levadura de panificación. Los drosófilidos fueron capturados con una manga caza-moscas (Monclús 1964). Los individuos fueron trasladados al laboratorio para su clasificación. A partir de cada hembra fecundada capturada de *D.*

subobscura se fundó una línea isomaterna. Las poblaciones analizadas fueron las siguientes:

- Barcelona: Muestra de 49 líneas capturada en Junio de 1986 por J. Balañá y J. Rozas en la finca Pedro Pons (Universitat de Barcelona), situada al pie de la montaña del Tibidabo, Barcelona.
- Santiago: Muestra de 54 líneas capturada en Enero de 1987 por A. Prevosti y M. Monclús en Santiago de Chile.
- Tenerife: Muestra de 54 líneas capturada en Junio de 1987 por J. M. Comerón y J. Rozas en el Pinar de las Raíces, Tenerife.
- Ter Apel: Muestra de 58 líneas capturada en Agosto de 1988 por A. Prevosti, M. Monclús y Ll. Serra en Ter Apel, Holanda. 54 de estas líneas son una muestra aleatoria de la población a la que se añadieron 4 líneas de la ordenación O₃₊₄ con objeto de ampliar la muestra de esta ordenación.

2.2.5 REGION GENOMICA ESTUDIADA

Se analizó una región genómica que incluye el gen *rp49* (ribosome protein 49) de *Drosophila subobscura*, así como sus zonas adyacentes 5' y 3'. Dicho gen está constituido por 2 exones de 93 y 309 pares de bases que flanquean un intrón de 62 pares de bases. El locus *rp49* mapea en el cromosoma O, banda 91C (Aguadé 1988a), según el mapa cromosómico de

Kunze-Mühl & Müller (1958), dentro de la inversión cromosómica O_3 y muy cerca de un punto de rotura de la misma (ver foto 1 cedida por M. Aguadé).

Se utilizó la sonda 1.6rp. Dicha sonda corresponde a un fragmento de 1593 pares de bases, secuenciado por Aguadé (1988a), el cual contiene la zona codificadora del locus *rp49*, 866 pb de la región 5' y 213 pb de la 3'. Esta sonda comprende también los 50 últimos nucleótidos del extremo 3' terminal del locus *serendipity*, *sry*. (Vincent et al. 1985).



Foto 1. Localización de la región *rp49* (banda 91C) en un heterocigoto O_{st} / O_{3+4} . Foto cedida por M. Aguadé.

En la figura 2 se presenta el mapa de restricción de la región objeto de estudio para los enzimas de restricción utilizados y para el alelo secuenciado. Las dianas presentes dentro de la región 1.6rp fueron determinadas mediante búsqueda en la secuencia por un programa de ordenador que se realizó para tal fin. Las dianas que se indican fuera de esta región fueron localizadas tras el análisis de las autorradiografías.

Figura 2. Mapa de restricción de la región del locus *rp49* de la cepa H27 de *D. subobscura*. La barra superior indica el fragmento utilizado como sonda. La región codificadora del locus *rp49* y parte de la del locus *serendipity* se indican en rectángulos. A, *Alu* I; D, *Dde* I; E, *Hae* III; H, *Hha* I; M, *Msp* I; S, *Sau3A* I; T, *Taq* I. La escala se indica en pares de bases. Para dos (las dos últimas) de las tres dianas para el enzima *Hha* I que aparecen muy juntas hacia la posición 1250 no se pudo analizar la variabilidad ya que la pérdida de estas dianas no sería detectable (ver punto 3.2). Tampoco se analizó la variabilidad de las dos dianas de restricción más extremas (*Msp* I en la región 5' y *Hae* III o *Msp* I -según poblaciones, ya que existe un polimorfismo para el enzima *Hae* III- en la región 3') (ver punto 3.2).

rp 1.6

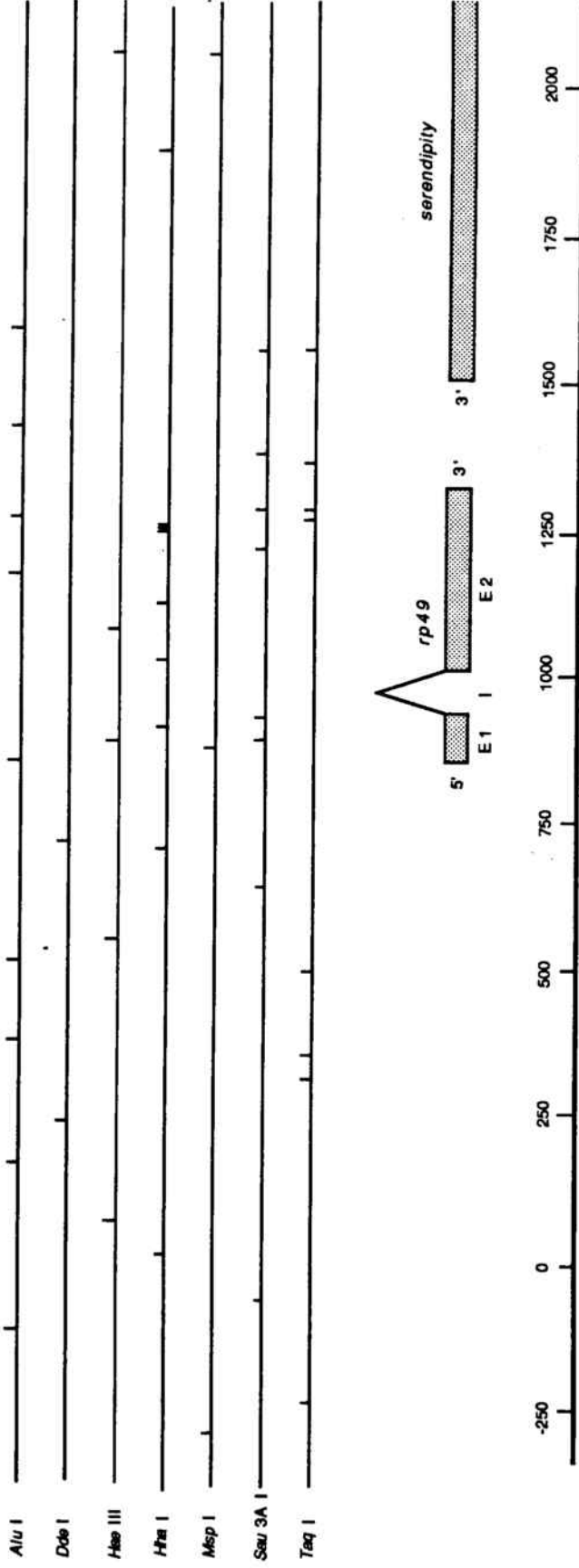


Figura 2. Mapa de restricción de la región *rp49* de *Drosophila subobscura*

2.3 METODOS

2.3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

2.3.1.1 Medio y condiciones de cultivo

La preparación del medio de cultivo de los individuos se realizó tal como describe Monclús (1964).

Los cruzamientos así como el mantenimiento de los individuos se llevaron a cabo en botellas con 30 ml de medio, y a una temperatura de 18°C. En estas condiciones el ciclo de *D. subobscura* se completa en unos 28 días.

2.3.1.2 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un método clásico en la identificación, separación y aislamiento de DNA (Thorne 1966; Takahashi et al. 1969; Sharp et al. 1973). Dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar, se preparan geles de distintas concentraciones desde 0.3% a 2% (a menor concentración separa mejor los fragmentos grandes). La velocidad de migración del DNA en estos geles es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (Helling et al. 1974).

PROCEDIMIENTO

1. Calentar agitando hasta la ebullición la cantidad adecuada de agarosa en 1 X TBE.
2. Cuando la temperatura descienda hasta 55°C verter sobre una cubeta en la cual se habrá colocado el peine, que dará forma a los pocillos.
3. Sacar el peine del gel cuando éste haya gelificado. Traspasarlo a la cubeta de electroforesis.
4. Llenar la cubeta de electroforesis con tampón 1 X TBE, dejando el gel completamente sumergido.
5. Añadir el tampón de carga 5 X a la muestra de DNA, dejando la solución a una concentración 1 X.
6. Cargar las muestras y los marcadores en el gel.
7. Aplicar una diferencia de potencial de 50 V.
8. Parar la electroforesis cuando el azul de bromofenol (colorante más rápido), migre la distancia adecuada.
9. Teñir el gel unos 15 mn con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml, agitando suavemente.
10. Visualizar el DNA con un transiluminador de luz ultravioleta.

COMENTARIOS

Se utilizaron los siguientes marcadores para estimar el tamaño del DNA:

- "1 Kilobase (1 Kb) Ladder". Consiste en 23 fragmentos. Doce de ellos son múltiplos de 1018 pb. Además tiene los siguientes

fragmentos: 1636, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134 y 75 pares de bases.

- "Lambda DNA/*Hind* III Fragments". Consiste en 8 fragmentos resultantes de la digestión del fago lambda con *Hind* III. El tamaño de los fragmentos es de: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pares de bases.

Para estimar la cantidad de DNA, se utilizaron muestras de DNA de concentración conocida.

La migración del DNA en el gel se siguió por los colorantes azul de bromofenol y xilencianol. La movilidad de estos colorantes depende de la concentración del gel. Para un gel del 0.8% la migración del azul de bromofenol es igual a la del DNA de un tamaño de 1 kb, mientras que la del xilencianol corresponde a un tamaño de 4.5 kb.

SOLUCIONES

-	Tampón de carga 5 X	Ficoll 70	25%
		EDTA pH 8.0	125mM
		Azul de bromofenol	0.15%
		Xilencianol	0.15%

2.3.2 ANALISIS DE LA VARIABILIDAD MEDIANTE LA TECNICA DE "FOUR-CUTTER ANALYSIS"

En un orden secuencial, el esquema del plan de trabajo realizado ha sido el siguiente:

1. Determinación de la ordenación cromosómica de las líneas analizadas.
2. Obtención de líneas isocromosómicas o heterocigotas para un cromosoma marcador.
3. Extracción del DNA genómico.
4. Digestión del DNA genómico con una batería de enzimas de restricción.
5. Electroforesis del DNA en geles desnaturizantes de secuenciación.
6. Electrotransferencia del DNA del gel y fijación covalente del mismo a membrana de nylon.
7. Obtención de la sonda a analizar.
8. Marcaje radioactivo de la sonda.
9. Hibridación de la sonda radioactiva a los filtros de nylon, lavado de los mismos y obtención de las autorradiografías.
10. Análisis de los datos.

2.3.2.1 Análisis de ordenaciones cromosómicas

Se determinó la ordenación cromosómica para el cromosoma O de cada línea mediante preparaciones de cromosomas politénicos de larvas de tercer estadio.

El esquema del procedimiento seguido se presenta en la figura 3. Se cruzó un macho del campo (o de la descendencia de una línea isomaterna) con 2 hembras vírgenes *Va/Ba* (cruzamiento P). De la descendencia se tomó un sólo macho por línea, de fenotipo *Va/+* y se cruzó, separadamente, primero con 2 hembras vírgenes *Va/Ba* (cruzamiento 1) y posteriormente con 2 hembras vírgenes *ch cu* (cruzamiento c). La determinación cromosómica se realizó tras el análisis de las larvas de este último cruzamiento. En los casos que no pudo realizarse esta determinación (muerte del macho con anterioridad a la realización del cruzamiento), se efectuó un cruzamiento de un macho *Va/+* descendiente del cruzamiento 1, con 2 hembras vírgenes *ch cu* (cruzamiento c).

PROCEDIMIENTO

1. Extraer la glándula salival en una solución salina, NaCl al 0.9%
2. Teñir las glándulas con orceína acético-láctica (70% de orceína acética y 30% de ácido láctico) durante unos 20 mn.
3. Hacer un "squash".
4. Observar al microscopio óptico a 400 aumentos.

COMENTARIOS

Con este esquema de cruzamientos se impide cualquier ambigüedad en la determinación cromosómica de la descendencia. Se observarán 2 tipos de preparaciones citológicas: 1) El cromosoma O de la cepa *ch cu* (ordenación O_{3+4}) en heterocigosis con el cromosoma artificial *Va*. 2) El cromosoma O de la línea a determinar en heterocigosis con el de la cepa *ch cu* (ordenación

O_{3+4}). En la primera preparación en la que no observemos el cromosoma artificial *Varicose* tendremos por tanto el cromosoma que queremos analizar en heterocigosis con el cromosoma O_{3+4} (de la cepa *ch cu*).

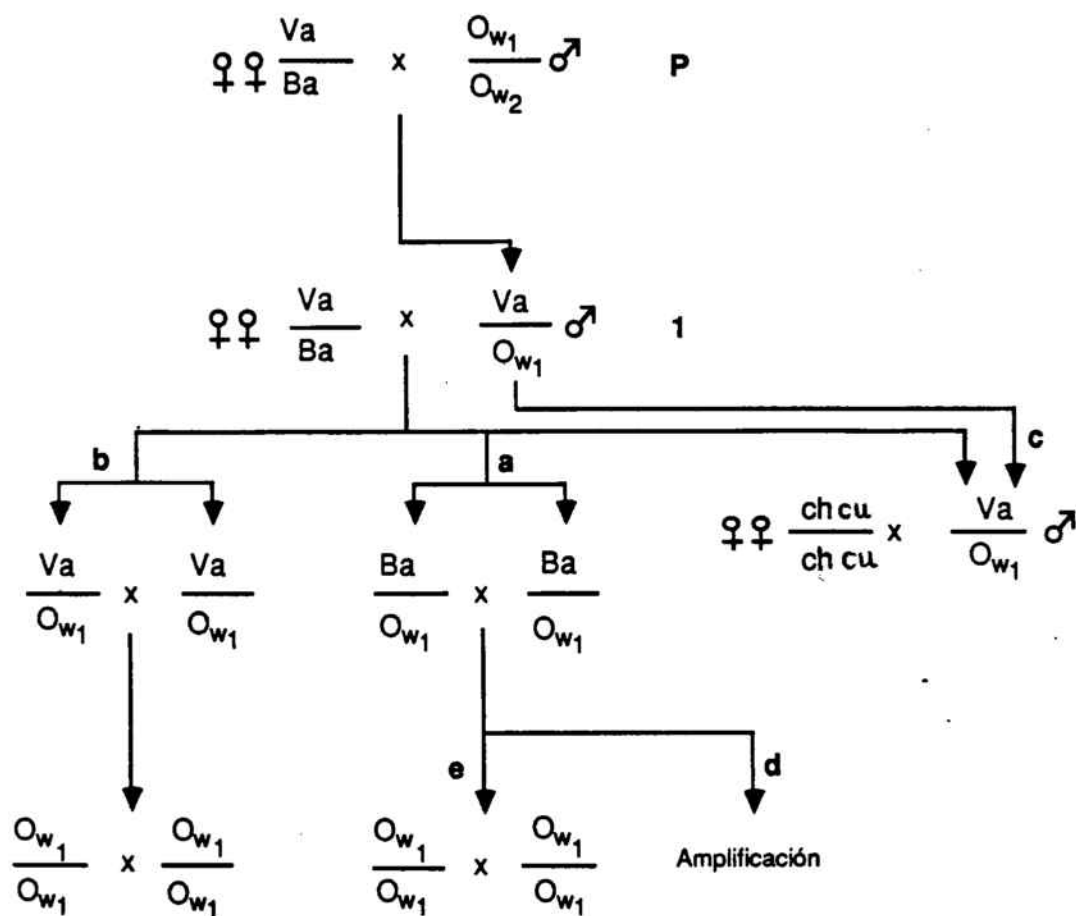


Figura 3. Esquema de los cruzamientos realizados.

2.3.2.2 Obtención de líneas isocromosómicas o heterocigotas sobre un cromosoma marcador

Líneas isocromosómicas:

Se obtuvieron líneas isocromosómicas a partir de algunos individuos de la población de Barcelona. El procedimiento seguido se presenta en la figura 3. De la descendencia del cruzamiento **1**, se realizaron 2 tipos de cruzamientos: 1) Cruzamiento **a**, efectuado cuando el cromosoma del campo fué O_{3+4+7} . Se cruzaron 3 machos Ba/O_{w1} con 3 hembras vírgenes de igual fenotipo. De la descendencia se cruzaron 2 ó 3 machos con 2 ó 3 hembras vírgenes de fenotipo salvaje (cruzamiento **e**), fundándose la línea isocromosómica. 2) Cruzamiento **b**, realizado para cromosomas O_{st} . El procedimiento efectuado fue análogo al anterior pero a través de individuos Va/O_{w1} .

Líneas heterocigóticas sobre un cromosoma marcador:

Se obtuvieron líneas heterocigóticas para los individuos de las poblaciones de Tenerife, Santiago, Ter Apel y para algunos de la población de Barcelona. Se realizó el cruzamiento **a** (3 machos con 3 hembras vírgenes de fenotipo $Ba/+$) independientemente de la ordenación cromosómica del individuo. Los individuos nacidos de este cruzamiento se dejaron cruzar libremente, cruzamiento **d**, con el fin de amplificar suficientemente la línea para obtener del orden de 0.2 a 0.5 gramos de individuos. Una vez obtenida esta cantidad, los individuos se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C .

COMENTARIOS

Como resultado del cruzamiento **d** se obtienen 2 individuos Ba/O_{w1} por cada O_{w1}/O_{w1} y por tanto 2 cromosomas O_{w1} por cada cromosoma Ba si la viabilidad de ambos genotipos es la misma. En el caso que existiera algún gen letal en el cromosoma O_{w1} , se obtendría un cromosoma O_{w1} por cada Ba . Por lo tanto, al analizar las autorradiografías se observará como máximo una intensidad doble de las bandas de DNA correspondientes al cromosoma O_{w1} respecto al *Bare* y como mínimo una intensidad igual en el caso de existir un gen letal en el cromosoma O_{w1} y se podrá discernir fácilmente las bandas correspondientes al locus *rp49* provenientes del cromosoma O_{w1} (el que se quiere analizar), de las que provengan del cromosoma Ba .

Se determinó también el haplotipo del cromosoma Ba , a partir de cruzamientos de la cepa Va/Ba con la cepa H27, siguiendo el esquema de la figura 3. Esta determinación permite interpretar el patrón de bandas de las líneas heterocigóticas para el cromosoma Ba .

Para obtener líneas heterocigóticas, se realizó el cruzamiento **a** -cruzamiento de individuos Ba/O_{w1} - y no el **b** debido principalmente a la facilidad de identificación de los distintos fenotipos. Como se ha dicho anteriormente la observación del fenotipo *Varicose* es fácil no siéndolo la del *Bare*. Para la obtención de individuos Ba/O_{w1} , basta con eliminar todo individuo con fenotipo *Varicose*.

Con tal diseño no se impide la recombinación en las hembras Ba/O_{w1} de las líneas heterocigóticas. Esta posible recombinación no afectará la

interpretación de posiciones de restricción ya que se analizó conjuntamente el locus *rp49* para el cromosoma del campo y para el cromosoma *Bare* en varios individuos de la misma línea. Sólo en el caso de producirse una recombinación intragénica en el locus *rp49* entre dos formas o haplotipos que difieran en más de una posición variable, podría generarse un haplotipo que no correspondiera al del cromosoma del campo. Sin embargo, su frecuencia respecto al haplotipo marcador o respecto al haplotipo objeto de análisis sería ínfima y por tanto prácticamente imperceptible en la autorradiografía.

2.3.2.3 Extracción de DNA genómico

Para una obtención rápida de DNA genómico de las diferentes líneas se ha seguido el método de Bender et al. (1983), con las modificaciones de Kreitman & Aguadé (1986a). La pureza de este DNA genómico es suficientemente buena para que actúen los enzimas de restricción. Se parte de 0.2 a 0.5 gramos de material biológico congelado (-70°C).

PROCEDIMIENTO

1. Homogeneizar el material con 10 ml de tampón de homogeneización GB.
2. Filtrar el homogeneizado a través de una gasa.
3. Incubar 5 mn a temperatura ambiente.
4. Añadir KOAc 5M a una concentración final 5/6 M y mezclar suavemente.
5. Incubar en hielo de 10 a 60 mn.
6. Centrifugar 10 mn a 9000 rpm y 4°C.

7. Añadir fenol/TE al sobrenadante (1:2 en volumen) y agitar suavemente.
8. Centrifugar 20 mn a 9000 rpm y 4°C.
9. Añadir 1 volumen de etanol absoluto a temperatura ambiente al sobrenadante y mezclar suavemente.
10. Incubar de 5 a 10 mn a temperatura ambiente.
11. Centrifugar 10 mn a 9000 rpm y 4°C.
12. Despreciar el sobrenadante y dejar secar el "pellet" al aire unos 2 mn.
13. Añadir 400 µl de TE/7.5M NH₄OAc 2:1.
14. Resuspender el "pellet" agitando suavemente.
15. Transferir la solución a un tubo Eppendorf.
16. Añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C. Mezclar suavemente.
17. Centrifugar 10 mn a temperatura ambiente.
18. Lavar el "pellet" con etanol al 95% a -20°C.
19. Secar el "pellet" al vacío 10 mn.
20. Resuspender el "pellet" en 40 µl de T.E por cada 100 mg de material fresco.
21. Guardar el DNA genómico a 4°C.

SOLUCIONES

-	TE/7.5M NH ₄ OAc 2:1	TE	2 Volúmenes
		Acetato amónico 7.5M	1 Volumen

-	Tampón de homogeneización GB	
	Tris HCl pH 8.0	100mM
	EDTA disódico	50mM
	NaCl	100mM
	SDS	0.5%
	Sacarosa	200mM
-	Fenol/TE	Fenol líquido saturado con TE
	NaOH	30mM
	pH = 7.6	

2.3.2.4 Digestiones de DNA con enzimas de restricción

El DNA genómico de cada línea fué digerido por una batería de enzimas de restricción que reconocen dianas de 4 pares de bases. En la tabla 1 se muestran los enzimas de restricción que se utilizaron.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN	DIANA
<i>Alu</i> I	5' AG ↓ CT 3'
<i>Dde</i> I	5' C ↓ TNAG 3'
<i>Hae</i> III	5' GG ↓ CC 3'
<i>Hha</i> I	5' GCG ↓ C 3'
<i>Msp</i> I	5' C ↓ CGG 3'
<i>Sau</i> 3A	5' ↓ GATC 3'
<i>Taq</i> I	5' T ↓ CGA 3'

Tabla 1. Enzimas de restricción utilizados con la secuencia nucleotídica que reconocen y su punto de corte (↓).

PROCEDIMIENTO

1. Efectuar la digestión de 4.5 μg de DNA en un volumen total de 50 μl , utilizando 10 unidades de enzima; añadir asimismo 0.3 μg de RNAsa A y el tampón de digestión adecuado.
2. Incubar unas 6 horas a la temperatura adecuada.
3. Parar la reacción con EDTA a una concentración final de 10mM.
4. Añadir NaOAc 3M pH 5.2 (concentración final 0.3M) y precipitar el DNA con 2.5 volúmenes de etanol a -20°C .
5. Dejar precipitar unas 12 h a -20°C . ó 30 mn a -80°C .
6. Centrifugar 10 mn a temperatura ambiente.
7. Lavar el "pellet" con etanol al 90% a -20°C .
8. Secar el sobrenadante al vacío.
9. Resuspender el "pellet" en 3 μl de tampón de formamida.

Las muestras pueden ser cargadas inmediatamente o bien guardadas a -20°C .

COMENTARIOS

Tras el revelado de las autorradiografías de las primeras muestras digeridas con *Msp* I se constató que debido a la proximidad de los 2 fragmentos resultantes, estos fragmentos no podían identificarse individualmente. Por ello se realizó una digestión doble con los enzimas *Msp* I y *Dde* I. Con esta doble digestión se generan pocos fragmentos y de la longitud adecuada como para poder ser analizados conjuntamente.

Para precisar, en caso de alguna ambigüedad, la posición exacta de algún polimorfismo por sustitución nucleotídica, se realizaron dobles digestiones con los 7 enzimas de restricción utilizados en el estudio y con *Pvu* II.

Los tampones de digestión utilizados fueron: Tampón A con *Alu* I, *Hha* I y *Sau* 3A; tampón B con *Hae* III y *Msp* I; tampón C con *Dde* I y *Taq* I.

SOLUCIONES

- Tampón de digestión A 10 X

Tris HCl pH 7.8	250mM
NaCl	500mM
MgCl ₂	100mM
BSA	1 mg/ml
DTT	10mM

- Tampón de digestión B 10 X

Tris HCl pH 7.8	250mM
MgCl ₂	100mM
BSA	1 mg/ml
DTT	10mM

-	Tampón de digestión C 10 X	
	Tris HCl pH 7.8	250mM
	NaCl	1000mM
	MgCl ₂	100mM
	BSA	1 mg/ml
	DTT	10mM
-	Tampón de formamida	
	Formamida desionizada con Amberlita	94%
	Xilencianol	0.03%
	Azul de bromofenol	0.03%
	EDTA disódico	20mM

2.3.2.5 Electroforesis de acrilamida

Los geles de acrilamida de secuenciación se utilizan ampliamente en la separación de DNA de pequeño tamaño, dando una buena resolución para fragmentos de menos de 1000 pares de bases. Al igual que en soportes de agarosa la migración del DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (Maniatis et al. 1975).

Se realizaron geles desnaturalizantes de acrilamida (Biggin et al. 1983) de 30 cm x 43 cm x 0.4 mm., en los que se cargaron de 50 a 57 muestras. Con objeto de resolver mejor las bandas de tamaño grande, de 500 a 1000 pares de bases, se efectuaron también geles de gradiente de concentración de tampón. En los geles de gradiente se aumenta la resolución de las bandas de tamaño grande compactando las de pequeño tamaño.

PROCEDIMIENTO

1. Tratar la cara interior de los cristales con Repel-Silano (solución de dimetildiclorosilano al 20% en 1,1,1 tricloroetano) en la campana de gases.

Gel sin gradiente:

2. Añadir entre los cristales la siguiente solución:

5% Acrilamida-Urea 0.5 X TBE	70 ml
Persulfato amónico	0.05%
TEMED	0.05%

Gel con gradiente:

- 2a. Preparar 2 soluciones:

Solución A: 5% Acrilamida-Urea 0.5 X TBE	65 ml
Persulfato amónico	0.05%
TEMED	0.05%

Solución B: 5% Acrilamida-Urea 5 X TBE	10 ml
Persulfato amónico	0.05%
TEMED	0.1%
Azul de bromofenol	0.5 mg

- 2b. Con una pipeta coger primero 8 ml de la solución A y luego 10 ml de la solución B. Añadir por un extremo. Comprobar la formación del gradiente mediante el azul de bromofenol. Añadir el resto de la

solución A.

3. Colocar el peine.
4. Dejar gelificar durante 45 mn.
5. Retirar el peine y colocar el gel en la cubeta de electroforesis.
6. Llenar las cubetas de tampón 0.5 X TBE. Si el gel es con gradiente poner tampón 1 X TBE en la cubeta inferior.
7. Hacer un pre-corrido de 30 mn, aplicando una potencia de 35 W.
8. Desnaturalizar las muestras a cargar incubando 8 mn a 90°C.
9. Cargar de 2.5 a 3 µg de DNA genómico digerido, por pocillo.
10. Aplicar una potencia de 35 W hasta que las muestras hayan entrado en el gel y a continuación de 45 W.
11. Parar la electroforesis cuando el azul de bromofenol llegue al final del gel.

COMENTARIOS

Para conocer el tamaño de las bandas de DNA se utilizaron los siguientes marcadores:

- "123 Base Pair Ladder". Consiste en 34 fragmentos múltiplos de 123 pares de bases (desde 123 hasta 4182 pares de bases).
- DNA genómico de la cepa H27 cortado con diferentes enzimas de restricción. Como el locus *rp49* secuenciado en *D. subobscura* (Aguadé 1988a) procede de esta cepa, se dispone de una serie de fragmentos de tamaño conocido.

La migración del DNA en el gel puede seguirse por los colorantes azul de bromofenol y xilencianol. Para un gel desnaturizante de acrilamida al 5% el azul de bromofenol migra como si se tratara de un fragmento de DNA de 35 nucleótidos mientras que el xilencianol lo hace como si el tamaño fuera de 130 nucleótidos (Maniatis et al. 1982).

SOLUCIONES

- 5% Acrilamida-Urea 0.5 X TBE

Acrilamida	5%
TBE	0.5 X
Urea	7.66M

- 5% Acrilamida-Urea 5 X TBE

Acrilamida	5%
TBE	5 X
Urea	7.66M

2.3.2.6 Electrotransferencia y fijación de DNA

Siguiendo el procedimiento de Kreitman & Aguadé (1986a), una vez acabada la electroforesis se electrotransfirió el DNA del gel de acrilamida a un filtro de nylon, conservándose la posición relativa que mantiene el DNA en el gel. La electrotransferencia se realizó en una cubeta de 38x49x15 cm. Dicha cubeta tenía 2 electrodos en forma de solenoide en su parte superior e inferior (ver figura 4).

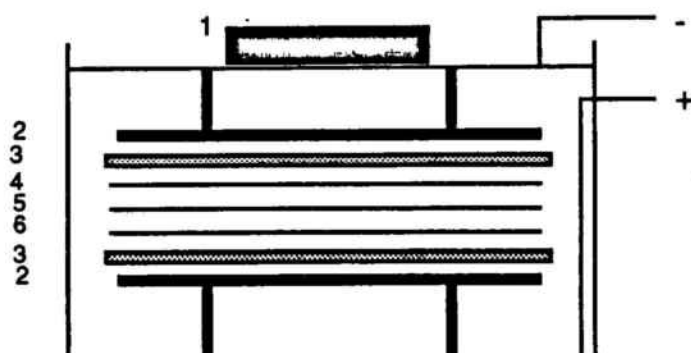


Figura 4. Esquema del aparato de electrotransferencia. 1 Peso. 2 Soporte. 3 "Scotch-Brite". 4 Papel pobre en cenizas. 5 Gel. 6 Filtro de nylon.

PROCEDIMIENTO

1. Retirar el gel del cristal ayudándose con una hoja de papel pobre en cenizas de 33x40 cm.
2. Transferir el gel, junto con la hoja de papel, sobre una capa de "Scotch-Brite".
3. Poner la membrana de nylon encima del gel y a continuación otra capa "Scotch-Brite".
4. Añadir 24 litros de 0.5 X TBE a 4°C. a la cubeta de electrotransferencia.
5. Transferir todo el juego ("Scotch-Brite", papel pobre en cenizas, gel, membrana de nylon, "Scotch-Brite") a la cubeta dejándolo en posición horizontal respecto a la misma.
6. Poner el electrodo superior. Aplicar un peso de unos 2 kg.

7. Conectar la cubeta a una fuente eléctrica de 108 V y 4 A como la descrita por Church & Gilbert (1984).
8. Dejar transferir durante unos 45 mn para un sólo gel o una hora para 2 ó 3 geles. Mientras se realiza la electrotransferencia, se hace circular el tampón por un refrigerador a 4°C, para evitar un sobrecalentamiento del mismo.
9. Sacar el filtro de nylon. Envolverlo en una hoja de plástico.

Fijación covalente del DNA al filtro de nylon

1. Precalentar durante 2 mn una lámpara de radiación ultravioleta de 260 nm.
2. Poner el filtro de nylon a una distancia de 35 cm. de la fuente de radiación. Exponer 2,5 mn.
3. Guardar el filtro a 4°C.

2.3.2.7 Amplificación plasmídica

Se amplificó el plásmido pUC8.38 obtenido por Aguadé (1988a). Este plásmido recombinante consiste en el vector pUC8 con un inserto de 3.45 kb que contiene la región *rp49* de *D. subobscura*.

PROCEDIMIENTO

Preparación de células competentes de *E. coli*

1. Sembrar por estría la cepa bacteriana mv1184 en cápsulas de Petri de LB con agar. Incubar unas 14 h a 37°C.
2. A partir de una colonia individual inocular 5 ml de LB. Incubar unas 14 h a 37°C con agitación.
3. Efectuar una dilución 1:100 en LB del cultivo anterior e incubar a 37°C con agitación hasta que la absorbancia a 560 nm sea aproximadamente 0.4.
4. Detener el crecimiento poniendo el cultivo 10 mn sobre hielo.
5. Concentrar las células por centrifugación a 2500 rpm a 4°C durante 10 mn.
6. Desechar el sobrenadante y resuspender suavemente las células en la mitad del volumen original de CaCl₂ 50mM a 4°C.
7. Mantener 30 mn sobre hielo.
8. Centrifugar 10 mn a 2500 rpm y 4°C.
9. Desechar el sobrenadante y resuspender en una décima parte del volumen original de CaCl₂ 50mM a 4°C. Mantener a 4°C.

Transformación de las células competentes

1. Mezclar 100 µl de células competentes con 20 ng de DNA plasmídico.
2. Incubar 45 mn sobre hielo.
3. Realizar un choque térmico de 2 mn en un baño a 42°C.

4. Añadir 1 ml de LB e incubar 1 h a 37°C con agitación.
5. Inocular 100 µl en una cápsula de Petri de LB con agar y ampicilina.
6. Incubar a 37°C unas 14 h.
7. A partir de una colonia individual inocular un tubo con 5 ml de LB y ampicilina. Incubar unas 14 h a 37°C con agitación. Guardar a 4°C.

Minipreparación de DNA plasmídico

1. Transferir 1.5 ml del cultivo anterior a un tubo Eppendorf.
2. Centrifugar 1 mn para precipitar las células.
3. Resuspender las células en 300 µl de la solución siguiente:

Sacarosa	8%
Tritón X-100	5%
EDTA	50mM
Tris pH 8.0	50mM
4. Añadir 25 µl de una solución de 10 mg/ml de lisozima en Tris 0.25M pH 8.0
5. Hervir durante 45 sg.
6. Centrifugar 10 mn a 4°C.
7. Sacar el "pellet" con un palillo estéril.
8. Añadir 0.7 volúmenes de isopropanol al sobrenadante y mezclar suavemente.
9. Dejar precipitar el DNA 2 h a -20°C y centrifugar.
10. Lavar con etanol al 90% y secar el "pellet" al vacío.
11. Resuspender en 50 µl de TE.

12. Realizar una electroforesis analítica en gel de agarosa.

Preparación de DNA plasmídico a gran escala

1. Inocular el resto del cultivo de 5 ml en 500 ml de LB. Incubar unas 14 h a 37°C con agitación.
2. Precipitar las células por centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 15 mn.
3. Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 30 ml de la solución I a 4°C.
4. Añadir 50 mg de lisozima. Mantener 5 mn a temperatura ambiente.
5. Añadir 2 volúmenes de la solución II a 4°C, mezclar suavemente y mantener 5 mn sobre hielo.
6. Añadir una tercera parte del volumen de solución III a 4°C, mezclar bien y mantener 10 mn sobre hielo.
7. Centrifugar 15 mn a 4000 rpm y a 4°C.
8. Pasar el sobrenadante a través de una gasa y añadir al mismo 0.6 volúmenes de isopropanol. Mezclar bien y dejar precipitar unas 2 horas a -20°C.
9. Centrifugar 15 mn a 4000 rpm a 4°C.
10. Resuspender el "pellet" en 8 ml de TE.
11. Ajustar el volumen final a 9.2 ml. Añadir 1 g de CsCl por ml de disolución.
12. Añadir 0.6 ml de bromuro de etidio 10 mg/ml.
13. Centrifugar 10 mn a 10000 rpm y a 4°C.
14. Pasar el sobrenadante a un tubo "quick-seal". Acabar de completar y equilibrar los tubos con una solución de equilibrado (TE, CICs y

bromuro de etidio). Sellar los tubos.

15. Centrifugar en la ultracentrífuga de 36 a 48 h a 45000 rpm a 20°C (rotor TFT50.13 de centrifuga Kontron).
16. Iluminar el tubo con una lámpara de luz ultravioleta. Pinchar la parte superior del tubo con una aguja 18G. Pinchar inmediatamente por debajo de la banda del DNA plasmídico con una aguja de 23G. Extraer la banda.

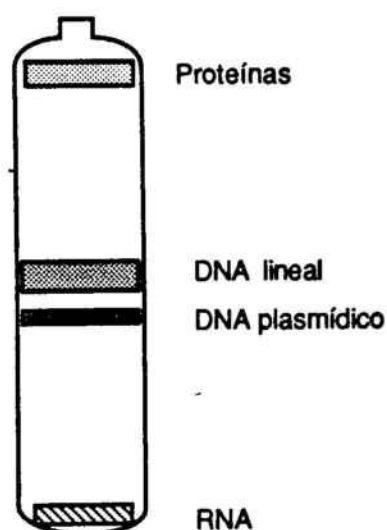


Figura 5. Esquema de un tubo "quick-seal", con las bandas que se observan tras la centrifugación.

17. Extraer el bromuro de etidio con butanol saturado con NaCl 5M.
18. Repetir la extracción hasta que la fase acuosa no presente coloración.
19. Transferir la fase acuosa a un tubo de diálisis y dializar con TE a 4°C, renovando el tampón cada 4 h, 3 veces.
20. Comprobar en un gel de agarosa la cantidad del DNA plasmídico obtenido.

COMENTARIOS

En la primera parte se hace un tratamiento (Cohen et al. 1972, con modificaciones) para que las células de *E. coli* puedan incorporar el DNA plasmídico (se hagan competentes), ya que de forma natural no incorporan DNA foráneo. En la segunda parte se procede a la transformación del DNA plasmídico a las células competentes de *E. coli*.

La minipreparación de DNA (Holmes & Quigley 1981) tiene como objetivo comprobar la transformación. Para ello, una vez acabada la minipreparación, se realiza una electroforesis en agarosa y se comprueba si tenemos el plásmido que nos interesa. Una vez verificado, se procede a la amplificación y purificación del plásmido a gran escala.

SOLUCIONES Y PREPARACIONES

-	LB + Agar	Agar	1.2% en LB
-	LB + Agar + Ampicilina	LB + Agar Ampicilina	50 mg/l
-	Solución I	Glucosa Tris HCl pH 8.0 EDTA	50mM 25mM 10mM
-	Solución II	NaOH SDS	0.2N 1%

-	Solución III	Acetato potásico	2M
		Acido acético glacial	3M

2.3.2.8 Extracción de DNA a partir de geles de agarosa

El plásmido pUC8.38 amplificado se digirió con *Eco* RI y *Bam* HI, generándose 5 fragmentos de DNA: de 2.7 kb, correspondiente al pUC8, y de 1.6 kb, 0.95 kb, 0.55 kb y 0.32 kb correspondientes al DNA insertado. Se purificó el fragmento de 1.6 kb a partir del gel de agarosa (Lizardi et al. 1984). Dicho fragmento, que fué utilizado como sonda, contiene la zona codificadora del gen *rp49* así como las zonas colindantes 5' y 3' (Aguadé 1988a).

PROCEDIMIENTO

1. Digerir 25 µg de pUC8.38 con *Eco* RI y *Bam* HI en un volumen total de 100 µl.
2. Comprobar la digestión sometiendo una alícuota de la misma a electroforesis en gel de agarosa.
3. Cargar el resto de la muestra en un minigel al 1% de agarosa.
4. Añadir bromuro de etidio al tampón de la cubeta de electroforesis, a una concentración final de 0.5 µg/ml. Aplicar una diferencia de potencial de 50V.
5. Tras la migración adecuada observar el gel a través de una lámpara de luz ultravioleta y colocar una tira de membrana DEAE justo delante de la banda de DNA a extraer.
6. Conectar la electroforesis durante unos 10 mn.

7. Tras comprobar que el DNA de la banda a extraer está en la membrana, sacar ésta del gel.
8. Lavar la membrana con 1 X TBE y traspasarla a un tubo Eppendorf.
9. Añadir 300 μ l de la solución HS.
10. Incubar a 68°C durante 1 h.
11. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
12. Lavar la membrana con 120 μ l de solución HS. Pasar el sobrenadante al tubo anterior.
13. Extraer la muestra con butanol.
14. Precipitar con 2.5 volúmenes de etanol al 100% a -20° durante unas 12 h.
15. Centrifugar 15 mn. Lavar el "pellet" con etanol al 70% a -20°C y secarlo al vacío.
16. Resuspender el DNA en TE para obtener una concentración aproximada de 50 ng DNA/ μ l.
17. Comprobar la extracción en gel de agarosa.

COMENTARIOS

Se calcula que existe una recuperación de las 2/3 partes de la cantidad de DNA presente en el gel. Esta eficiencia varía en función de la longitud del DNA a extraer.

SOLUCIONES Y PREPARACIONES

- Membrana DEAE Sumergir la membrana en NaOH 0.5M 10 mn.
Lavar 4 veces en agua destilada.
Guardar en 10mM EDTA pH 7.6 a 4°C.

- Solución HS

Tris HCl pH 9.0	20mM
EDTA	2mM
NaCl	1.2M

2.3.2.9 Marcaje de DNA por "nick translation"

Se realizó según el procedimiento descrito por Maniatis et al. (1982), con alguna modificación:

PROCEDIMIENTO

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

DNA (50 ng/μl)	2 μl
DNA 123 bp ladder (0.2 ng/μl)	1 μl
10 X Tampón de "nick"	2 μl
DNAsa I (dilución 1/1600 de DNAasa I 1 mg/ml)	1 μl
Polimerasa I <i>E. coli</i> 5 u/μl	1 μl
dTTP, dCTP, dGTP 1mM cada uno	1 μl
[α ³² P]dATP 3000 Ci/mM; 10 μCi/μl	5 μl
Agua destilada	7 μl

2. Incubar a 13°C, 1 h 30 mn.
3. Detener la reacción con 70 µl de tampón de paro.
4. Pasar la mezcla de reacción a través de una columna de Sephadex G-50. Recoger la fracción del DNA que ha incorporado el isótopo radioactivo.
5. Determinar en un contador de centelleo la cantidad de [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP incorporada al DNA.

COMENTARIOS

Además de marcar el fragmento de 1.6 kb, se marcó también el "123 bp ladder". La finalidad de este marcaje es poder identificar las bandas de este marcador en las autorradiografías.

Para la hibridación de cada filtro de nylon se marcaron 100 ng de sonda y 0.2 ng de "123 bp ladder" con 50 µCi de [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP.

SOLUCIONES Y PREPARACIONES

-	Tampón de paro	EDTA	100mM
-	10 X Tampón de "nick"	Tris HCl pH 7.8	250mM
		NaCl	500mM
		MgCl ₂	100mM
		BSA	1 mg/ml
		DTT	10mM

PROCEDIMIENTO

1. Humedecer los filtros en 0.5 X TBE.
2. Colocar los filtros de nylon en un tubo de metacrilato de 35x3 cm. Añadir 22 ml de solución de pre-hibridación. Incubar con agitación por un tiempo superior a 20 mn a 58°C.
3. Desnaturalizar la sonda radioactiva en un baño a ebullición durante 7 mn.
4. Desechar el líquido de pre-hibridación y añadir 18 ml de líquido de hibridación junto con la sonda radioactiva.
5. Incubar con agitación de 12 a 17 h a 58°C.
6. Desechar el líquido de hibridación.
7. Hacer 8 lavados de 5 mn cada uno, en líquido de lavado precalentado a 57°C (1 l por cada lavado).
8. Secar el filtro de nylon con papel de filtro.
9. Exponer los filtros de nylon sobre una película de rayos X y con una pantalla amplificadora durante unos 3 días.

COMENTARIOS

Se colocaron hasta 5 filtros en el mismo tubo de metacrilato añadiéndose al líquido de hibridación del orden de 4×10^7 cpm de sonda radioactiva por cada filtro de nylon.

Los tubos se pusieron sobre un agitador que les proporcionaba un giro de 5 rpm. Este agitador se encontraba dentro de un incubador por aire.

Es muy importante orientar los filtros de forma que tiendan a desenrollarse cuando gire el tubo de metacrilato y que permanezcan en posición estacionaria respecto al tubo.

SOLUCIONES

- Líquido de pre-hibridación, e hibridación.

BSA Fracción V	1%
EDTA	10mM
Tampón Pi pH 7.2	0.5M
SDS	7%

- Líquido de lavado
- | | |
|------------------|------|
| EDTA | 1mM |
| Tampón Pi pH 7.2 | 40mM |
| SDS | 1% |

2.3.3 ANALISIS DE LAS AUTORRADIOGRAFIAS

A partir de la información proporcionada por las autorradiografías se construyó un mapa de restricción para cada una de las líneas analizadas. El disponer de la secuencia de la región *rp49* (Aguadé 1988a) facilitó la interpretación de los polimorfismos. En el caso de una ganancia de diana de restricción puede conocerse el cambio exacto de base producido. En el caso de una pérdida de diana no se puede precisar en cual de los cuatro nucleótidos que reconoce el enzima de restricción se ha producido la substitución nucleotídica.

2.3.4 ANALISIS DE LOS DATOS

2.3.4.1 Estimadores de la variabilidad genética

a) DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA

Se calculó la diversidad haplotípica mediante la expresión de Nei & Tajima (1981), ecuación 7:

$$h = n \left(1 - \sum_{i=1}^l x_i^2 \right) / (n - 1)$$

donde n es el tamaño de la muestra, x_i es la frecuencia del haplotipo i y l es el número de haplotipos distintos. Para el DNA nuclear y en el caso de organismos diploides con apareamiento al azar, la diversidad haplotípica coincide con la heterozigosidad. La diversidad haplotípica tiene un rango que fluctúa entre 0, en el caso de que exista un sólo haplotipo, y 1 cuando todos los haplotipos son únicos.

La varianza de h se calculó mediante la expresión:

$$V(h) = 2 \left\{ 2(n - 2) \left[\sum_{i=1}^l x_i^3 - \left(\sum_{i=1}^l x_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^l x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^l x_i^2 \right)^2 \right\} / (n - 1)n$$

obtenida tras modificar la ecuación 10 de Nei (1978) como indican Nei & Tajima (1981).

b) HETEROZIGOSIDAD POR NUCLEOTIDO

Se utilizaron tres estimadores diferentes para calcular la heterozigosidad por nucleótido o diversidad nucleotídica (Engels 1981; Nei & Tajima 1981; Hudson 1982). Dicho índice expresa la probabilidad de que para un par de nucleótidos concreto se tenga un heterozigoto al tomar dos cromosomas homólogos al azar.

1. H (Engels 1981):

Se estimó dicho parámetro a partir de su ecuación 11:

$$H = \frac{nc - \sum_{i=1}^m c_i^2}{jc(n - 1)}$$

siendo n el tamaño de la muestra, m el número de posiciones distintas de corte, c_i el número de cortes de restricción en la posición i en la muestra, c el número total de posiciones de corte por enzimas de restricción, j el número de pares de bases de las dianas reconocidas por los enzimas de restricción. Este estimador no requiere la suposición de neutralidad pero, sin embargo, depende de la existencia de equilibrio de ligamiento entre posiciones de restricción.

La varianza de este estimador se puede calcular con la ecuación 21 de Engels (1981):

$$V(H) = \frac{\sum_{i=1}^m c_i(n - c_i)[2cc_i - \sum_{i=1}^m c_i^2]^2}{j^2 n(n - 1)^2 c^4}$$

Debido a la suposición de equilibrio de ligamiento, se espera que la estima de esta varianza sea menor de la real.

2. π (Nei & Tajima 1981)

Se calculó el estimador propuesto por Nei & Tajima (1981) de la heterozigosis por nucleótido en su ecuación 18. Dicho estimador tiene la particularidad de no depender ni de la suposición de neutralidad ni de la existencia de equilibrio de ligamiento:

$$\pi = \frac{n}{(n-1)} \sum_{i \neq j} x_i x_j \pi_{ij}$$

donde n es el tamaño de la muestra, x_i la frecuencia del haplotipo i , y π_{ij} es el número de diferencias nucleotídicas por nucleótido entre el haplotipo i y el j . π_{ij} se puede estimar como $-\ln S_{ij} / r$ (Nei & Li 1979), donde S_{ij} es la fracción de posiciones compartidas entre el haplotipo i y el j y r es el número de pares de bases de las dianas de restricción. S_{ij} se estima como $2m_{ij} / (m_i + m_j)$ siendo m_{ij} el número de dianas de restricción compartidas entre los haplotipos i y j y m_i el número de dianas presentes en el haplotipo i . La varianza de este estimador se calculó mediante la ecuación 11 de Nei & Tajima (1981):

$$V(\pi) = \frac{4}{n(n-1)} [(6-4n) \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij}^2 + (n-2) \sum_{i < j} x_i x_j x_k \pi_{ij} \pi_{ik} + \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij}^2]$$

3. θ (Hudson 1982):

También se calculó el estimador propuesto por Hudson (1982) de la heterozigosidad por nucleótido:

$$\theta = p/\ln(n)$$

donde p es la proporción de posiciones nucleotídicas polimórficas en la muestra y n es el tamaño de la misma. p se estima como $k/(2m - k)j$ siendo k el número de dianas de restricción que son polimórficas, m el número total de dianas de restricción distintas analizadas y j es el número de pares de bases de la diana de restricción. La estimación de la heterozigosidad por nucleótido es $\theta / (1 + \theta)$, estima que es prácticamente igual a θ para valores pequeños de θ . Este estimador no tiene en cuenta las frecuencias de las posiciones polimórficas aunque sí su número, y depende de la suposición de neutralidad. Además, este estimador proporciona una buena estima de $4N_e\mu$, donde N_e es el tamaño efectivo poblacional y μ es la tasa de mutación por nucleótido hacia alternativas selectivamente neutras.

Se calcularon las dos varianzas que presenta Hudson (1982) para los casos extremos de que exista libre recombinación (en la ecuación 19) o de que no exista recombinación (ecuación 23). Para el caso de libre recombinación:

$$V(\theta) = \theta^2/k$$

Para el caso de que no exista recombinación la expresión es la siguiente:

$$V(\theta) = \frac{\theta^2}{k} + \frac{\theta^2}{\{\ln(n)\}^2} \sum_{i=1}^{n-1} 1/i^2$$

c) VARIACION INTERPOBLACIONAL

Se calcularon las diferencias nucleotídicas netas para todas las parejas de las poblaciones analizadas mediante el estimador propuesto por Nei & Li (1979):

$$\delta = \pi_{XY} - (\pi_X + \pi_Y)/2$$

siendo: $\pi_{XY} = \sum x_i y_j \pi_{ij}$; $\pi_X = \sum x_i x_j \pi_{ij}$ y $\pi_Y = \sum y_i y_j \pi_{ij}$, donde x_i y y_i son las frecuencias del haplotipo i en la población X e Y respectivamente. Este parámetro indica las diferencias nucleotídicas que existen entre dos poblaciones teniendo en cuenta el polimorfismo intrapoblacional.

2.3.4.2 Desequilibrio de ligamiento

Se calculó el desequilibrio de ligamiento entre las distintas posiciones variables por sustitución nucleotídica mediante los parámetros D , D' y r . D es una medida de la desviación entre la frecuencia gamética observada y la esperada para el caso de asociación alélica al azar (Lewontin & Kojima 1960):

$$D = X_1 - p_1q_1$$

Donde X_1 es la frecuencia observada del tipo gamético ++, p_1 la frecuencia del alelo + del primer locus y q_1 la frecuencia del alelo + del segundo locus. El rango de D oscila entre -0.25 y +0.25.

El parámetro D' es el cociente de D respecto a su máximo teórico (Lewontin 1964):

$$D' = D / D_{max}$$

D_{max} se define como:

$$D_{max} = \min (p_1q_2, p_2q_1) \text{ si } D > 0$$

$$D_{max} = \min (p_1q_1, p_2q_2) \text{ si } D < 0$$

Donde p_2 es la frecuencia del alelo - del primer locus y q_2 la frecuencia del alelo - del segundo locus. Este parámetro tiene un rango desde -1 hasta +1.

El coeficiente de correlación r (Hill & Robertson 1968) se define como:

$$r = D / (p_1q_1p_2q_2)^{1/2}$$

r que tiene un rango de -1 hasta +1 se puede considerar como una medida estandarizada del desequilibrio gamético.

Se calculó el desequilibrio gamético para todos los pares de posiciones de restricción de cada población, en los cuales la variante más rara estuviera presente más de una vez en la muestra. La significación estadística del desequilibrio gamético fué analizada usando el test exacto de Fisher con dos colas, para una tabla de contingencia de 2 x 2.

2.3.5 TRATAMIENTO INFORMÁTICO

Se redactaron diversos programas de ordenador para el análisis de los datos. Los programas realizaron los siguientes trabajos:

- Búsqueda de dianas de restricción.
- Búsqueda de dianas potenciales de restricción.
- Búsqueda de las posiciones variables discordantes.
- Búsqueda de diferencias entre haplotipos.
- Cálculo de los estimadores de heterozigidad por nucleótido de Engels, Hudson y Nei & Tajima.
- Cálculo de los parámetros D , D' y r del desequilibrio de ligamiento.
- Cálculo del estimador de diversidad haplotípica de Nei & Tajima.
- Cálculo del estimador de las diferencias nucleotídicas netas entre poblaciones de Nei & Li.
- Cálculo del test exacto de Fisher.
- Cálculo del test propuesto por Hudson para comparar heterozigosidades.

RESULTADOS

3.1 POLIMORFISMO CROMOSOMICO

En la tabla 2 se presentan las frecuencias absolutas y relativas de las diferentes ordenaciones cromosómicas analizadas. Las inversiones cromosómicas polimórficas en las poblaciones estudiadas se pueden dividir en 3 grupos O_{st} , O_{3+4} y O_{3+4+8} en función de la localización del locus *rp49* [segmento I del cromosoma O, banda 91C (Aguadé 1988a)]. Dentro de cada uno de estos grupos de ordenaciones cromosómicas la posición del locus *rp49* se mantiene constante (figura 6). Las líneas pertenecientes al mismo grupo cromosómico podrán intercambiar libremente información génica para el locus *rp49* (ya que no existe inversión cromosómica que afecte al locus *rp49*). Por el contrario, el flujo génico para el locus *rp49* estaría inhibido en líneas de distinto grupo de ordenaciones cromosómicas (el locus *rp49* quedaría dentro del asa de inversión en el apareamiento cromosómico en la meiosis). Siempre que se hagan comparaciones o análisis intra- o interordenaciones, si no se especifica lo contrario, se efectuarán entre estos 3 grupos de ordenaciones cromosómicas que afectan al locus *rp49*.

En la población de Ter Apel se han analizado 4 líneas de la ordenación cromosómica $O_{3+4+13+12}$. Esta ordenación presenta la inversión 13 que afecta al segmento I del cromosoma O. Sin embargo, como el locus *rp49* queda fuera de la inversión 13 en un cromosoma O_{3+4} , permite incluir la ordenación $O_{3+4+13+12}$ dentro del grupo O_{3+4} .

S.I	Ord.	Barcelona		Ter Apel		Tenerife		Santiago	
		n=49		n=54		n=54		n=54	
		a	b	a	b	a	b	a	b
O _{st}	O _{st}	10	0.20	36	0.67			12	0.22
	O ₅							6	0.11
	O ₆			1	0.02				
O ₃₊₄	O ₃₊₄	15	0.31	5	0.09	54	1.00		
	O ₃₊₄₊₂							21	0.39
	O ₃₊₄₊₇	12	0.25					8	0.15
	O ₃₊₄₊₂₂	4	0.08						
	O ₃₊₄₊₁₃₊₁₂			4	0.07				
O ₃₊₄₊₈	O ₃₊₄₊₈	8	0.16	8	0.15			7	0.13

Tabla 2. Ordenaciones cromosómicas para el cromosoma O y sus frecuencias absolutas (a) y relativas (b). Ord., Ordenación cromosómica. S.I., Ordenación para el segmento I del cromosoma O al considerar la posición del locus *rp49*.

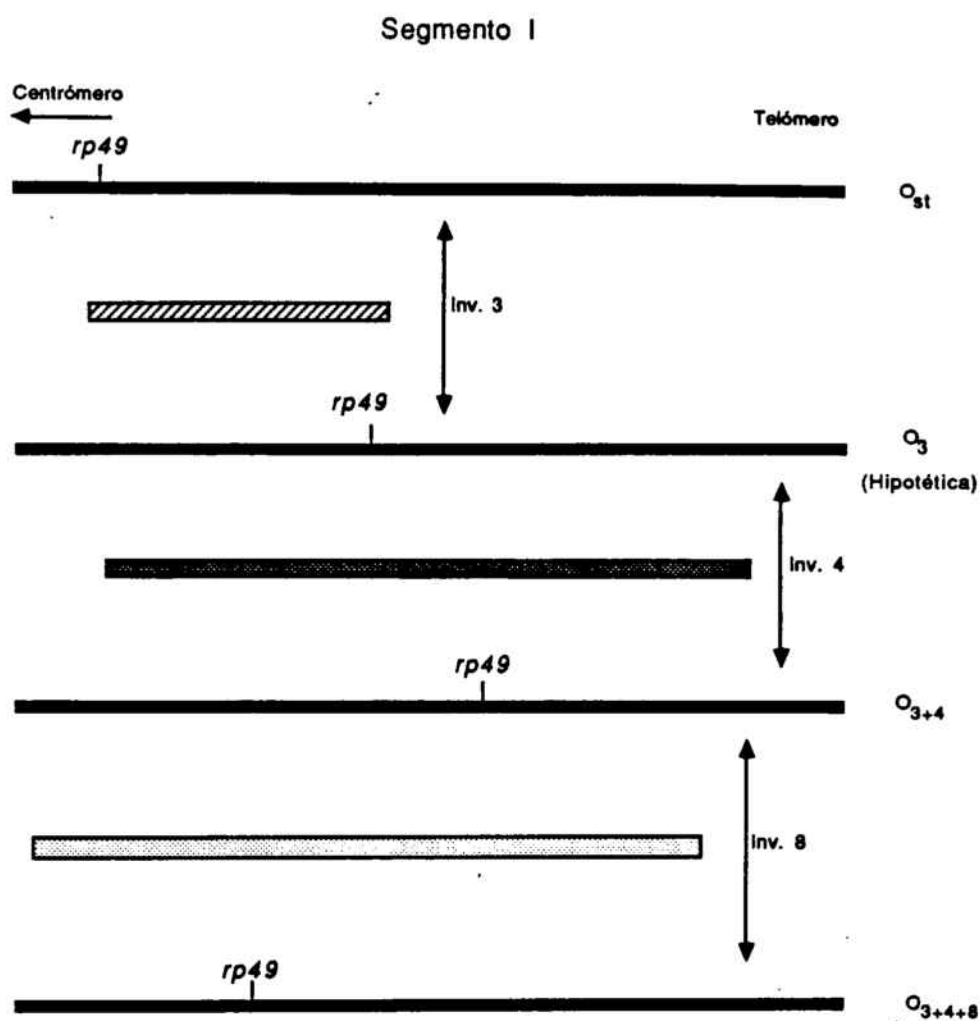


Figura 6. Localización del locus *rp49* en los 3 grupos de ordenaciones cromosómicas en los que se han dividido las ordenaciones cromosómicas analizadas en este estudio y en la ordenación cromosómica O_3 , ordenación cromosómica no existente en la actualidad. Las barras sombreadas entre ordenaciones cromosómicas indican la región cromosómica afectada por una inversión determinada.

3.2 VARIABILIDAD NUCLEOTIDICA DETECTABLE

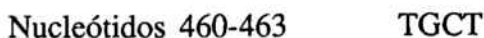
El disponer de la secuencia nucleotídica de la región *rp49* (Aguadé 1988a) permitió calcular la fracción de los cambios nucleotídicos por sustitución nucleotídica capaz de ser detectada con una serie de enzimas de restricción dada.

Para el cálculo se contabilizaron todas las dianas de restricción detectables descontándose aquellas que no lo fueran por generar fragmentos demasiado pequeños (los fragmentos de menos de 60 pares de bases no se pueden detectar sin ambigüedad en las autorradiografías). En los casos que hubo solapamiento de dianas se hicieron las correcciones necesarias; si dos dianas de 4 pares de bases se solapaban por dos nucleótidos, por ejemplo:



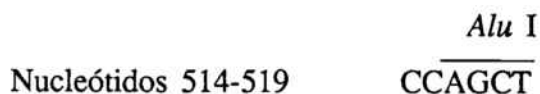
se contabilizó como si fueran 1.5 dianas.

También se contabilizó el número de dianas potenciales o número de dianas de restricción que se pueden generar tras un único cambio puntual, como por ejemplo:



si existe un cambio en la primera timina hacia adenina nos genera la secuencia AGCT que es reconocida por el enzima *Alu I*. En el caso de que el

cambio ya fuera detectable, por existir una diana real o potencial solapada, no se contabilizó la diana potencial, por ejemplo:



si existe un cambio en la adenina (nucleótido 516) hacia guanina nos genera la secuencia CCGG (nucleótidos 514-517) reconocida por el enzima *Msp* I. Sin embargo, los cambios en el nucleótido 516 ya eran detectables por formar parte de la diana *Alu* I (nucleótidos 516-519).

En las dianas reales se puede detectar el cambio de cualquiera de los cuatro nucleótidos (cualquier cambio nucleotídico producirá una pérdida de diana de restricción que se podrá detectar). Sin embargo en las dianas potenciales sólo detectaremos 1/3 de los cambios por sustitución nucleotídica que se produzcan en uno de los nucleótidos, si suponemos que todos los cambios son igualmente probables. En el ejemplo de los nucleótidos 460-463 la primera timina puede mutar hacia: $T \rightarrow A$; $T \rightarrow G$; $T \rightarrow C$, siendo sólo detectable el cambio hacia adenina.

El número de equivalentes nucleotídicos (número total de nucleótidos en los que se pueden detectar cambios nucleotídicos) resultó ser 245 ($32.5 \times 4 + 345 \times 1/3$) para los 1593 pb secuenciados (tabla 3); por lo tanto, con el juego de enzimas de restricción utilizado se es capaz de detectar cualquier cambio en 245 nucleótidos de los 1593 de la región *rp49*, para cada línea estudiada. La fracción de análisis fué por tanto del 15.38 % ($245 \times 100 / 1593$).

Nº nucleótidos	5' 866		Exón 1 93		Intrón 62		Exón 2 309		3' 213		Total 1593	
	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
<i>Alu</i> I	4	35	0	3	0	1	2	12	1	7	7	59
<i>Dde</i> I	2	26	0	4	0	2	0	11	0	6	2	51
<i>Hae</i> III	2	9	1	4	0	2	1	9	0	2	4	26
<i>Hha</i> I	2	23	1	6	0	0	3	16	0	2	6	48
<i>Msp</i> I	0	20	0.5	5	0	0	0	11	0	1	0.5	37
<i>Sau</i> 3A	1	36	2	1	0	2	1.5	12	1	4	6	57
<i>Taq</i> I	3	36	0	4	0	3	2	14	1	7	7	67
Total	14	185	4.5	27	0	10	9.5	85	3	29	32.5	345
Nº equivalentes	117.67		27		3.33		66.33		21.67		245	
% análisis	13.59		29.03		5.37		21.47		10.17		15.38	

Tabla 3. Número de dianas de restricción (R) y de dianas potenciales (P), para las distintas zonas funcionales del locus *rp49* y para los distintos enzimas de restricción utilizados. En la parte superior se indica el número de pares de bases que comprende cada región funcional. En la parte inferior se muestra el número de equivalentes nucleotídicos y el % de análisis. En la región 3' no está incluida la región que afecta al locus *serendipity*.

Al comparar la fracción de análisis entre diferentes regiones funcionales se observa una gran heterogeneidad: tiene un máximo en los exones (29.03 % y 21.47 % para los exones 1 y 2 respectivamente) y un mínimo de 5.37 % para el intrón. En las regiones 5' y 3' los valores son del 13.59 % y 10.17 % respectivamente. Esta heterogeneidad se basaría en el mayor contenido en GC (guanina, citosina) de los exones de la zona codificadora del locus *rp49* (al igual que en muchos otros loci) y asimismo en que los enzimas de restricción utilizados (ver tabla 1) reconocen

preferentemente los pares nucleotídicos GC.

El análisis de la variabilidad no se limitó a la región utilizada como sonda sino que también se analizaron dianas que estaban fuera de la misma pero cuyos fragmentos de restricción eran detectables al incluir parte de la región de la sonda. Sin embargo, las dos dianas de restricción más extremas no se contabilizaron ya que, en algún caso, no sería posible distinguir cambios por pérdida o ganancia de una diana de restricción de cambios por inserción-delección.

3.3 VARIABILIDAD EN EL MAPA DE RESTRICCIÓN

Se detectaron un total de 27 polimorfismos, 19 por sustitución nucleotídica y 8 por inserción-delección, que se numeraron del 1 al 27 en función de su posición en el mapa (tabla 4). Se siguió la numeración empleada por Aguadé (1988a) para la secuencia de la región *rp49*, asignando como nucleótido número 1 al primer par nucleotídico de la zona flanqueante 5' del locus *rp49* del fragmento utilizado como sonda (rp 1.6). Siempre que se haga referencia a algún polimorfismo el número del mismo irá precedido del símbolo (#) con objeto de evitar errores de interpretación.

En las figuras 7, 8, 9 y 10 se resume la variabilidad detectada en el mapa de restricción en las poblaciones de Barcelona, Ter Apel, Tenerife y Santiago, respectivamente. En las tablas 5, 6, 7 y 8 se muestra el mapa de restricción para cada una de las líneas analizadas de las poblaciones de Barcelona (49 líneas), Ter Apel (58 líneas), Tenerife (54 líneas) y Santiago (54 líneas).

Substitución nucleotídica.			Inserción-delección	
#1	<i>Dde</i> I	-136	#3	64 - 163
#2	<i>Alu</i> I	-127	#5	164 - 352
#4	<i>Sau3A</i> I	234	#8	353 - 380
#6	<i>Sau3A</i> I	289	#10	381 - 498
#7	<i>Sau3A</i> I	361	#18	717 - 859
#9	<i>Alu</i> I	379 - 382	#20	939 - 1032
#11	<i>Hae</i> III	524	#23	1375 - 1418
#12	<i>Sau3A</i> I	537	#26	1419 - 1563
#13	<i>Hae</i> III	547 - 550		
#14	<i>Sau3A</i> I	641 - 644		
#15	<i>Hha</i> I	702		
#16	<i>Hha</i> I	701 - 704		
#17	<i>Dde</i> I	716 - 720		
#19	<i>Sau3A</i> I	939 - 942		
#21	<i>Taq</i> I	1260 - 1263		
#22	<i>Sau3A</i> I	1284 - 1285		
#24	<i>Alu</i> I	1417 - 1420		
#25	<i>Taq</i> I	1475		
#27	<i>Hae</i> III	1993		

Tabla 4. Posición de los polimorfismos por substitución nucleotídica e inserción-delección de acuerdo con las coordenadas de Aguadé (1988a).

Figuras 7, 8, 9 y 10. Variación en el mapa de restricción de la región *rp49* de las poblaciones de Barcelona, Ter Apel, Tenerife y Santiago, respectivamente. *rp* 1.6 indica el fragmento utilizado como sonda. Las posiciones polimórficas se indican con números en la parte superior de la línea (en triángulos se muestran las inserciones/delecciones). La posición exacta de los polimorfismos se indica en la tabla 4. En la parte inferior se muestran las posiciones monomórficas (A, *Alu* I; D, *Dde* I; E, *Hae* III; H, *Hha* I; M, *Msp* I; S, *Sau3A* I; T, *Taq* I). En rectángulos se señalan las zonas codificadoras de los loci *rp49* y *serendipity*. Las coordenadas, línea inferior, se indican en pares de bases.

rp 1.6

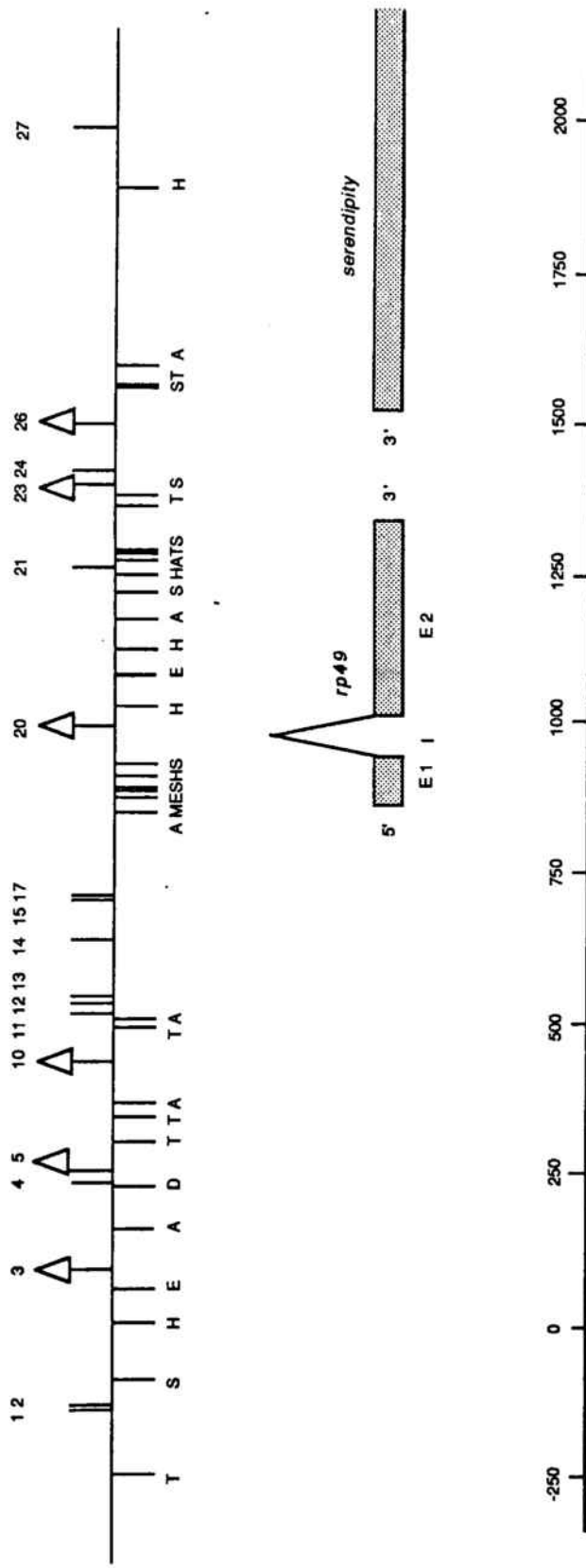


Figura 7. Variación en el mapa de restricción de la población de Barcelona

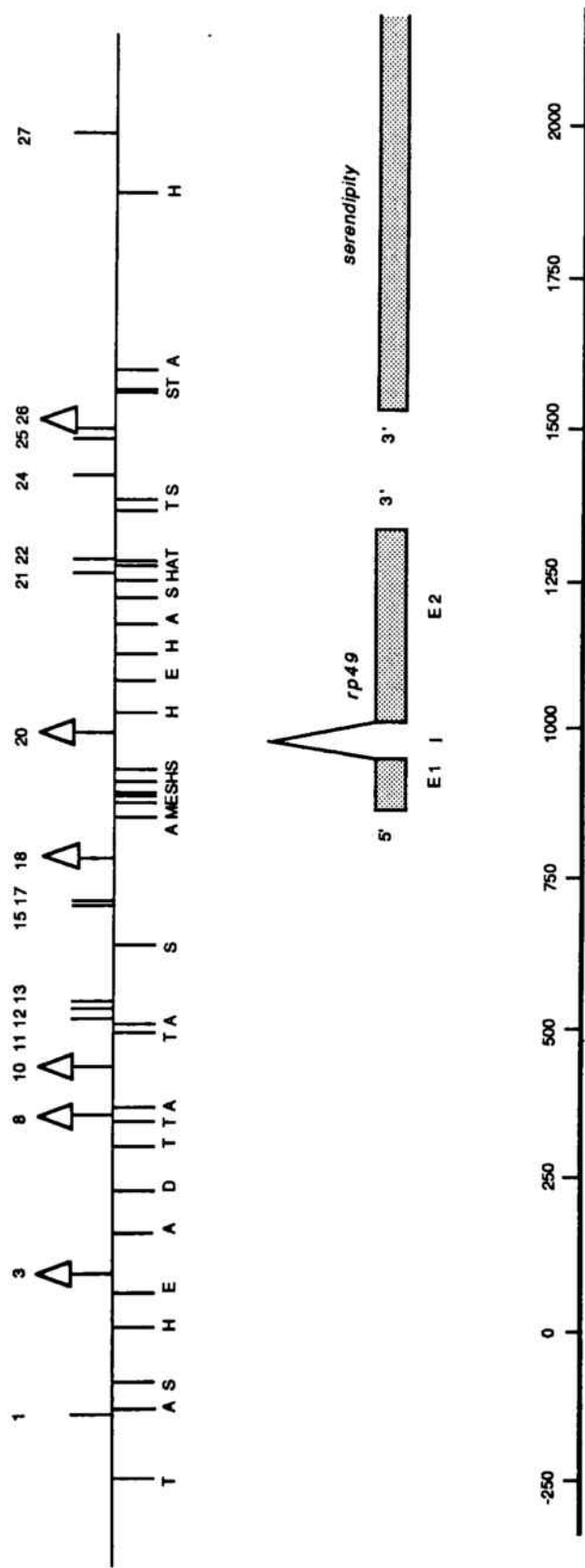


Figura 8. Variación en el mapa de restricción de la población de Ter Apel

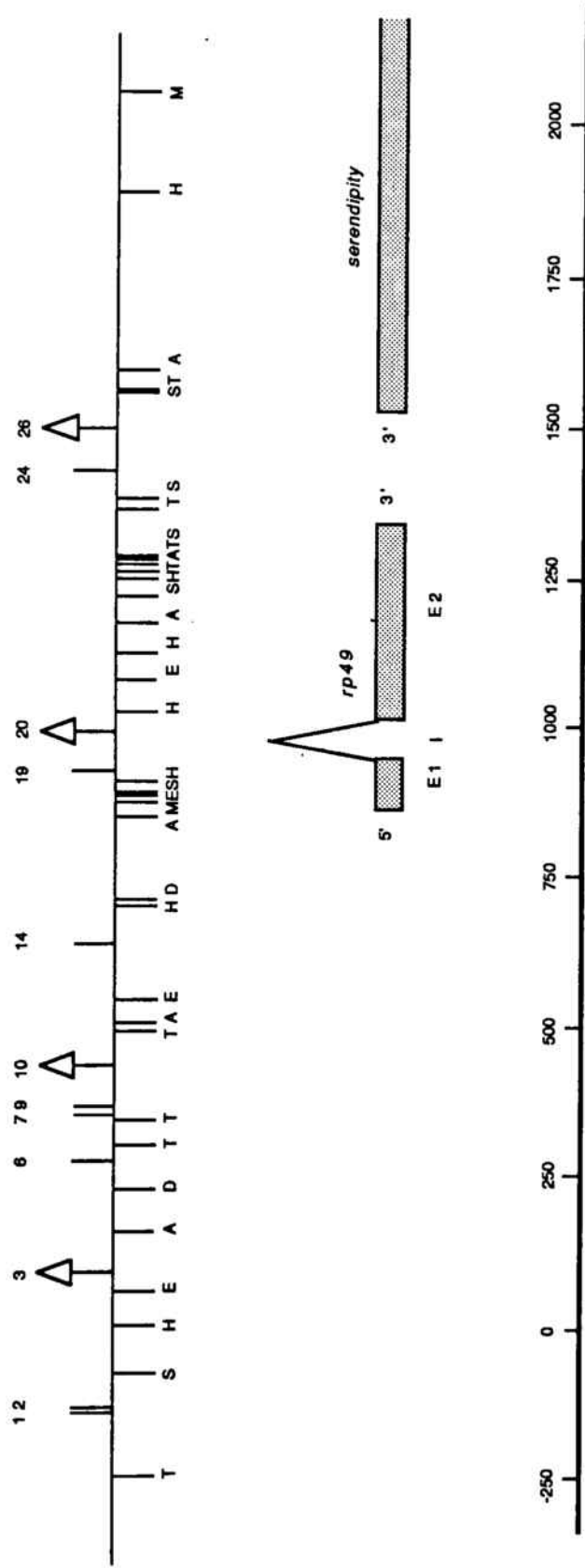


Figura 9. Variación en el mapa de restricción de la población de Tenerife

rp 1.6

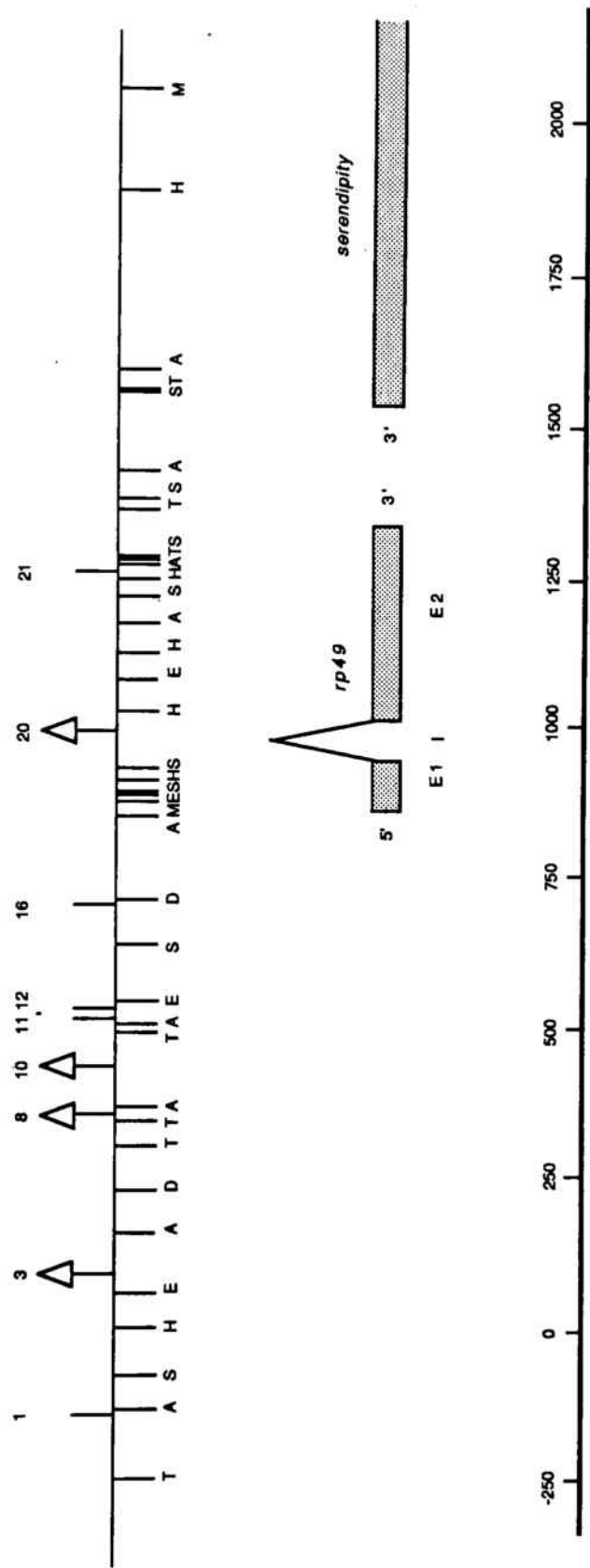


Figura 10. Variación en el mapa de restricción de la población de Santiago

Tablas 5, 6, 7 y 8. Variabilidad en el mapa de restricción en la región del gen *rp49* de cada una de las líneas analizadas en la población de Barcelona, Ter Apel, Tenerife y Santiago, respectivamente. El tipo de polimorfismo y su localización nucleotídica exacta se indica en la tabla 4. +/- indican la presencia o ausencia de una diana de restricción, para el caso de sustitución nucleotídica. En los polimorfismos por inserción-delección, los diferentes números indican distintos tamaños para la misma inserción/delección; - corresponde a la longitud presente en la línea H27 secuenciada por Agudé (1988a). La columna Lin. indica el número de cada línea. La columna ORD. expresa la ordenación cromosómica para el cromosoma O de cada línea analizada. En la población de Ter Apel las 54 primeras líneas corresponden a la muestra aleatoria de la población mientras que las indicadas con * son las 4 líneas que se añadieron con objeto de ampliar la muestra de la ordenación O_{3+4} .

Lin	#	1	2	3	4	5	10	11	12	13	14	15	17	20	21	23	24	26	27	ORD.
1		+	+	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	St
2		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	St
3		-	+	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	St
4		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	St
5		-	+	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	St
6		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	St
7		+	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	St
8		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	St
9		-	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	3	-	St
10		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	+	St
11		+	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4+8
12		+	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4+8
13		+	+	-1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	3+4+8
14		+	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	3+4+8
15		+	+	-1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	3+4+8
16		+	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4+8
17		+	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+1	+	-	+	-	-	3+4+8
18		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-1	+	-	+	-	-	3+4+8
19		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4
20		+	+	-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+2	-	-	+	-	+	3+4
21		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+2	+	-	+	-	-	3+4
22		+	+	+1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	-	-	-	3+4
23		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	2	-	3+4
24		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	3+4
25		+	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4
26		-	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	3+4
27		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+1	+	-	+	1	-	3+4
28		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	-	+1	+	-	+	-	-	3+4
29		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4
30		+	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4
31		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4
32		+	+	-1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	3+4
33		+	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4
34		-	+	-2	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4+7
35		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	3+4+7
36		-	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	3+4+7
37		+	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+1	+	-	+	-	-	3+4+7
38		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	4	-	3+4+7
39		+	+	+1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+2	-	-	+	-	-	3+4+7
40		+	+	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	2	-	3+4+7
41		-	+	-1	-	-	-1	-	+	+	+	+	+	+2	+	-	+	4	-	3+4+7
42		-	+	-	-	-	-1	-	-	-	+	+	+	-1	+	-	+	-	-	3+4+7
43		-	+	-1	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+1	+	-	+	2	-	3+4+7
44		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	-	+2	+	-	+	-	-	3+4+7
45		-	-	-1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	4	-	3+4+7
46		+	+	-1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	4	-	3+4+22
47		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+2	-	+	+	-	-	3+4+22
48		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+1	+	-	+	-	-	3+4+22
49		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	4	-	3+4+22

Tabla 5. Variabilidad en el mapa de restricción de la población de Barcelona.

Lin	#	1	3	8	10	11	12	13	15	17	18	20	21	22	24	25	26	27	ORD.
1	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	+	St
2	-	-	-	-1	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
3	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
5	-	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
6	-	+1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
7	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	St
8	-	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
9	-	+2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
10	-	+1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
11	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	St
12	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
13	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
14	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
15	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	3	-	St
16	-	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
17	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	+	St
18	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
19	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+3	+	+	+	-	-	+	St
20	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+3	+	+	+	-	-	-	St
21	-	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
22	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
23	-	+1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	St
24	-	-1	-	-1	-	-	-	-	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
25	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
26	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	+	St
27	-	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
28	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	St
29	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
30	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	St
31	-	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
32	-	-1	-1	-1	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
33	+	-1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
34	-	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
35	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	St
36	-	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	St
37	+	-2	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	6
38	+	-1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	3+4+8
39	+	-4	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	3+4+8
40	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	3+4+8
41	+	-1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	3+4+8
42	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	3+4+8
43	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	3+4+8
44	+	-1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	3+4+8
45	+	-1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	3+4+8
46	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	4	-	3+4+13+12
47	-	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+2	+	+	+	-	2	-	3+4+13+12
48	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-1	+	+	+	-	2	-	3+4+13+12
49	-	-1	-	-1	-	-	-	+	+	+	-	+1	+	+	+	-	1	-	3+4+13+12
50	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+1	-	+	+	-	2	-	3+4
51	+	-3	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+2	-	+	+	-	-	-	3+4
52	+	-1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	4	-	3+4
53	-	-1	+1	-	+	-	-	+	+	+	-	+1	+	+	+	-	-	-	3+4
54	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	4	-	3+4
55	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	4	-	3+4 *
56	-	-1	-	-1	-	-	-	+	+	+	-	+1	-	+	+	-	-	-	3+4 *
57	-	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	+	+	-	-	-	3+4 *
58	-	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-1	+	+	+	-	1	-	3+4 *

Tabla 6. Variabilidad en el mapa de restricción de la población de Ter Apel.

Lin	#	1	2	3	6	7	9	10	14	19	20	24	26	ORD.
1	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
2	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
3	+	+	-1	-	-	+	-	-	+	+2	+	-		3+4
4	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
5	-	+	-3	-	-	+	-1	+	+	-	+	-		3+4
6	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
7	+	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
8	-	+	-3	-	-	-	-	+	+	+2	+	-		3+4
9	-	+	-1	-	+	+	-	-	+	-	+	-		3+4
10	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
11	-	+	+1	-	-	+	-	+	+	-1	+	-		3+4
12	-	-	-1	-	-	+	-	+	+	-1	+	4		3+4
13	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-1	+	-		3+4
14	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
15	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
16	-	+	-3	-	-	+	-	+	-	+2	+	-		3+4
17	-	+	-3	-	-	+	-	-	+	+2	+	-		3+4
18	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
19	-	-	-3	-	-	-	-	-	+	-	+	-		3+4
20	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	4		3+4
21	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
22	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
23	-	+	-3	-	-	+	+1	+	+	+2	+	-		3+4
24	-	+	-1	-	-	-	-	+	+	-1	+	-		3+4
25	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
26	-	+	-3	-	-	+	-1	+	+	+2	+	-		3+4
27	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
28	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
29	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
30	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	4		3+4
31	-	+	-3	-	-	+	-	+	-	+2	+	-		3+4
32	-	+	-3	-	-	+	-	+	-	+2	+	-		3+4
33	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
34	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
35	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
36	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
37	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
38	-	+	-3	-	-	+	-	-	+	+2	+	-		3+4
39	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
40	-	-	-1	-	-	-	-	+	+	+2	+	1		3+4
41	-	+	-3	-	-	+	+1	+	+	+2	-	-		3+4
42	-	+	+1	-	-	+	-	-	+	-	+	-		3+4
43	-	+	-3	-	-	+	-	+	-	+2	+	-		3+4
44	-	+	-4	+	-	+	+1	+	+	+2	+	-		3+4
45	-	+	-3	-	-	+	+1	+	+	+2	+	-		3+4
46	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
47	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
48	-	-	-1	-	-	+	-	-	+	-	+	-		3+4
49	-	+	-1	-	-	+	+1	+	+	+2	+	-		3+4
50	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
51	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
52	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-		3+4
53	-	-	-1	-	-	+	-	-	+	-	+	-		3+4
54	-	+	-3	-	-	+	+1	+	+	+2	+	-		3+4

Tabla 7. Variabilidad en el mapa de restricción de la población de Tenerife.

Lin	#	1	3	8	10	11	12	16	20	21	ORD.
1	-	-1	-1	-	-	-	-	-	-	+	St
2	-	-3	-	-1	-	-	-	+	+3	+	St
3	-	-3	-	-1	-	-	-	+	+3	+	St
4	-	-1	-1	-	-	-	-	-	-	+	St
5	-	-3	-	-1	-	-	-	+	+3	+	St
6	-	-3	-	-1	-	-	-	+	+3	+	St
7	-	-3	-	-1	-	-	-	+	+3	+	St
8	-	-3	-	-1	-	-	-	+	+3	+	St
9	-	-3	-	-1	-	-	-	+	+3	+	St
10	-	-1	-1	-	-	-	-	-	-	+	St
11	-	-1	-1	-	-	-	-	-	-	+	St
12	-	-1	-1	-	-	-	-	-	-	+	St
13	-	-1	-1	-	-	-	-	-	-	+	5
14	-	-3	-	-1	-	-	-	+	+3	+	5
15	-	-1	-1	-	-	-	-	-	-	+	5
16	-	-1	-1	-	-	-	-	-	-	+	5
17	-	-3	-	-1	-	-	-	+	+3	+	5
18	-	-1	-1	-	-	-	-	-	-	+	5
19	+	-1	-	-	-	+	-	+	+2	+	3+4+8
20	+	-1	-	-	-	+	-	+	+2	+	3+4+8
21	+	-1	-	-	-	+	-	+	+2	+	3+4+8
22	+	-1	-	-	-	+	-	+	+2	+	3+4+8
23	+	-1	-	-	-	+	-	+	+2	+	3+4+8
24	+	-1	-	-	-	+	-	+	+2	+	3+4+8
25	+	-1	-	-	-	+	-	+	-	+	3+4+8
26	-	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	3+4+7
27	-	-	-	-	-	-	+	-	+2	-	3+4+7
28	+	-1	+1	-	-	+	-	+	+1	+	3+4+7
29	+	-1	+1	-	-	+	-	+	+1	+	3+4+7
30	+	-1	+1	-	-	+	-	+	+1	+	3+4+7
31	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+7
32	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+7
33	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+7
34	-	-2	-	-	-	-	-	+	-	+	3+4+2
35	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+2
36	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+2
37	+	-1	+1	-	-	+	-	+	+1	+	3+4+2
38	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+2
39	-	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	3+4+2
40	-	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	3+4+2
41	+	-1	+1	-	-	+	-	+	+1	+	3+4+2
42	-	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	3+4+2
43	-	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	3+4+2
44	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+2
45	+	-1	+1	-	-	+	-	+	+1	+	3+4+2
46	+	-1	+1	-	-	+	-	+	+1	+	3+4+2
47	-	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	3+4+2
48	-	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	3+4+2
49	+	-1	+1	-	-	+	-	+	+1	+	3+4+2
50	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+2
51	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+2
52	+	-1	+1	-	-	+	-	+	+1	+	3+4+2
53	-	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	3+4+2
54	-	-	-	-	-	-	+	+	+2	-	3+4+2

Tabla 8. Variabilidad en el mapa de restricción de la población de Santiago.

3.3.1 POLIMORFISMOS POR SUBSTITUCION NUCLEOTIDICA

En las 4 poblaciones analizadas se detectó un total de 19 polimorfismos por substitución nucleotídica (tabla 9). En la población de Barcelona resultaron 12 posiciones polimórficas -de una total de 44 analizadas-, 11 en Ter Apel -de un total de 44-, 8 en Tenerife -de un total de 43- y 5 en Santiago -de un total de 43- (tabla 10). La frecuencia de la variante menos frecuente de los polimorfismos fluctuó entre 0.41 y 0.02.

Pol	Barcelona n=49		Ter Apel n=54		Tenerife n=54		Santiago n=54	
	a	b	a	b	a	b	a	b
#1	19	0.39	22	0.41	2	0.04	16	0.30
#2	1	0.02			5	0.09		
#4	1	0.02						
#6					1	0.02		
#7					1	0.02		
#9					4	0.07		
#11	6	0.12	7	0.13			16	0.30
#12	4	0.08	1	0.02			11	0.20
#13	1	0.02	1	0.02				
#14	3	0.06			7	0.13		
#15	2	0.04	1	0.02				
#16							9	0.17
#17	3	0.06	2	0.04				
#19					4	0.07		
#21	3	0.06	2	0.04			11	0.20
#22			1	0.02				
#24	1	0.02	1	0.02	1	0.02		
#25			1	0.02				
#27	3	0.06	6	0.11				

Tabla 9. Frecuencias absolutas (a) y relativas (b) de los polimorfismos por substitución nucleotídica. La localización nucleotídica se indica en la tabla 4. Pol, polimorfismo.

	5'			E+I			3'			Total		
	M	P	T	M	P	T	M	P	T	M	P	T
Barcelona	12	9	21	14	1	15	2	1	3	32	12	44
Ter Apel	14	6	20	13	2	15	2	2	4	33	11	44
Tenerife	14	6	20	14	1	15	2	1	3	35	8	43
Santiago	16	4	20	14	1	15	3	0	3	38	5	43

Tabla 10. Número de dianas de restricción distintas que se analizaron y su distribución por regiones funcionales del locus *rp49* para la totalidad de los individuos de las poblaciones de Barcelona, Ter Apel, Tenerife y Santiago, respectivamente. E+I, región comprendida por el exón 1, exón 2 y el intrón. M, Número de dianas monomórficas. P, Número de dianas polimórficas. T, Total de dianas analizadas. En la región 3' no está incluida la región que afecta al locus *serendipity*.

En el caso de aquellos polimorfismos por sustitución nucleotídica resultantes de la ganancia de una diana de restricción se puede precisar el cambio nucleotídico que ha tenido que ocurrir. En cambio, en el caso de los polimorfismos resultantes de la pérdida de una diana de restricción no se puede precisar en cual de los cuatro nucleótidos de la diana de restricción se ha producido el cambio.

El polimorfismo #15, puede identificarse como la pérdida de la diana *Hha* I situada en las posiciones 701-704, pero también por la generación de una nueva diana *Alu* I. En la posición correspondiente de la secuencia (Aguadé 1988a) se observa la secuencia: GCGCT. Los cuatro primeros nucleótidos forman la diana reconocida por *Hha* I. Se puede constatar que si la citosina en posición 702 cambia a adenina se genera una diana *Alu* I con la pérdida de la diana *Hha* I.



Se detectó también otro polimorfismo (#16) como pérdida de la diana *Hha* I en la posición 701-704, que no generaba una nueva diana *Alu* I. Por lo tanto, es necesario suponer de la existencia de otra sustitución nucleotídica diferente a la del polimorfismo #15.

Varios de los polimorfismos por sustitución nucleotídica se observaron en más de una población (tabla 9). La población de Barcelona con 12 polimorfismos comparte 9 de los 11 polimorfismos presentes en Ter Apel, 4 de los 8 de Tenerife y 4 de los 5 de Santiago. La población de Ter Apel comparte 2 polimorfismos con la de Tenerife (también compartidos con Barcelona) y 4 con la de Santiago (igualmente compartidos con Barcelona). Por último, la población de Tenerife sólo comparte 1 polimorfismo con la de Santiago (también compartido con las poblaciones de Barcelona y Ter Apel).

También se identificaron polimorfismos específicos de población (ver tabla 9): uno en la población de Barcelona presente en una sólo línea; dos en Ter Apel observados también una sólo vez; cuatro en la población de Tenerife, 2 de ellos presentes una sólo vez y los otros dos presentes en 4 líneas y un polimorfismo exclusivo en la población de Santiago aunque identificado en 9 líneas.

Se comparó la frecuencia de cada polimorfismo por sustitución nucleotídica entre las distintas poblaciones usando el test exacto de Fisher con dos colas (tabla 11), comprobándose que entre las poblaciones de Barcelona y Ter Apel las frecuencias de los polimorfismos no diferían significativamente aunque sí diferían entre estas poblaciones y las de Tenerife y Santiago. Al no detectarse heterogeneidad en cuanto a la frecuencia de cada polimorfismo entre

las poblaciones de Barcelona y Ter Apel, se procedió a su agrupación. En la comparación del "pool" de Barcelona y Ter Apel con las poblaciones de Tenerife y Santiago se observaron 7 y 5 polimorfismos con frecuencias significativamente distintas. Entre estas dos últimas poblaciones se constataron diferencias significativas en la frecuencia de 7 polimorfismos.

BARCELONA / TER APEL Comparaciones: 14 Significativas: 0

BARCELONA / TENERIFE Comparaciones: 16 Significativas: 3

<u>#</u>	<u>P</u>
#1	0.0000 ***
#11	0.0098 **
#12	0.0479 *

TER APEL / TENERIFE Comparaciones: 17 Significativas: 5

<u>#</u>	<u>P</u>
#1	0.0000 ***
#2	0.0284 *
#11	0.0064 **
#14	0.0064 **
#27	0.0135 *

BCN + TA / TENERIFE Comparaciones: 18 Significativas: 7

<u>#</u>	<u>P</u>
#1	0.0000 ***
#2	0.0186 *
#9	0.0130 *
#11	0.0046 **
#14	0.0326 *
#19	0.0130 *
#27	0.0281 *

(Tabla 11, continúa)

BARCELONA / SANTIAGO	Comparaciones: 13	Significativas: 2
	<u>#</u>	<u>P</u>
	#16	0.0029 **
	#21	0.0450 *
TER APEL / SANTIAGO	Comparaciones: 12	Significativas: 5
	<u>#</u>	<u>P</u>
	#11	0.0380 *
	#12	0.0021 **
	#16	0.0014 **
	#21	0.0086 **
	#27	0.0135 *
BCN + TA / SANTIAGO	Comparaciones: 15	Significativas: 5
	<u>#</u>	<u>P</u>
	#11	0.0160 *
	#12	0.0042 **
	#16	0.0000 ***
	#21	0.0042 **
	#27	0.0281 *
TENERIFE / SANTIAGO	Comparaciones: 12	Significativas: 7
	<u>#</u>	<u>P</u>
	#1	0.0003 ***
	#2	0.0284 *
	#11	0.0000 ***
	#12	0.0003 ***
	#14	0.0064 **
	#16	0.0014 **
	#21	0.0003 ***

Tabla 11. Comparación de la frecuencia de los polimorfismos por sustitución nucleotídica entre distintas poblaciones mediante el test exacto de Fisher con dos colas. Aún cuando se especifica el número de comparaciones efectuadas, sólo se indica el resultado de aquellas que han resultado significativas. # Número de la posición polimórfica comparada. P, probabilidad. Significación estadística: * P < 0.05. ** P < 0.01. *** P < 0.001.

3.3.1.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas

En la tabla 12 se indica el número de dianas monomórficas y polimórficas en cada uno de los tres grupos de ordenaciones cromosómicas. La distribución de la frecuencia absoluta de cada polimorfismo por sustitución nucleotídica se indica en la tabla 13. La figura 11 muestra un histograma de las frecuencias relativas.

		n	Dianas Monomórficas	Dianas Polimórficas
BCN	O _{st}	10	38	3
	O ₃₊₄	31	32	12
	O ₃₊₄₊₈	8	40	2
	Total	49	32	12
TA	O _{st}	37	35	8
	O ₃₊₄	13	38	5
	O ₃₊₄₊₈	8	40	2
	Total	54	33	11
TEN	O ₃₊₄	54	35	8
SAN	O _{st}	18	39	1
	O ₃₊₄	29	39	4
	O ₃₊₄₊₈	7	42	0
	Total	54	38	5

Tabla 12. Número de dianas de restricción monomórficas y polimórficas analizadas y su distribución por ordenaciones cromosómicas. n, tamaño de la muestra. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. TEN, Tenerife. SAN, Santiago.

Pob	Ord	n	#																		
			1	2	4	6	7	9	11	12	13	14	15	16	17	19	21	22	24	25	27
			<i>DdeI</i>	<i>AluI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>Sau3A</i>	<i>Sau3A</i>	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Sau3A</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Sau3A</i>	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>DdeI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>TaqI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>AluI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HaeIII</i>
			-136	-127	234	289	361	379	524	537	547	641	702	701	716	939	1260	1284	1417	1475	1993
								382		550	644			704	720	942	1263	1285	1420		
BCN	O_{st}	10	2	0	0			0	0	0	0	0	0		1		0	0	0		2
	O_{3+4}	31	10	1	1			4	4	1	3	2	2		2		3	1	1		1
	O_{3+4+8}	8	7	0	0			2	0	0	0	0	0		0		0	0	0		0
TA	O_{st}	37	9					1	0	1	0	0	0		1		0	1	1	1	6
	O_{3+4}	13	6					2	1	0	1	1	0		0		3	0	0	0	0
	O_{3+4+8}	8	8					4	0	0	0	0	0		1		0	0	0	0	0
TEN	O_{3+4}	54	2	5	1	1	4				7				4				1		
	O_{st}	18	0					0	0								0				0
SAN	O_{3+4}	29	9					9	11								11				0
	O_{3+4+8}	7	7					7	0								0				0

Tabla 13. Frecuencia absoluta de la variante menos frecuente para cada una de las posiciones polimórficas por sustitución nucleotídica. #, número de posición polimórfica. Para cada polimorfismo se indica el enzima de restricción y su localización exacta. Pob, población. Ord, grupo cromosómico. n, tamaño muestral. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. TEN, Tenerife. SAN, Santiago.

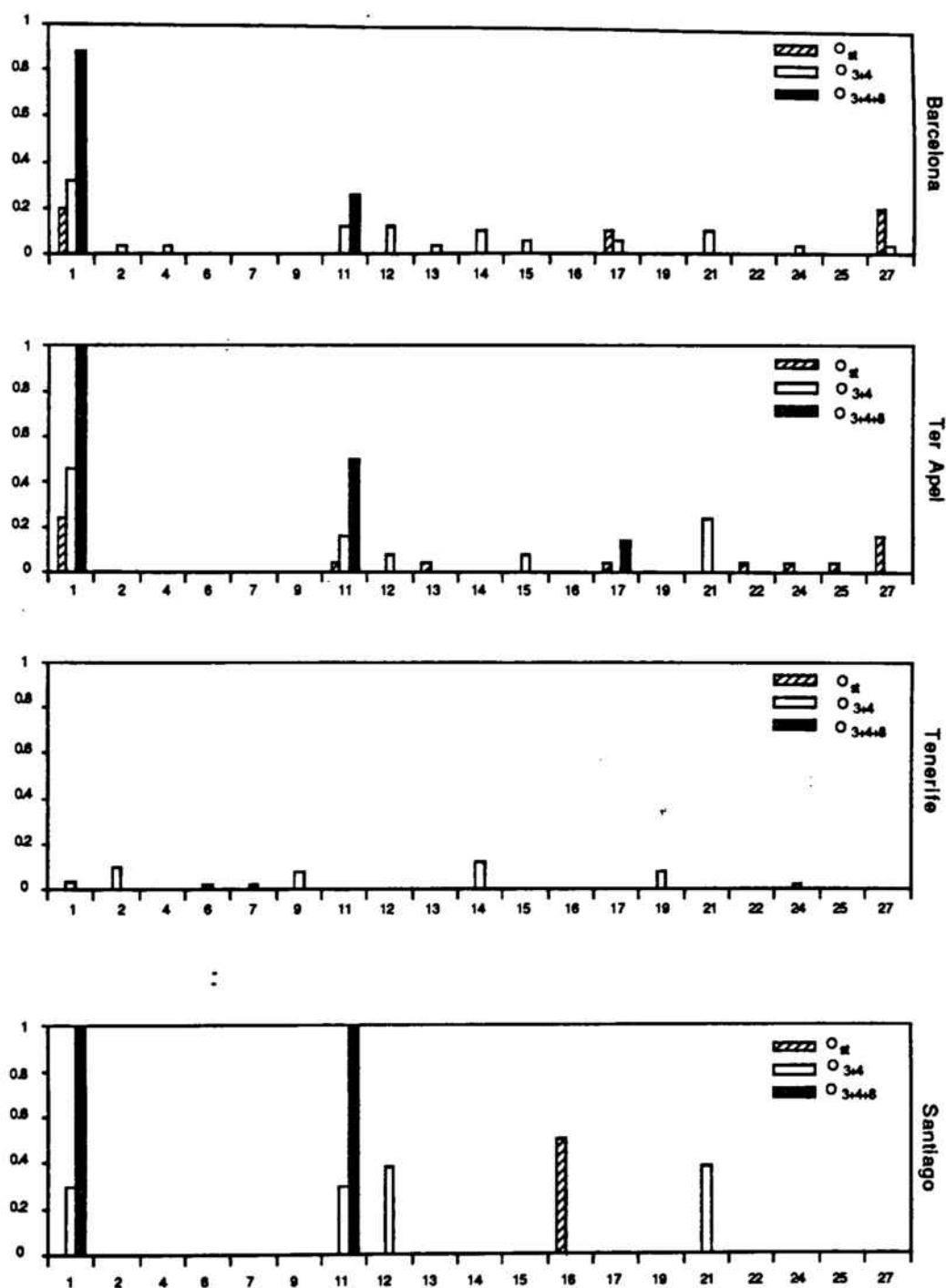


Figura 11. Distribución de la frecuencia de la variante más rara de los polimorfismos por sustitución nucleotídica para cada ordenación cromosómica. En abscisas, se indica el número de cada polimorfismo.

En la población de Barcelona de las 12 posiciones polimórficas por sustitución nucleotídica 3 segregaban en la ordenación O_{st} , 12 en O_{3+4} y 2 en O_{3+4+8} . En Ter Apel de las 11 posiciones polimórficas 8 segregaban en la ordenación O_{st} , 5 en O_{3+4} y 2 en O_{3+4+8} . La población de Tenerife resultó monomórfica para la ordenación cromosómica O_{3+4} , por lo que las 8 posiciones polimórficas segregaban en esta ordenación. En Santiago de las 5 posiciones polimórficas 1 segregaba en O_{st} , 4 en O_{3+4} y ninguna en O_{3+4+8} .

Se compararon entre las distintas poblaciones las frecuencias de los polimorfismos por sustitución nucleotídica que segregan en una misma ordenación cromosómica, usando el test exacto de Fisher con dos colas. Esta comparación se realizó con objeto de identificar posibles diferencias en el contenido génico (tabla 14).

BARCELONA / TER APEL	O_{st}	Comparaciones: 8	Significativas: 0
BARCELONA / TER APEL	O_{3+4}	Comparaciones: 12	Significativas: 0
BARCELONA / TER APEL	O_{3+4+8}	Comparaciones: 3	Significativas: 0
BARCELONA / TENERIFE	O_{3+4}	Comparaciones: 16	Significativas: 4
		<u>#</u>	<u>P</u>
		#1	0.0005 ***
		#11	0.0155 *
		#12	0.0155 *
		#21	0.0455 *
TER APEL / TENERIFE	O_{3+4}	Comparaciones: 12	Significativas: 3
		<u>#</u>	<u>P</u>
		#1	0.0004 ***
		#11	0.0353 *
		#21	0.0060 **
BCN + TA / TENERIFE	O_{3+4}	Comparaciones: 16	Significativas: 4
		<u>#</u>	<u>P</u>
		#1	0.0000 ***
		#11	0.0067 **
		#12	0.0160 *
		#21	0.0067 **
BARCELONA / SANTIAGO	O_{st}	Comparaciones: 4	Significativas: 1
		<u>#</u>	<u>P</u>
		#16	0.0098 **
BARCELONA / SANTIAGO	O_{3+4}	Comparaciones: 12	Significativas: 2
		<u>#</u>	<u>P</u>
		#12	0.0369 *
		#21	0.0141 *
BARCELONA / SANTIAGO	O_{3+4+8}	Comparaciones: 2	Significativas: 1
		<u>#</u>	<u>P</u>
		#11	0.0070 **

(Tabla 14, continúa)

TER APEL / SANTIAGO	O_{st}	Comparaciones: 9	Significativas: 2
		$\frac{\#}{\#1}$	$\frac{P}{0.0232}$ *
		#16	0.0000 ***
TER APEL / SANTIAGO	O_{3+4}	Comparaciones: 5	Significativas: 0
TER APEL / SANTIAGO	O_{3+4+8}	Comparaciones: 2	Significativas: 0
BCN + TA / SANTIAGO	O_{st}	Comparaciones: 9	Significativas: 2
		$\frac{\#}{\#1}$	$\frac{P}{0.0267}$ *
		#16	0.0000 ***
BCN + TA / SANTIAGO	O_{3+4}	Comparaciones: 12	Significativas: 2
		$\frac{\#}{\#12}$	$\frac{P}{0.0100}$ *
		#21	0.0236 *
BCN + TA / SANTIAGO	O_{3+4+8}	Comparaciones: 3	Significativas: 1
		$\frac{\#}{\#11}$	$\frac{P}{0.0075}$ **
TENERIFE / SANTIAGO	O_{3+4}	Comparaciones: 11	Significativas: 4
		$\frac{\#}{\#1}$	$\frac{P}{0.0010}$ ***
		#11	0.0000 ***
		#12	0.0000 ***
		#21	0.0000 ***

Tabla 14. Comparación de la frecuencia de los polimorfismos que segregan en la misma ordenación cromosómica de distintas poblaciones, mediante el test exacto de Fisher con dos colas. Aún cuando se especifica el número de comparaciones efectuadas, sólo se indica el resultado de aquellas que han resultado significativas. # Número de la posición polimórfica comparada. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. P, probabilidad. Significación estadística * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

Dentro de la misma ordenación cromosómica, las frecuencias de los polimorfismos por sustitución nucleotídica resultaron homogéneas entre las poblaciones continentales (Barcelona y Ter Apel), no resultando significativo ninguno de los tests de heterogeneidad realizados (probabilidad mínima obtenida: 0.34). Debido a esta homogeneidad (intraordenación), se procedió a agrupar las líneas pertenecientes a la misma ordenación cromosómica de dichas poblaciones.

Dentro de una misma ordenación cromosómica, la frecuencia para varios polimorfismos difería significativamente en todas las comparaciones efectuadas entre el "pool" de Barcelona y Ter Apel respecto a la población de Tenerife y a la de Santiago. Entre el "pool" de Barcelona y Ter Apel y la población de Tenerife (ordenación cromosómica O_{3+4}) se observaron 4 polimorfismos cuyas frecuencias diferían significativamente. Entre este "pool" y la población de Santiago, se constataron diferencias significativas en las comparaciones realizadas en los tres grupos cromosómicos: 2 polimorfismos con frecuencias significativamente diferentes dentro de O_{st} , 2 dentro de O_{3+4} y una dentro de O_{3+4+8} . Y, entre las poblaciones de Tenerife y Santiago (ordenación O_{3+4}) se observaron diferencias en las frecuencias de 4 posiciones polimórficas.

Cuando se analizaron los polimorfismos por sustitución nucleotídica que segregaban en distintas ordenaciones cromosómicas se observó que existían varios polimorfismos compartidos entre distintas ordenaciones. En la población de Barcelona se observó un polimorfismo compartido por las 3 ordenaciones consideradas (#1); 2 polimorfismos compartidos entre O_{st} y O_{3+4} (#17 y #27); y uno entre O_{3+4} y O_{3+4+8} (#11). En Ter Apel existe un

polimorfismo compartido por las tres ordenaciones cromosómicas (#11); uno entre O_{st} y O_{3+4} (#1); y uno entre O_{st} y O_{3+4+8} (#17). Al agrupar las poblaciones de Barcelona y Ter Apel en un "pool" existen 3 polimorfismos compartidos por las tres ordenaciones cromosómicas consideradas (#1, #11 y #17) y 3 polimorfismos adicionales compartidos entre O_{st} y O_{3+4} (#13, #24, #27). En la población de Santiago no se observó ningún polimorfismo compartido por distintas ordenaciones cromosómicas.

Para analizar la posible heterogeneidad en la frecuencia de los polimorfismos compartidos por las tres ordenaciones cromosómicas se realizaron simulaciones de Monte Carlo para tablas de contingencia 2 x 3, como sugieren Lewontin & Felsenstein (1965), tabla 15. En la población de Barcelona, la frecuencia intraordenación del polimorfismo (#1) difirió significativamente entre las 3 ordenaciones cromosómicas. En la población de Ter Apel también difirió significativamente la frecuencia intraordenación del único polimorfismo compartido por las tres ordenaciones cromosómicas (#11). En el conjunto de las poblaciones europeas difirió significativamente la frecuencia intraordenación de dos (#1 y #11) de los tres polimorfismos compartidos por las tres ordenaciones cromosómicas.

Poblaciones	Ordenaciones	#	I	P
BCN	$O_{st} / O_{3+4} / O_{3+4+8}$	#1	10020	$0.0103 \pm 0.0010 *$
TA	$O_{st} / O_{3+4} / O_{3+4+8}$	#11	10020	$0.0014 \pm 0.0004 **$
BCN + TA	$O_{st} / O_{3+4} / O_{3+4+8}$	#1	10020	$0.0000 \pm 0.0000 ***$
BCN + TA	$O_{st} / O_{3+4} / O_{3+4+8}$	#11	11710	$0.0020 \pm 0.0004 **$
BCN + TA	$O_{st} / O_{3+4} / O_{3+4+8}$	#17	10150	1.0000 ± 0.0000

Tabla 15. Comparación de la frecuencia de aquellos polimorfismos por sustitución nucleotídica compartidos por las tres ordenaciones cromosómicas, mediante simulaciones de Monte Carlo para tablas de contingencia 2 x 3. # número de la posición polimórfica comparada. I, número de iteraciones. P, probabilidad. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. Significación estadística: * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

Al analizar la frecuencia del polimorfismo #1 se observa que es significativamente diferente -mayor- (tabla 16) dentro de la ordenación O_{3+4+8} que dentro de O_{st} y O_{3+4} . Mientras que entre O_{st} y O_{3+4} la frecuencia de este polimorfismo no difiere significativamente (ni en Barcelona, ni en Ter Apel ni en ambas poblaciones agrupadas), existen diferencias altamente significativas entre O_{st} y O_{3+4+8} y entre O_{3+4} y O_{3+4+8} (en Barcelona, en Ter Apel y en ambas poblaciones agrupadas). La frecuencia del polimorfismo #11 también resultó mayor dentro de la ordenación O_{3+4+8} , aunque con una mayor probabilidad asociada al test.

Se compararon las frecuencias de los polimorfismos por sustitución nucleotídica entre distintas ordenaciones cromosómicas (en una misma población), con objeto de estudiar las posibles asociaciones entre polimorfismos y ordenaciones (tabla 16). Para esta comparación se utilizó el test exacto de Fisher con dos colas.

BARCELONA	O_{st} / O_{3+4}	Comparaciones: 12	Significativas: 0
BARCELONA	O_{st} / O_{3+4+8}	Comparaciones: 4 $\frac{\#}{\#1}$	Significativas: 1 $\frac{P}{0.0078} **$
BARCELONA	O_{3+4} / O_{3+4+8}	Comparaciones: 12 $\frac{\#}{\#1}$	Significativas: 1 $\frac{P}{0.0125} *$
TER APEL	O_{st} / O_{3+4}	Comparaciones: 11 $\frac{\#}{\#21}$	Significativas: 1 $\frac{P}{0.0146} *$
TER APEL	O_{st} / O_{3+4+8}	Comparaciones: 8 $\frac{\#}{\#1}$ $\frac{\#}{\#11}$	Significativas: 2 $\frac{P}{0.0001} ***$ $\frac{P}{0.0022} **$
TER APEL	O_{3+4} / O_{3+4+8}	Comparaciones: 6 $\frac{\#}{\#1}$	Significativas: 1 $\frac{P}{0.0180} *$
BCN + TA	O_{st} / O_{3+4}	Comparaciones: 14 $\frac{\#}{\#12}$ $\frac{\#}{\#21}$ $\frac{\#}{\#27}$	Significativas: 3 $\frac{P}{0.0233} *$ $\frac{P}{0.0106} *$ $\frac{P}{0.0309} *$
BCN + TA	O_{st} / O_{3+4+8}	Comparaciones: 8 $\frac{\#}{\#1}$ $\frac{\#}{\#11}$	Significativas: 2 $\frac{P}{0.0000} ***$ $\frac{P}{0.0007} ***$
BCN + TA	O_{3+4} / O_{3+4+8}	Comparaciones: 12 $\frac{\#}{\#1}$	Significativas: 1 $\frac{P}{0.0001} ***$

(Tabla 16, continúa)

SANTIAGO	O_{st} / O_{3+4}	Comparaciones: 5	Significativas: 5	<u>#</u>	<u>P</u>
				#1	0.0083 **
				#11	0.0083 **
				#12	0.0032 **
				#16	0.0000 ***
				#21	0.0032 **
SANTIAGO	O_{st} / O_{3+4+8}	Comparaciones: 3	Significativas: 3	<u>#</u>	<u>P</u>
				#1	0.0000 ***
				#11	0.0000 ***
				#16	0.0267 *
SANTIAGO	O_{3+4} / O_{3+4+8}	Comparaciones: 4	Significativas: 2	<u>#</u>	<u>P</u>
				#1	0.0014 **
				#11	0.0014 **

Tabla 16. Comparación entre distintas ordenaciones cromosómicas de la frecuencia de los polimorfismos que segregan en cada ordenación en la misma población, mediante el test exacto de Fisher con dos colas. Aún cuando se especifica el número de comparaciones efectuadas, sólo se indica el resultado de aquellas que han resultado significativas. # Número de la posición polimórfica. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. P, probabilidad. Significación estadística: * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

En todas las poblaciones se detectaron asociaciones de algunos polimorfismos con ordenaciones cromosómicas (existencia de polimorfismos cuyas frecuencias diferían significativamente en distintas ordenaciones cromosómicas). Esta diferenciación génica entre distintas ordenaciones cromosómicas se observó tanto al considerar las poblaciones de Barcelona y Ter Apel individualmente como en un "pool". En la población de Santiago, las diferencias en la frecuencia de los polimorfismos por sustitución nucleotídica entre las distintas ordenaciones cromosómicas fueron altamente significativas.

3.3.1.2 Distribución por zonas funcionales

En la tabla 10 se ha indicado la distribución por zonas funcionales de las dianas de restricción analizadas en las poblaciones de Barcelona, Ter Apel, Tenerife y Santiago. En la región 5' se ha incluido toda la región flanqueante 5' a la zona codificadora del gen *rp49*. En la región 3' se ha incluido la región flanqueante 3' al gen *rp49*, sin incluir la región que afecta al gen *serendipity*.

En la región 5' del gen *rp49* se han identificado 13 posiciones polimórficas por sustitución nucleotídica (#1, #2, #4, #6, #7, #9, #11, #12, #13, #14, #15, #16, #17). Nueve de los polimorfismos segregan en Barcelona, 6 en Ter Apel, 6 en Tenerife y 4 en Santiago. En la zona codificadora se han observado 3 posiciones polimórficas (#19 en el exón 1; #21 y #22 en el exón 2). Las posiciones #19 y #22 sólo se encontraron en Tenerife y Ter Apel respectivamente, mientras que la #21 se identificó en todas las poblaciones excepto la de Tenerife. En la región 3' del locus *rp49* se identificaron 2 polimorfismos (#24 y #25). El #24 se identificó en todas las poblaciones excepto en la de Santiago y el #25 únicamente en la de Ter Apel. En el locus *serendipity* de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel, se identificó una posición polimórfica (#27).

Se ha comparado el número de dianas monomórficas y polimórficas entre las regiones 5' y codificadora, mediante el test exacto de Fisher con dos colas, con objeto de analizar la distribución por regiones funcionales de los polimorfismos detectados (tabla 17). No se realizó la comparación con la región 3' ya que al ser esta región demasiado pequeña -la zona codificadora

del locus *serendipity* se sitúa a tan sólo 213 pb del codón de terminación del locus *rp49*- se analizaron pocas dianas de restricción. De las 5 comparaciones realizadas, una para cada una de las 4 poblaciones y otra para el "pool" de Barcelona y Ter Apel, sólo resultó significativa la efectuada en la población de Barcelona, aunque en todos los casos la frecuencia relativa de los polimorfismos en la región 5' fué mayor.

Poblaciones	Comparación	P
BCN	5' / Codificadora	0.0245 *
TA	5' / Codificadora	0.4193
BCN + TA	5' / Codificadora	0.0769
TEN	5' / Codificadora	0.1987
SAN	5' / Codificadora	0.3650

Tabla 17. Comparación del número de dianas polimórficas-monomórficas entre distintas regiones funcionales mediante el test exacto de Fisher con dos colas. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. TEN, Tenerife. SAN, Santiago. P, probabilidad. Significación estadística: * $P < 0.05$.

3.3.2 POLIMORFISMOS POR INSERCIÓN-DELECIÓN

Se identificaron 8 polimorfismos por inserción-delección en el conjunto de las 4 poblaciones que se analizaron (tabla 18). El tamaño de las inserciones-delecciones osciló entre 1 y 12 pares de bases. En 5 de los polimorfismos por inserción-delección (#3, #8, #10, #20 y #26) se identificaron más de 2 tamaños distintos en el mismo polimorfismo: 3 tamaños en el #8 y #10; 5 en el #20 y #26 y 7 en el #3. Estos distintos tamaños pueden corresponder tanto a diferentes inserciones o delecciones producidas en el

fragmento en el cual se acotó el polimorfismo como a combinaciones de dos o más inserciones-delecciones. Por lo tanto, varios de los distintos tamaños de los polimorfismos por inserción-delección, podrían en realidad corresponder a polimorfismos diferentes.

De los 8 polimorfismos 5 fueron detectados en la región 5' (#3, #5, #8, #10, #18), 1 en el intrón (#20) y 2 en la región 3' (#23 y #26). Dos de los 5 localizados en la región 5' (#3 y #10) se observaron en las 4 poblaciones. El polimorfismo #5 fué detectado únicamente en la población de Barcelona y el #18 sólo en la de Ter Apel; cada uno de estos polimorfismos fueron observados en sólo una línea. El polimorfismo #8 se detectó tanto en la población de Ter Apel como en la de Santiago. En el intrón de la unidad transcripcional del locus *rp49* se localizó un polimorfismo (#20) detectado en las cuatro poblaciones analizadas. De los 2 polimorfismos identificados en la región flanqueante 3', el #23 se detectó en una sólo línea de la población de Barcelona y el #26 en todas las poblaciones excepto la de Santiago.

#	T	Barcelona n=49		Ter Apel n=54		Tenerife n=54		Santiago n=54	
		a	b	a	b	a	b	a	b
#3	+2	Ins 6 pb		1	0.02				
	+1	Ins 3 pb		2	0.04	3	0.06	2	0.04
	-			6	0.12	15	0.28	1	0.02
	-1	Del 3 pb		30	0.61	23	0.43	17	0.31
	-2	Del 6 pb		5	0.10	4	0.07		1
	-3	Del 9 pb		6	0.12	7	0.13	33	0.61
	-4	Del 12 pb				1	0.02	1	0.02
#5	+	Del 4 pb		1	0.02				
#8	+1	Ins 1 pb				1	0.02		9
	-1	Del 1 pb				5	0.09		9
#10	+1	Ins 1 pb					6	0.11	
	-1	Del 1 pb		9	0.18	4	0.07	2	0.04
#18	+	Del 5 pb				*			
#20	+3	Ins 12 pb				2	0.04		9
	+2	Ins 5 pb		29	0.59	29	0.54	44	0.81
	+1	Ins 4 pb		6	0.12	3	0.06		9
	-			12	0.24	19	0.35	6	0.11
	-1	Del 1 pb		2	0.04	1	0.02	4	0.07
#23	+	Del 1 pb		1	0.02				
#26	-			39	0.80	46	0.85	50	0.93
	1	Del 1 pb		1	0.02	1	0.02	1	0.02
	2	Del 2 pb		3	0.06	3	0.06		
	3	Del 3 pb		1	0.02	1	0.02		
	4	Del 5 pb		5	0.10	3	0.06	3	0.06

Tabla 18. Frecuencias absolutas (a) y relativas (b) de los polimorfismos por inserción-delección. La localización nucleotídica exacta se indica en la tabla 4. #, número del polimorfismo. T, numeración de los distintos tamaños. El tamaño (aproximado) se indica en pares de bases. * Polimorfismo detectado únicamente en una de las 4 líneas que se añadieron de la ordenación O₃₊₄. Ins, Inserción. Del, Delección. Las diferencias de tamaño -de forma aproximada- respecto a la secuencia publicada (Aguadé 1988a) se indican en pares de bases (pb).

En la tabla 19 se indica la distribución de las frecuencias de los polimorfismos por inserción-delección entre las tres ordenaciones cromosómicas. Aunque se observa que existe cierta heterogeneidad en la distribución de las frecuencias de las inserciones-delecciones entre poblaciones o entre ordenaciones cromosómicas no se realizó ningún test para comprobar la significación estadística por dos motivos:

- a) Cada uno de los tres polimorfismos en los que se han detectado sólo dos tamaños (polimorfismos más informativos) se identificaron en un único individuo.

- b) En el resto de polimorfismos pueden existir combinaciones de dos o más inserciones-delecciones diferentes que formen un mismo tamaño y por tanto que se hayan identificado como una única variante.

Pob	Ord	n	#	3	5	8	10	18	20	23	26
				64-163	164-352	353-380	381-498	717-859	939-1032	1375-1418	1419-1563
				+2 +1 - -1 -2 -3 -4	+ + +1 -1	+1 -1	+3 +2 +1 - -1	+ + +	+ + +	+ + +	- 1 2 3 4
BCN	O _{st}	10		3 3 3 1					6 4		9 1
	O ₃₊₄	31		2 3 2 1 2 3	1	8	20 5 5 1	1	22 1 3	5	
	O ₃₊₄₊₈	8		6 2		1	3 1 3 1			8	
TA	O _{st}	37		1 3 1 2 1 4 4 3		5	2 1 8 1 7		36 1		4
	O ₃₊₄	13		4 6 3	1	2 1	7 4 2		4 2 3		8
	O ₃₊₄₊₈	8		5 2 1			6 2				
TEN	O ₃₊₄	54		2 1 1 7 3 3 1		6 2	4 4 6 4		50 1		3
SAN	O _{st}	18		9 9		9	9		9		
	O ₃₊₄	29		11 1 7 1		9	11 9 9		6 1		
	O ₃₊₄₊₈	7		7							

Tabla 19. Frecuencia absoluta de los polimorfismos por inserción-delección. #, número de posición polimórfica. Para cada polimorfismo se indica su posición en el mapa. Pob, población. Ord, grupo cromosómico. n, tamaño muestral. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. TEN, Tenerife. SAN, Santiago.

3.4 VARIABILIDAD HAPLOTIPICA

3.4.1 HAPLOTIPOS POR SUBSTITUCION NUCLEOTIDICA

En las 215 líneas analizadas en las cuatro poblaciones se identificaron 34 haplotipos al considerar únicamente los polimorfismos por sustitución nucleotídica (tabla 20): 17 haplotipos en la población de Barcelona, 15 en Ter Apel, 12 en Tenerife y 4 en Santiago (tablas 21, 22, 23 y 24). La numeración de los haplotipos identificados al considerar únicamente los polimorfismos por sustitución nucleotídica se indicará precediendo el símbolo § al número de haplotipo.

Los tres haplotipos más frecuentes (§1, §2 y §3) también fueron los compartidos por más poblaciones. Sólo se detectó un haplotipo compartido por todas las poblaciones (§1), siendo en todas ellas el más frecuente. Hubo 2 haplotipos compartidos por tres poblaciones (§2 y §3). El haplotipo §2, segundo haplotipo más frecuente en Barcelona y Ter Apel, figura compartido por las poblaciones de Barcelona, Ter Apel y Tenerife. El §3 fué compartido por las poblaciones de Barcelona, Ter Apel y Santiago (tercer haplotipo más frecuente en Barcelona y Ter Apel, y segundo en Santiago). En total, la población de Barcelona comparte 8 haplotipos con la de Ter Apel, 3 con la de Tenerife y 2 con la de Santiago. La población de Ter Apel comparte 3 haplotipos con la de Tenerife y 2 con la de Santiago. Por último, las poblaciones de Tenerife y Santiago comparten sólo un haplotipo.

§	# 1 2 4 6 7 9 11 12 13 14 15 16 17 19 21 22 24 25 27	Barcelona			Ter Apel			Tenerife	Santiago		
		A	B	C	A	B	C	B	A	B	C
1	- + - - - + - - + + + + + + + + - -	6	11	1	19	3**		35	9	9	
2	+ + - - - + - - + + + + + + + + - -	2	4	5	7	4* 3		2			
3	+ + - - - + + - + + + + + + + + - -		2	2	1	1 4				9	7
4	- + - - - + - - - + + + + + + + + - -		1		1						
5	- + - - - + - - + + + + + + + + - +	1			4						
6	- + - - - + - - + + + + - + + + + +	1			1						
7	+ + - - - + - - + + + + + + + + - +				1						
8	- + - - - + - - + + + + + + + - - -				1			1			
9	- + - - - + - - + + + + + + + + -				1						
10	- + - - - + - - + + + + + + + - + - -				1						
11	+ + - - - + - - + + + + - + + + + - -						1				
12	- + - - - + - - + + + + + + - + + - -		1			2*					
13	- + - - - + - - + + - + + + + + - -		1			1					
14	- + - - - + - - + + + + - + + + + - -		2								
15	- + - - - + - + + - + + + + + + - -		2								
16	+ + - - - + - + + + + + + + - + + - +		1								
17	+ + - - - + - - + + + + + + + + - - -		1								
18	- + - - - + - - + - + + + + + + + - -		1					3			
19	+ + - - - + - - + + - + + + + + - -		1								
20	+ + - - - + + - + + + + + + - + + - -		1								
21	- + - - - + - + + + + + + + + + - -		1								
22	- - + - - + + - + + + + + + + + + - -		1								
23	+ + - - - + - + + + + + + + - + + - -					1					
24	- + - - - + + - + + + + + + + + + - -					1					
25	- + - - - + - - + + + + + - + + + - -							4			
26	- + - - - - - + + + + + + + + + - -							2			
27	- - - - - + - - + - + + + + + + + - -							2			
28	- + - - + + - + - + + + + + + + - -							1			
29	- - - - - + - - + + + + + + + + - -							1			
30	- - - - - - - + - + + + + + + + - -							1			
31	- - - - - - - + + + + + + + + - -							1			
32	- + - + + - - + + + + + + + + - -							1			
33	- + - - - + - - + + + - + + + + - -								9		
34	- + - - - + - + + + + + + + - + + - -									11	

Tabla 20. Haplotipos identificados al considerar únicamente las sustituciones nucleotídicas y su distribución por ordenaciones cromosómicas y por poblaciones. #, Número de la posición polimórfica. §, Número del haplotipo. A, O_{31} ; B, O_{3+4} ; C, O_{3+4+8} . * Haplotipos correspondientes a las 4 líneas que se añadieron de la ordenación cromosómica O_{3+4} en la población de Ter Apel.

§	#	1	2	4	11	12	13	14	15	17	21	24	27	O _{st} n=10	O ₃₊₄ n=31	O ₃₊₄₊₈ n=8	Total n=49
1		-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	6	11	1	18
2		+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	2	4	5	11
3		+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-		2	2	4
4		-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-		1		1
5		-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1			1
6		-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1			1
12		-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+		1		1
13		-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-		1		1
14		-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-		2		2
15		-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-		2		2
16		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+		1		1
17		+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-		1		1
18		-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-		1		1
19		+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-		1		1
20		+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+		1		1
21		-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-		1		1
22		-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-		1		1

Tabla 21. Haplotipos de la población de Barcelona, al considerar únicamente las sustituciones nucleotídicas y su distribución por ordenaciones cromosómicas. #, Número de la posición polimórfica. §, Número del haplotipo.

§	#	1	11	12	13	15	17	21	22	24	25	27	O _{st} n=37	O ₃₊₄ n=13	O ₃₊₄₊₈ n=8	Total n=54
1		-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	19	3**		20
2		+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	7	4*	3	13
3		+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	1	1	4	6
4		-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	1			1
5		-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	4			4
6		-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	1			1
7		+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	1			1
8		-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	1			1
9		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	1			1
10		-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	1			1
11		+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-			1	1
12		-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-		2*		1
13		-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-		1		1
23		+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-		1		1
24		-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-		1		1

Tabla 22. Haplotipos de la población de Ter Apel al considerar únicamente las sustituciones nucleotídicas y su distribución por ordenaciones cromosómicas. * Haplotipos correspondientes a las 4 líneas que se añadieron de la ordenación O₃₊₄; dichos haplotipos no se consideran en el total poblacional. #, Número de la posición polimórfica. §, Número del haplotipo.

§	#	1	2	6	7	9	14	19	24	O ₃₊₄ n=54
1		-	+	-	-	+	+	+	+	35
2		+	+	-	-	+	+	+	+	2
8		-	+	-	-	+	+	+	-	1
18		-	+	-	-	+	-	+	+	3
25		-	+	-	-	+	+	-	+	4
26		-	+	-	-	-	+	+	+	2
27		-	-	-	-	+	-	+	+	2
28		-	+	-	+	+	-	+	+	1
29		-	-	-	-	+	+	+	+	1
30		-	-	-	-	-	-	+	+	1
31		-	-	-	-	-	+	+	+	1
32		-	+	+	-	+	+	+	+	1

Tabla 23. Haplotipos de la población de Tenerife al considerar únicamente las sustituciones nucleotídicas. #, Número de la posición polimórfica. §, Número del haplotipo.

§	#	1	11	12	16	21	O _{st} n=18	O ₃₊₄ n=29	O ₃₊₄₊₈ n=7	Total n=54
1		-	-	-	+	+	9	9		18
3		+	+	-	+	+		9	7	16
33		-	-	-	-	+	9			9
34		-	-	+	+	-		11		11

Tabla 24. Haplotipos de la población de Santiago al considerar únicamente las sustituciones nucleotídicas y su distribución por ordenaciones cromosómicas. #, Número de la posición polimórfica. §, Número del haplotipo.

Se observaron varios haplotipos específicos en todas las poblaciones: 8 en Barcelona, 6 en Ter Apel, 8 en Tenerife y 2 en Santiago. A excepción de la población de Santiago (con dos haplotipos específicos §33 y §34 identificados en 9 y 11 líneas respectivamente) los haplotipos específicos de cada población segregan a baja frecuencia.

Para comparar la distribución de las frecuencias de los haplotipos entre distintas poblaciones se realizaron simulaciones de Monte Carlo para tablas de contingencia 2 x n (Lewontin & Felsenstein 1965), -tabla 25-. No se detectó heterogeneidad entre las poblaciones continentales europeas (Barcelona y Ter Apel) lo que permitió agruparlas. Al comparar el "pool" de estas poblaciones con la de Tenerife y con la de Santiago, así como entre estas dos últimas entre sí, se detectó una heterogeneidad significativa. La comparación de las frecuencias de los polimorfismos por sustitución nucleotídica, había ya revelado el mismo patrón de homogeneidad/heterogeneidad.

Poblaciones	Comparación	T	I	P
BCN / TA	Total / Total	24 x 2	10010	0.8012 ± 0.0040
BCN + TA / TEN	Total / Total	32 x 2	12680	0.0000 ± 0.0000 ***
BCN + TA / SAN	Total / Total	26 x 2	10050	0.0000 ± 0.0000 ***
TEN / SAN	Total / Total	15 x 2	10030	0.0000 ± 0.0000 ***

Tabla 25. Comparación de la distribución de las frecuencias de los haplotipos por sustitución nucleotídica entre poblaciones, mediante simulaciones de Monte Carlo para tablas de contingencia 2 x n. T, tamaño de la tabla. I, número de iteraciones. P, probabilidad. Significación estadística: * P < 0.05. ** P < 0.01. *** P < 0.001.

3.4.1.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas

En la población de Barcelona se identificaron 4 haplotipos en la ordenación cromosómica O_{st} , 15 en la O_{3+4} y 3 en la O_{3+4+8} . En la población de Ter Apel se identificaron 10 haplotipos en la ordenación O_{st} , 7 en la O_{3+4} y 3 en la O_{3+4+8} . En la población de Santiago se detectaron 2 haplotipos en la ordenación O_{st} , 3 en la O_{3+4} y uno en la O_{3+4+8} . (tabla 26).

Poblaciones	O_{st}	O_{3+4}	O_{3+4+8}	Total
Barcelona	4	15	3	17
Ter Apel	10	7	3	15
Barcelona + Ter Apel	10	17	4	24
Tenerife		12		12
Santiago	2	3	1	4
Total	11	27	4	34

Tabla 26. Distribución del número de haplotipos por sustitución nucleotídica entre ordenaciones cromosómicas.

Para comprobar si existe o no homogeneidad en la distribución haplotípica entre diferentes poblaciones para cada una de las 3 ordenaciones cromosómicas, se realizaron simulaciones de Monte Carlo para tablas de contingencia $2 \times n$ (Lewontin & Felsenstein 1965), -tabla 27-. Ninguno de los tres tests realizados para comprobar la existencia de diferencias en la distribución haplotípica dentro de la misma ordenación cromosómica entre las poblaciones de Barcelona y Ter Apel resultó significativo (probabilidad mínima

del 44%). La no existencia de heterogeneidad permitió agrupar los haplotipos de ambas poblaciones, dentro de cada ordenación cromosómica.

Cuando se comparó la distribución haplotípica de la población de Tenerife con la del "pool" de Barcelona y Ter Apel, para la ordenación cromosómica O_{3+4} , se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$). También resultaron altamente significativos los tres tests realizados (uno para cada ordenación cromosómica) para comprobar si existía heterogeneidad en la distribución haplotípica de la población de Santiago con la del "pool" de Barcelona y Ter Apel ($P < 0.0001$ para O_{st} ; $P < 0.0001$ para O_{3+4} ; $P = 0.03$ para O_{3+4+8}).

Poblaciones	Ordenación	T	I	P
BCN / TA	O_{st}	2 x 10	10020	1.0000 ± 0.0000
BCN / TA	O_{3+4}	2 x 17	10170	0.6952 ± 0.0046
BCN / TA	O_{3+4+8}	2 x 4	10150	0.4420 ± 0.0049
BCN + TA / TEN	O_{3+4}	2 x 26	10010	0.0000 ± 0.0000 ***
BCN + TA / SAN	O_{st}	2 x 11	10010	0.0000 ± 0.0000 ***
BCN + TA / SAN	O_{3+4}	2 x 18	10010	0.0000 ± 0.0000 ***
BCN + TA / SAN	O_{3+4+8}	2 x 4	10020	0.0306 ± 0.0017 *

Tabla 27. Comparación de la distribución de haplotipos por sustitución nucleotídica entre distintas poblaciones mediante simulaciones de Monte Carlo para tablas de contingencia 2 x n. T, tamaño de la tabla. I, número de iteraciones. P, probabilidad. Significación estadística: * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. TEN, Tenerife. SAN, Santiago.

3.4.2 HAPLOTIPOS POR INSERCIÓN-DELECIÓN

Se detectó un total de 55 haplotipos en las cuatro poblaciones (tabla 28): 23 en la población de Barcelona, 28 en Ter Apel, 17 en Tenerife y 7 en Santiago (tablas 29, 30, 31 y 32). La numeración de los haplotipos identificados al considerar únicamente los polimorfismos por inserción-delección se indicará precediendo el símbolo §§ al número de haplotipo.

Se detectaron 2 haplotipos compartidos por todas las poblaciones (§§1 y §§2) -correspondiendo a los haplotipos más frecuentes en Barcelona y Ter Apel-. Además, hubo 3 haplotipos compartidos por las poblaciones de Barcelona, Ter Apel y Tenerife; y 2 haplotipos compartidos por Barcelona, Ter Apel y Santiago. En total la población de Barcelona comparte 10 haplotipos con la de Ter Apel, 6 con la de Tenerife y 4 con la de Santiago. La población de Ter Apel comparte 6 haplotipos con la de Tenerife y 5 con la de Santiago. Por último, la población de Tenerife comparte 2 haplotipos con la de Santiago. Igual que los resultados obtenidos con los haplotipos identificados al considerar sólo las sustituciones nucleotídicas, los haplotipos por inserciones-delecciones más frecuentes tienden a estar compartidos entre poblaciones (con excepción de la población de Santiago).

§§	#	3	5	8	10	18	20	23	26	Barcelona			Ter Apel			Tenerife	Santiago		
										A	B	C	A	B	C	B	A	B	C
1	-1	-	-	-	-	-	+2	-	-	1	5	1	5	3	9			6	
2	-1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	3	6	2	3		8	1	
3	-2	-	-	-	-	-	-	-	-	1			2				1		
4	-	-	-	-	-	-	+2	-	-	3	2		2				11		
5	-2	-	-	-	-	-	+2	-	-	2	1		1						
6	-3	-	-	-	-	-	-	-	3	1									
7	-3	-	-	-	-	-	+2	-	-		1	2	2	1	2	25			
8	-1	-	-	-	-1	-	+1	-	-	1	1	1		1*					
9	-1	-	-	-	-	-	-1	-	-		1					1			
10	+1	-	-	-	-	-	+2	-	-	2			1						
11	-1	-	-	-	-1	-	+2	-	2	1									
12	-3	-	-	-	-	-	-	-	-	2			1			1			
13	-1	-	-	-	-	-	+1	-	1	1									
14	-1	-	-	-	-1	-	+2	-	-	2			1						
15	-1	-	-	-	-	-	+1	-	-	2									
16	-1	-	-	-	-	-	+2	-	4	1			1		1				
17	-2	-	-	-	-	-	+2	-	2	1									
18	-1	-	-	-	-1	-	+2	-	4	2									
19	-	-	-	-	-1	-	-1	-	-	1									
20	-1	-	-	-	-	-	+1	-	2	1									
21	-1	+	-	-	-	-	+2	-	4	1									
22	-1	-	-	-	-	-	-	-	4	1									
23	-1	-	-	-	-1	-	+2	+	-	1									
24	-	-	-	-	-1	-	+2	-	-				1						
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-				4						
26	-	-	-	-1	-	-	+2	-	-				2						
27	+2	-	-	-	-	-	+2	-	-				1						
28	+1	-	-	-	-	-	-	-	-				2			1			
29	-	-	-	-	-	-	-	-	3				1						
30	-1	-	-	-	-	-	+3	-	-				1						
31	-	-	-	-	-	-	+3	-	-				1						
32	-	-	-	-1	-	-	-	-	-				1						
33	-1	-	-	-1	-1	-	+2	-	-				1						
34	-2	-	-	-1	-	-	+2	-	-				1						
35	-4	-	-	-	-	-	+2	-	-						1				
36	-	-	-	-	-	-	+2	-	4					3*					
37	-1	-	-	-	-	-	+2	-	2				1						
38	-3	-	-	-	-	-	-1	-	2				1						
39	-1	-	-	-	-1	-	+1	-	1				1						
40	-	-	-	-	-	-	+1	-	2				1						
41	-1	-	-	+1	-	-	+1	-	-				1					9	
42	-1	-	-	-	-	+	+2	-	-				1*						
43	-3	-	-	-	-	-	-1	-	1				1*						
44	-3	-	-	-	-1	-	-	-	-							1			
45	+1	-	-	-	-	-	-1	-	-							1			
46	-1	-	-	-	-	-	-1	-	4							1			
47	-	-	-	-	-	-	-1	-	-							1			
48	-3	-	-	-	-	-	+2	-	4							1			
49	-3	-	-	-	+1	-	+2	-	-							4			
50	-3	-	-	-	-1	-	+2	-	-							1			
51	-1	-	-	-	-	-	+2	-	1							1			
52	-4	-	-	-	+1	-	+2	-	-							1			
53	-1	-	-	-	+1	-	+2	-	-							1			
54	-1	-	-	-1	-	-	-	-	-									9	
55	-3	-	-	-	-1	-	+3	-	-									9	

Tabla 28. Haplotipos identificados al considerar las inserciones-delecciones. A, O_{31} . B, O_{3+4} . C, O_{3+4+8} . #, Número de la posición polimórfica. §§, Número del haplotipo. * Haplotipos correspondientes a las 4 líneas que se añadieron de la ordenación O_{3+4} ; dichos haplotipos no se consideran en el total poblacional.

§§	#3	5	10	20	23	26	O _{st} n=10	O ₃₊₄ n=31	O ₃₊₄₊₈ n=8	Total n=49
1	-1	-	-	+2	-	-	1	5	1	7
2	-1	-	-	-	-	-	2	2	3	7
3	-2	-	-	-	-	-	1			1
4	-	-	-	+2	-	-	3	2		5
5	-2	-	-	+2	-	-	2	1		3
6	-3	-	-	-	-	3	1			1
7	-3	-	-	+2	-	-		1	2	3
8	-1	-	-1	+1	-	-		1	1	2
9	-1	-	-	-1	-	-			1	1
10	+1	-	-	+2	-	-		2		2
11	-1	-	-1	+2	-	2		1		1
12	-3	-	-	-	-	-		2		2
13	-1	-	-	+1	-	1		1		1
14	-1	-	-1	+2	-	-		2		2
15	-1	-	-	+1	-	-		2		2
16	-1	-	-	+2	-	4		1		1
17	-2	-	-	+2	-	2		1		1
18	-1	-	-1	+2	-	4		2		2
19	-	-	-1	-1	-	-		1		1
20	-1	-	-	+1	-	2		1		1
21	-1	+	-	+2	-	4		1		1
22	-1	-	-	-	-	4		1		1
23	-1	-	-1	+2	+	-		1		1

Tabla 29. Haplotipos de la población de Barcelona al considerar únicamente las inserciones-delecciones, y su distribución por ordenaciones cromosómicas. #, Número de la posición polimórfica.

§§	#	3	8	10	18	20	26	O _{st} n=37	O ₃₊₄ n=13	O ₃₊₄₊₈ n=8	Total n=54
1		-1	-	-	-	+2	-	5		3	8
2		-1	-	-	-	-	-	6		2	8
3		-2	-	-	-	-	-	2			2
4		-	-	-	-	+2	-	2			2
5		-2	-	-	-	+2	-	1			1
7		-3	-	-	-	+2	-	2	1	2	5
8		-1	-	-1	-	+1	-		1*		
10		+1	-	-	-	+2	-	1			1
12		-3	-	-	-	-	-	1			1
14		-1	-	-1	-	+2	-	1			1
16		-1	-	-	-	+2	4		1		1
24		-	-	-1	-	+2	-	1			1
25		-	-	-	-	-	-	4			4
26		-	-1	-	-	+2	-	2			2
27		+2	-	-	-	+2	-	1			1
28		+1	-	-	-	-	-	2			2
29		-	-	-	-	-	3	1			1
30		-1	-	-	-	+3	-	1			1
31		-	-	-	-	+3	-	1			1
32		-	-1	-	-	-	-	1			1
33		-1	-1	-1	-	+2	-	1			1
34		-2	-1	-	-	+2	-	1			1
35		-4	-	-	-	+2	-			1	1
36		-	-	-	-	+2	4		3*		2
37		-1	-	-	-	+2	2		1		1
38		-3	-	-	-	-1	2		1		1
39		-1	-	-1	-	+1	1		1		1
40		-	-	-	-	+1	2		1		1
41		-1	+1	-	-	+1	-		1		1
42		-1	-	-	+	+2	-		1*		
43		-3	-	-	-	-1	1		1*		

Tabla 30. Haplotipos de la población de Ter Apel (Holanda) al considerar únicamente las inserciones-delecciones, y su distribución por ordenaciones cromosómicas. * Haplotipos correspondientes a las 4 líneas que se añadieron de la ordenación O₃₊₄; dichos haplotipos no se consideran en el total poblacional. #, Número de la posición polimórfica.

§§	#	3	10	20	26	O ₃₊₄ n=54
1	-1	-	+2	-		9
2	-1	-	-	-		3
7	-3	-	+2	-		25
9	-1	-	-1	-		1
12	-3	-	-	-		1
16	-1	-	+2	4		1
28	+1	-	-	-		1
44	-3	-1	-	-		1
45	+1	-	-1	-		1
46	-1	-	-1	4		1
47	-	-	-1	-		1
48	-3	-	+2	4		1
49	-3	+1	+2	-		4
50	-3	-1	+2	-		1
51	-1	-	+2	1		1
52	-4	+1	+2	-		1
53	-1	+1	+2	-		1

Tabla 31. Haplotipos de la población de Tenerife al considerar únicamente las inserciones-delecciones. #, Número de la posición polimórfica.

§§	#	3	8	10	20	O _{st} n=18	O ₃₊₄ n=29	O ₃₊₄₊₈ n=7	Total n=54
1	-1	-	-	-	+2			6	6
2	-1	-	-	-	-		8	1	9
3	-2	-	-	-	-		1		1
4	-	-	-	-	+2		11		11
41	-1	+1	-	-	+1		9		9
54	-1	-1	-	-	-	9			9
55	-3	-	-	-1	+3	9			9

Tabla 32. Haplotipos de la población de Santiago al considerar únicamente las inserciones-delecciones, y su distribución por ordenaciones cromosómicas. #, Número de la posición polimórfica.

3.4.2.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas

En la población de Barcelona se identificaron 6 haplotipos (al considerar únicamente las inserciones-delecciones) en la ordenación cromosómica O_{st} , 20 en la O_{3+4} y 5 en la O_{3+4+8} . En la población de Ter Apel se identificaron 20 haplotipos en la ordenación O_{st} , 11 en la O_{3+4} y 4 en la O_{3+4+8} . En la población de Santiago se detectaron 2 haplotipos en la ordenación O_{st} , 4 en la O_{3+4} y 2 en la O_{3+4+8} (tabla 33).

Poblaciones	O_{st}	O_{3+4}	O_{3+4+8}	Total
Barcelona	6	20	5	23
Ter Apel	20	11	4	28 (31)
Barcelona + Ter Apel	21	28	6	41 (43)
Tenerife		17		17
Santiago	2	4	2	7
Total	23	41	6	53 (55)

Tabla 33. Distribución del número de haplotipos por inserción-delección entre ordenaciones cromosómicas. Entre paréntesis número de haplotipos al considerar las 4 líneas de la ordenación cromosómica O_{3+4} que se añadieron a la población de Ter Apel.

3.4.3 HAPLOTIPOS POR SUBSTITUCION NUCLEOTIDICA E INSERCIÓN-DELECIÓN

Si tenemos en cuenta tanto los polimorfismos por inserción-delección como por sustitución nucleotídica el número total de haplotipos asciende a 96 (tabla 34): 36 en Barcelona, 43 en Ter Apel, 23 en Tenerife y 8 en Santiago (tablas 35, 36, 37 y 38). La numeración de los haplotipos identificados al considerar tanto las sustituciones nucleotídicas como las inserciones-delecciones se indicará precediendo el símbolo §§§ al número de haplotipo.

No se identificó ningún haplotipo compartido por todas las poblaciones. Se identificaron 2 haplotipos compartidos por las poblaciones de Barcelona, Ter Apel y Tenerife y otros 2 entre Barcelona, Ter Apel y Santiago. En total la población de Barcelona comparte 9 haplotipos con la de Ter Apel, 3 con la de Tenerife y 2 con la de Santiago. La población de Ter Apel comparte 3 haplotipos con la de Tenerife y 4 con la de Santiago. Sin embargo, la población de Tenerife no comparte ningún haplotipo con la de Santiago.

Es interesante destacar que mientras en la población de Barcelona el haplotipo con mayor frecuencia se observó en 4 líneas (considerando tanto inserciones-delecciones como sustituciones nucleotídicas) y en 3 líneas en Ter Apel, en Tenerife se detectó un haplotipo en 18 líneas y otro en 7. Asimismo, casi todos los haplotipos de la población de Santiago segregan a una alta frecuencia: un haplotipo observado en 11 líneas, 3 haplotipos en 9 líneas cada uno, un haplotipo en 8 y otro en 6.

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	Barcelona			Ter Apel			Tenerife			Santiago					
																												A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
																												A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	1															
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2														
3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2															
4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
20	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
21	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
22	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
28	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
29	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
31	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															
32	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1															

(Tabla 34, continúa)

§§§	#	1	2	3	4	5	10	11	12	13	14	15	17	20	21	23	24	26	27	O _{st} n=10	O ₃₊₄ n=31	O ₃₊₄₊₈ n=8	Total n=49
1		+	+	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	1			1
2		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	2	2		4
3		-	+	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	2			2
4		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	1	1		2
5		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	1			1
6		+	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	1		1	2
7		-	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	3	-	1			1
8		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	+	1			1
9		+	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-		1	2	3
10		+	+	-1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	1	2		3
11		+	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	2	1		3
12		+	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+1	+	-	+	-	-			1	1
13		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-1	+	-	+	-	-			1	1
14		+	+	-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+2	-	-	+	-	+	1			1
15		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+2	+	-	+	-	-	1			1
16		+	+	+1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	-	-	-	1			1
17		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	2	-	1			1
18		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	1			1
19		-	+	-3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	2			2
20		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+1	+	-	+	1	-	1			1
21		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	-	+1	+	-	+	-	-	1			1
22		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	-	-	1			1
23		-	+	-2	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+2	+	-	+	-	-	1			1
24		+	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+1	+	-	+	-	-	1			1
25		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	4	-	1			1
26		+	+	+1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+2	-	-	+	-	-	1			1
27		+	+	-2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	2	-	1			1
28		-	+	-1	-	-	-1	-	+	+	+	+	+	+2	+	-	+	4	-	1			1
29		-	+	-	-	-	-1	-	-	-	+	+	+	-1	+	-	+	-	-	1			1
30		-	+	-1	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+1	+	-	+	2	-	1			1
31		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	-	+2	+	-	+	-	-	1			1
32		-	-	-1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	4	-	1			1
33		+	+	-1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	4	-	1			1
34		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+2	-	+	+	-	-	1			1
35		-	+	-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+1	+	-	+	-	-	1			1
36		-	+	-1	-	-	-1	-	-	+	+	+	+	+2	+	-	+	4	-	1			1

Tabla 35. Haplotipos de la población de Barcelona al considerar tanto las sustituciones nucleotídicas como las inserciones-delecciones y su distribución por ordenaciones cromosómicas. #, Número de la posición polimórfica.

§§§	#1	3	8	10	11	12	13	15	17	18	20	21	22	24	25	26	27	O _{st} n=37	O ₃₊₄ n=13	O ₃₊₄₊₈ n=8	Total n=54
2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
3	-	-2	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
4	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
5	-	-1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	1			1
9	+	-3	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-		1		1
10	+	-1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	1	2		3
11	+	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	2	1		3
18	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	2			2
19	-	-3	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	1			1
37	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	+	2			2
38	-	-	-	-1	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
39	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	2			2
40	-	-2	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	2			2
41	-	+1	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
42	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	1			1
43	-	-	-1	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	2			2
44	-	+2	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
45	-	+1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	1			1
46	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
47	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	3	1			1
48	+	-3	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	+	1			1
49	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	1			1
50	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	+3	+	+	+	-	-	+	1			1
51	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+3	+	+	+	-	-	-	1			1
52	-	-3	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
53	-	+1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	1			1
54	-	-1	-	-1	-	-	+	+	-	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
55	-	-	-1	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	1			1
56	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1			1
57	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	1			1
58	-	-1	-1	-1	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
59	+	-2	-1	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-	1			1
60	+	-4	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-		1		1
61	+	-3	-	-	-	-	+	+	-	-	+2	+	+	+	-	-	-		1		1
62	+	-1	-	-	+	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	-	-		2		2
63	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	4	-		3*		2
64	-	-1	-	-	-	-	+	-	+	-	+2	+	+	+	-	2	-		1		1
65	+	-3	-	-	-	-	+	+	+	-	-1	+	+	+	-	2	-		1		1
66	-	-1	-	-1	-	-	+	+	+	-	+1	+	+	+	-	1	-		1		1
67	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+1	-	+	+	-	2	-		1		1
68	+	-3	-	-	-	+	+	+	+	-	+2	-	+	+	-	-	-		1		1
69	+	-1	-	-	+	-	+	+	+	-	+2	+	+	+	-	4	-		1		1
70	-	-1	+1	-	+	-	+	+	+	-	+1	+	+	+	-	-	-		1		1
71	-	-1	-	-1	-	-	+	+	+	-	+1	-	+	+	-	-	-		1*		
72	-	-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+2	+	+	+	-	-	-		1*		
73	-	-3	-	-	-	-	+	+	+	-	-1	+	+	+	-	1	-		1*		

Tabla 36. Haplotipos de la población de Ter Apel al considerar tanto las sustituciones nucleotídicas como las inserciones-delecciones y su distribución por ordenaciones cromosómicas. * Haplotipos correspondientes a las 4 líneas que se añadieron de la ordenación O₃₊₄; dichos haplotipos no se consideran en el total poblacional. #, Número de la posición polimórfica.

§§§	# 1	2	3	6	7	9	10	14	19	20	24	26	O ₃₊₄ n=54
4	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-	7
11	+	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	-	2
25	-	+	-1	-	-	+	-	+	+	+2	+	4	1
52	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	-	18
74	-	+	-3	-	-	+	-1	+	+	-	+	-	1
75	-	+	-3	-	-	-	-	+	+	+2	+	-	1
76	-	+	-1	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1
77	-	+	+1	-	-	+	-	+	+	-1	+	-	1
78	-	-	-1	-	-	+	-	+	+	-1	+	4	1
79	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-1	+	-	1
80	-	+	-3	-	-	+	-	+	-	+2	+	-	4
81	-	+	-3	-	-	+	-	-	+	+2	+	-	2
82	-	-	-3	-	-	-	-	-	+	-	+	-	1
83	-	+	-3	-	-	+	-	+	+	+2	+	4	1
84	-	+	-3	-	-	+	+1	+	+	+2	+	-	3
85	-	+	-1	-	-	-	-	+	+	-1	+	-	1
86	-	+	-3	-	-	+	-1	+	+	+2	+	-	1
87	-	-	-1	-	-	-	-	+	+	+2	+	1	1
88	-	+	-3	-	-	+	+1	+	+	+2	-	-	1
89	-	+	+1	-	-	+	-	-	+	-	+	-	1
90	-	+	-4	+	-	+	+1	+	+	+2	+	-	1
91	-	-	-1	-	-	+	-	-	+	-	+	-	2
92	-	+	-1	-	-	+	+1	+	+	+2	+	-	1

Tabla 37. Haplotipos de la población de Tenerife al considerar tanto las sustituciones nucleotídicas como las inserciones-delecciones. #, Número de la posición polimórfica.

§§§	# 1	3	8	10	11	12	16	20	21	O _{st} n=18	O ₃₊₄ n=29	O ₃₊₄₊₈ n=7	Total n=54
10	+	-1	-	-	+	-	+	-	+			1	1
18	-	-1	-	-	-	-	+	-	+		8		8
40	-	-2	-	-	-	-	+	-	+		1		1
62	+	-1	-	-	+	-	+	+2	+			6	6
93	-	-1	-1	-	-	-	-	-	+	9			9
94	-	-3	-	-1	-	-	+	+3	+	9			9
95	-	-	-	-	-	+	+	+2	-		11		11
96	+	-1	+1	-	+	-	+	+1	+		9		9

Tabla 38. Haplotipos de la población de Santiago al considerar tanto las sustituciones nucleotídicas como las inserciones-delecciones y su distribución por ordenaciones cromosómicas. #, Número de la posición polimórfica.

3.4.3.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas

En la población de Barcelona, al considerar tanto las inserciones-delecciones como las substituciones nucleotídicas, se detectaron 8 haplotipos en la ordenación cromosómica O_{st} , 28 en la O_{3+4} y 6 en la O_{3+4+8} . En la población de Ter Apel se identificaron 31 haplotipos en la ordenación O_{st} , 11 en la O_{3+4} y 6 en la O_{3+4+8} . En la población de Santiago se detectaron 2 haplotipos en la ordenación O_{st} , 4 en la O_{3+4} y 2 en la O_{3+4+8} (tabla 39).

Poblaciones	O_{st}	O_{3+4}	O_{3+4+8}	Total
Barcelona	8	28	6	36
Ter Apel	31	11	6	43 (46)
Barcelona + Ter Apel	35	39	9	70 (73)
Tenerife		23		23
Santiago	2	4	2	8
Total	37	62	9	93 (96)

Tabla 39. Distribución del número de haplotipos por substitución nucleotídica e inserción-delección entre ordenaciones cromosómicas. Entre paréntesis número de haplotipos al considerar las 4 líneas de la ordenación cromosómica O_{3+4} que se añadieron a la población de Ter Apel.

3.5 IDENTIFICACIÓN DE SUCESOS RECOMBINACIONALES

Algunos de los sucesos recombinacionales ocurridos en la historia de una región determinada pueden detectarse analizando las posiciones nucleotídicas polimórficas. La presencia de pares nucleotídicos discordantes (un par nucleotídico es discordante cuando existen las cuatro posibles combinaciones nucleotídicas ++, +-, -+ y --) evidencian la existencia de por lo menos un suceso recombinacional en el caso de no existir mutación recurrente (Hudson & Kaplan 1985). En la población de Barcelona se identificaron 11 pares nucleotídicos discordantes de los 28 posibles; 5 de 10 en Ter Apel; 3 de 10 en Tenerife y ninguno de las 10 comparaciones realizadas en Santiago. En el conjunto de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel se identificaron 13 pares nucleotídicos discordantes de los 45 posibles.

Sin embargo, el número de sucesos recombinacionales puede ser menor que el número de pares nucleotídicos discordantes (por ejemplo: un suceso recombinacional que ocurra entre 2 haplotipos que difieran en más de 2 posiciones polimórficas puede generar más de un par nucleotídico discordante). Una herramienta muy útil como ayuda en la identificación de los sucesos recombinacionales es la construcción de una red de haplotipos (C. Stephens, comunicación personal). A partir del conocimiento de las posiciones nucleotídicas que eran discordantes y bajo la suposición de que no existe mutación recurrente, se construyó una red, conectando en primer lugar los haplotipos que diferían por un sólo cambio (substitución nucleotídica). Posteriormente, se conectaron también aquellos haplotipos que diferían por dos o más substituciones nucleotídicas (indicado en la figura con un asterisco).

Se construyeron 2 redes de haplotipos (figuras 12 y 13). En la figura 12 se conectaron los haplotipos de cada ordenación cromosómica de las tres poblaciones que presentaron los tres grupos de ordenaciones (Barcelona, Ter Apel y Santiago), con objeto de: a) identificar posibles sucesos recombinacionales. b) Estudiar las conexiones de los haplotipos de la población de Santiago respecto a las poblaciones europeas continentales (Barcelona y Ter Apel).

En la figura 13 se conectaron los haplotipos de la ordenación cromosómica O_{3+4} de las 4 poblaciones estudiadas con el objetivo de identificar posibles sucesos recombinacionales y de estudiar las conexiones y diferenciación de los haplotipos de la población de Tenerife.

En los diagramas resultantes (figuras 12 y 13) se pueden observar figuras poligonales de 4 o más lados (con un haplotipo en cada vértice). Cada una de las figuras poligonales evidencia un suceso recombinacional. Cada una de las figuras de 4 lados muestran un par nucleotídico discordante y un suceso de recombinación. En cambio las figuras de más de 4 lados evidencian más de un par nucleotídico discordante pero un sólo suceso recombinacional. Por ejemplo en la figura 12 se observa un cuadrilátero cuyos vértices son los haplotipos §1, §18, §21 y §15. El haplotipo §1 (-+) difiere del §18 (--) por el polimorfismo #14 (posición 641) y del §21 (++) por el polimorfismo #12 (posición 537). Por su parte el haplotipo §18 (--) difiere del §15 (+-) por el polimorfismo #12 y cierra el cuadrilátero el haplotipo §15 (+-) que difiere del §21 (++) por el polimorfismo #14. En el caso de que uno de los polimorfismos (#12 o #14) no se halla originado dos veces independientemente (mutación recurrente o paralela) la figura patentiza la existencia de un suceso recombinacional entre las posiciones 537 y 641.

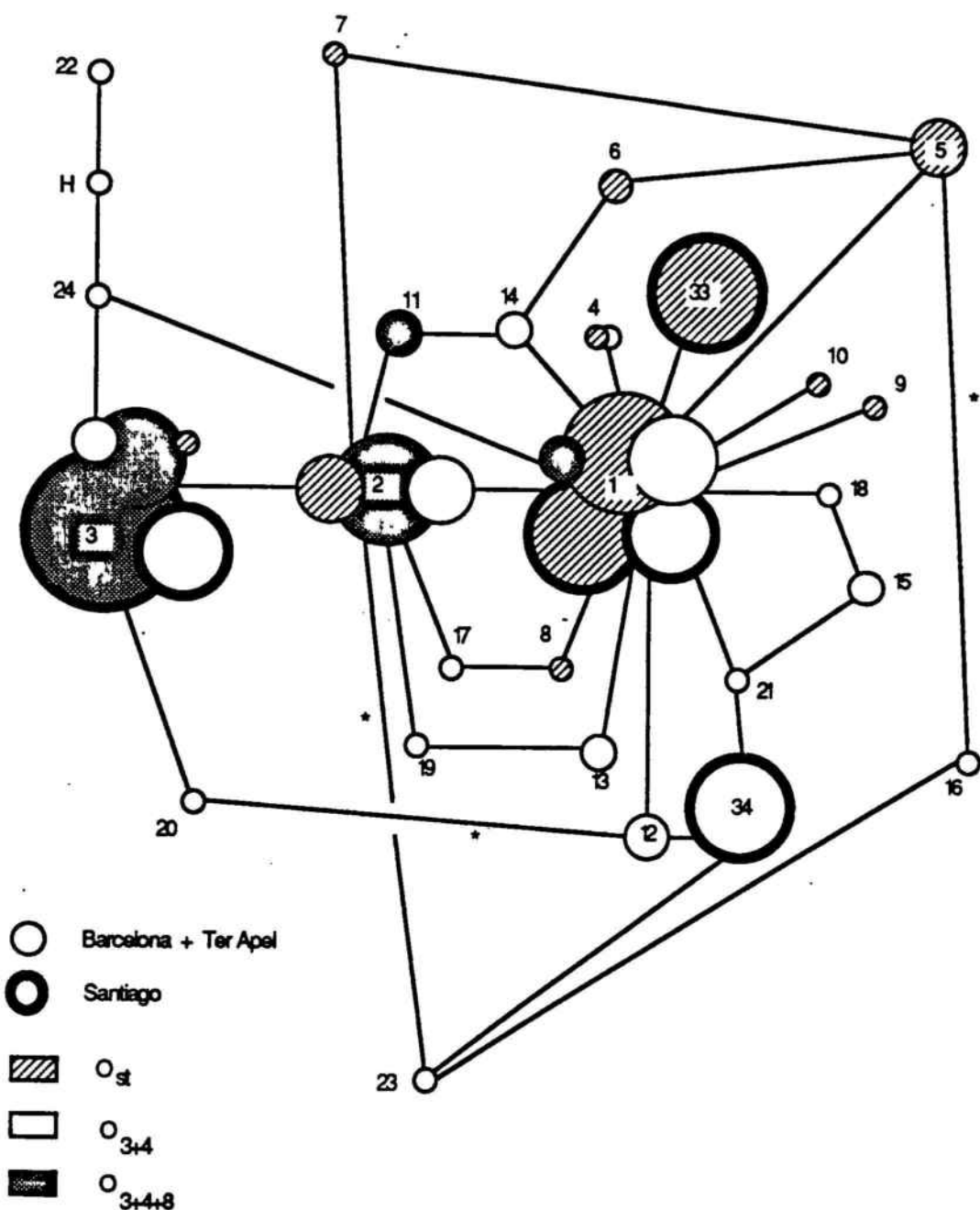


Figura 12. Red de haplotipos (considerando únicamente las sustituciones nucleotídicas) para el "pool" de Barcelona y Ter Apel y la población de Santiago, construido suponiendo que no existe mutación recurrente (ver texto). La superficie de cada círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo dentro de cada ordenación cromosómica. Dos haplotipos conectados difieren por una sólo sustitución nucleotídica excepto los marcados con un asterisco que difieren por 2 o más cambios. Los círculos superpuestos indican haplotipos compartidos por diferentes ordenaciones cromosómicas y/o diferentes poblaciones. Los números indican el número de haplotipo (§). La estructura y el número de cada haplotipo se muestran en la tabla 20. H, hipotético.

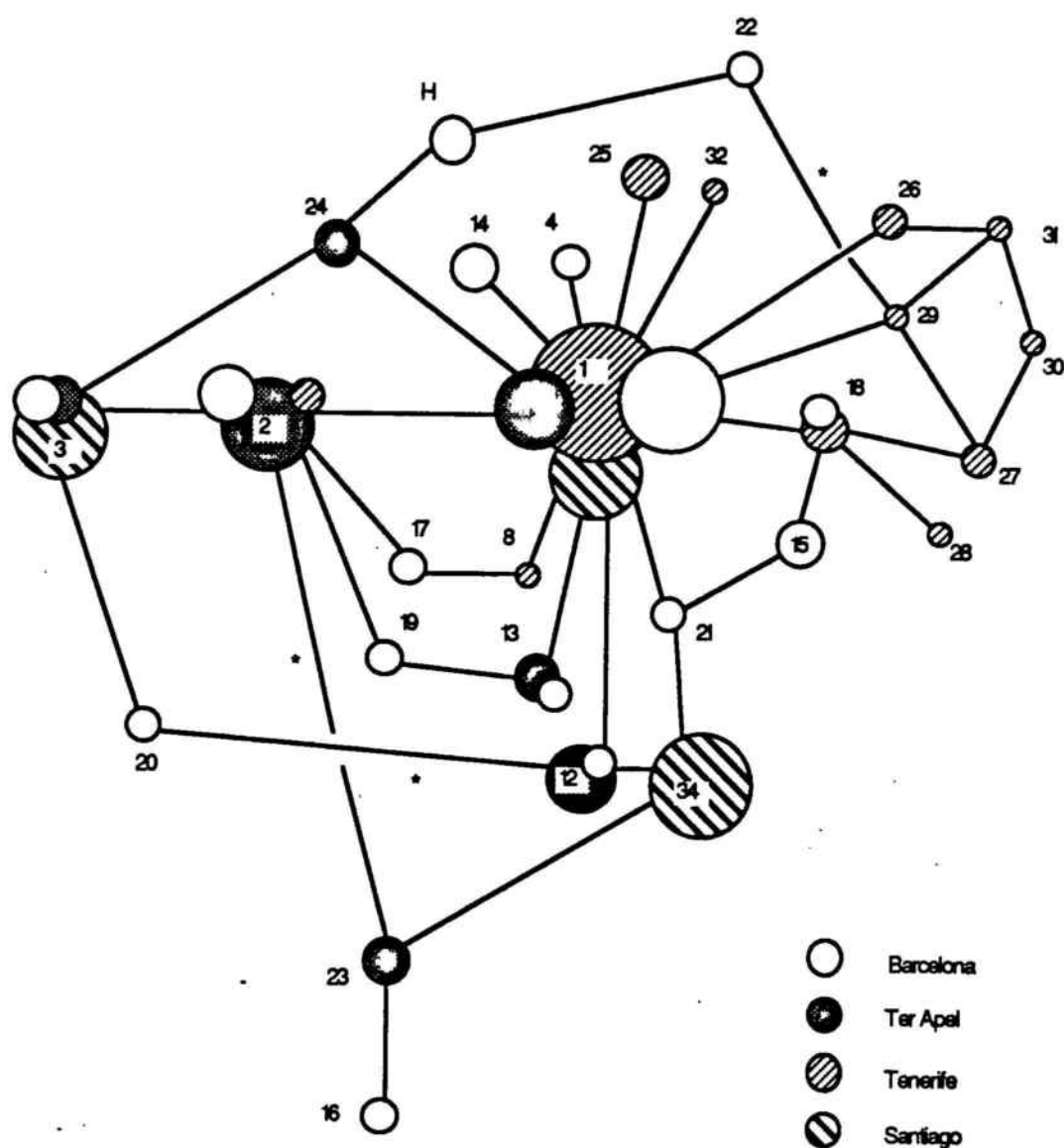


Figura 13. Red de haplotipos (considerando únicamente las sustituciones nucleotídicas) para la ordenación O_{3+4} de las poblaciones de Barcelona, Ter Apel, Tenerife y Santiago, construido suponiendo que no existe mutación recurrente (ver texto). La superficie de cada círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo dentro de la ordenación cromosómica. Dos haplotipos conectados difieren por una sola sustitución nucleotídica excepto los marcados con un asterisco que difieren por 2 cambios. Los círculos superpuestos indican haplotipos compartidos por diferentes poblaciones. Los números indican el número de haplotipo (§). La estructura y el número de cada haplotipo se muestran en la tabla 20. H, hipotético (población de Barcelona o Ter Apel).

Para interpretar la existencia del haplotipo §23, en las poblaciones de Barcelona y Ter Apel, son necesarios dos sucesos recombinacionales: uno entre los haplotipos §12 y §21 (figura 12) que originaría el haplotipo §34 (haplotipo que sin embargo no se detectó en dichas poblaciones, aunque sí fue identificado en la población de Santiago); y otro suceso recombinacional entre el haplotipo §34 y el §2 que originaría el haplotipo §23. También es necesaria la existencia de un haplotipo intermediario (no detectado) entre los haplotipos §24 y §22 ya que están conectados por 2 cambios nucleotídicos (#2 y #4); este haplotipo intermediario se ha denominado H o hipotético por no haberse encontrado en las poblaciones analizadas.

Tras el análisis de la figura 12, se identificaron 11 posibles sucesos recombinacionales en las poblaciones de Barcelona y Ter Apel: uno dentro de la ordenación cromosómica O_{st} , 6 dentro O_{3+4} , 3 sucesos entre las ordenaciones O_{st} y O_{3+4} , y uno entre O_{3+4} y O_{3+4+8} . Si el origen de las inversiones cromosómicas es único, sólo podría existir un haplotipo compartido entre cada 2 ordenaciones cromosómicas (el haplotipo que quedó inmerso en el segmento que sufrió la inversión). En cambio, se observa que entre las ordenaciones cromosómicas O_{st} y O_{3+4} existen 4 haplotipos compartidos (§1, §2, §3 y §4); por lo tanto, es necesaria la existencia de al menos 3 sucesos recombinacionales más para explicar estos haplotipos compartidos. Igualmente para explicar los tres haplotipos compartidos entre la ordenación cromosómica O_{3+4+8} con O_{3+4} y O_{st} (§1, §2 y §3) es necesario suponer la existencia de al menos otros dos sucesos recombinacionales.

El patrón de conexión de los haplotipos de la población de Santiago fue ostensiblemente diferente al presentado por las poblaciones de Barcelona y

Ter Apel. En la población de Santiago sólo se identificaron 4 haplotipos (§1, §3, §33 y §34). El haplotipo §33 se conecta con el §1 a través de un sólo polimorfismo -#16- (ordenación O_{st}). En cambio, para conectar el haplotipo §3 con el §1 es necesario suponer dos cambios (#1 y #11) y para la conexión del §1 con el §34 otros dos (#12 y #21) sin existir en esta población los 2 haplotipos intermediarios el (§2 ó §24) y el (§12 ó §21) respectivamente.

En la figura 13 se observa que los haplotipos de Tenerife tienden a estar agrupados entre ellos, aunque existen tres haplotipos compartidos entre Tenerife y las poblaciones de Barcelona y Ter Apel, §1, §2 y §18; sin embargo, los haplotipos §1 y §2 segregan a distinta frecuencia en las poblaciones de Barcelona y Ter Apel que en Tenerife. Se identificaron 3 sucesos recombinacionales entre los haplotipos de Tenerife y dos sucesos entre haplotipos de esta población y los de las poblaciones continentales europeas (entre los haplotipos §1, §2, §17 y §8; y entre §1, §24, §H, §22 y §29). Uno de estos dos últimos sucesos (evidenciado por los haplotipos §1, §2, §17 y §8) ya había sido identificado, ya que el haplotipo §8 también está presente en la población de Ter Apel (aunque en la ordenación cromosómica O_{st}).

3.6 ESTIMACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA

3.6.1 DIVERSIDAD HAPLOTIPICA

Se calculó el índice de diversidad haplotípica propuesto por Nei & Tajima (1981) separadamente para los haplotipos identificados al considerar los polimorfismos por sustitución nucleotídica, por inserción-delección y para haplotipos identificados al considerar ambos tipos de polimorfismo (tabla 40). Este índice refleja no únicamente el número de haplotipos sino también la frecuencia relativa de los mismos. La estimación de este índice es mayor cuando se consideraron los haplotipos por inserción-delección que por sustitución nucleotídica. Al comparar los índices de diversidad haplotípica de las poblaciones de Barcelona y de Ter Apel se constata una elevada similitud (0.8163 respecto a 0.7980 para sustitución nucleotídica; 0.9456 respecto a 0.9462 para inserción-delección y 0.9838 respecto a 0.9909 para el total). Las estimaciones para la población de Santiago fueron ligeramente menores (0.7456, 0.8504 y 0.8560, respectivamente). En la población de Tenerife se observó el menor índice de diversidad haplotípica para polimorfismos por sustitución nucleotídica (0.5759) siendo los índices para polimorfismos por inserción-delección y para el total (0.7589 y 0.8700 respectivamente) también menores que los presentados por las poblaciones continentales europeas.

	n	Inserción/delección	Subst. nucl.	Ins/del + Subst.nucl.
BCN				
Total	49	0.9456 ± 0.0159 (23)	0.8163 ± 0.0431 (17)	0.9838 ± 0.0080 (36)
O _{st}	10	0.8889 ± 0.0754 (6)	0.6445 ± 0.1518 (4)	0.9556 ± 0.0594 (8)
O ₃₊₄	31	0.9634 ± 0.0193 (20)	0.8624 ± 0.0535 (15)	0.9935 ± 0.0100 (28)
O ₃₊₄₊₈	8	0.8571 ± 0.1083 (5)	0.6071 ± 0.1640 (3)	0.9286 ± 0.0844 (6)
TA				
Total	54	0.9462 ± 0.0162 (28)	0.7980 ± 0.0393 (15)	0.9909 ± 0.0055 (43)
O _{st}	37	0.9459 ± 0.0198 (20)	0.7027 ± 0.0700 (10)	0.9910 ± 0.0083 (31)
O ₃₊₄	13*	0.9615 ± 0.0496 (11)	0.8718 ± 0.0670 (7)	0.9615 ± 0.0496 (11)
O ₃₊₄₊₈	8	0.8214 ± 0.1007 (4)	0.6786 ± 0.1220 (3)	0.9286 ± 0.0844 (6)
BCN + TA				
Total	103	0.9448 ± 0.0114 (41)	0.8020 ± 0.0294 (24)	0.9874 ± 0.0039 (70)
O _{st}	47	0.9371 ± 0.0175 (21)	0.6790 ± 0.0637 (10)	0.9870 ± 0.0070 (35)
O ₃₊₄	44*	0.9757 ± 0.0106 (28)	0.8647 ± 0.0387 (17)	0.9937 ± 0.0067 (39)
O ₃₊₄₊₈	16	0.8167 ± 0.0571 (6)	0.6417 ± 0.0809 (4)	0.9083 ± 0.0479 (9)
TEN				
Total	54	0.7589 ± 0.0548 (17)	0.5759 ± 0.0792 (12)	0.8700 ± 0.0380 (23)
SAN				
Total	54	0.8504 ± 0.0131 (7)	0.7456 ± 0.0211 (4)	0.8560 ± 0.0141 (8)
O _{st}	18	0.5294 ± 0.0404 (2)	0.5294 ± 0.0404 (2)	0.5294 ± 0.0404 (2)
O ₃₊₄	29	0.7069 ± 0.0341 (4)	0.6872 ± 0.0264 (3)	0.7069 ± 0.0341 (4)
O ₃₊₄₊₈	7	0.2857 ± 0.1964 (2)	0.0000 (1)	0.2857 ± 0.1964 (2)

Tabla 40. Estimación de la diversidad haplotípica mediante el estimador h (Nei & Tajima 1981) y su distribución por ordenaciones cromosómicas. En paréntesis se indica el número de haplotipos. n, tamaño de la muestra. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. TEN, Tenerife. SAN, Santiago. * Tamaño muestral considerando las 4 líneas de la ordenación cromosómica O₃₊₄ que añadieron a la población de Ter Apel.

3.6.1.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas

Se observaron diferencias notables al comparar los valores del índice de diversidad haplotípica entre las distintas ordenaciones cromosómicas. En las poblaciones europeas, la ordenación cromosómica O_{3+4+8} presentó los valores más bajos y la ordenación O_{3+4} los más altos. (Excepto para la población de Ter Apel cuando se compara la ordenación O_{3+4} con la O_{st} al considerar todo tipo de polimorfismo). En el conjunto de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel también se observó la menor diversidad haplotípica en la ordenación cromosómica O_{3+4+8} y la mayor en la ordenación O_{3+4} . Igualmente, la ordenación cromosómica O_{3+4+8} de la población de Santiago presentó una diversidad haplotípica más baja y la O_{3+4} la más alta.

3.6.2 HETEROZIGOSIDAD POR NUCLEOTIDO

Se estimó la heterozigosidad por nucleótido mediante tres estimadores diferentes: H (Engels 1981), π (Nei & Tajima 1981) y θ (Hudson 1982) -tabla 41-. Las estimaciones de la heterozigosidad por nucleótido por los dos primeros estimadores normalmente dieron valores muy coincidentes, a diferencia de la obtenida por el estimador de Hudson que resultó bastante diferente (normalmente mayor). Este estimador, a diferencia de los otros dos, presupone neutralidad (quizás exista alguna desviación de la neutralidad). El estimador de Engels (1981) asume que los polimorfismos nucleotídicos están en equilibrio de ligamiento. El estimador de Nei & Tajima (1981), debido a que no presupone ni neutralidad ni equilibrio de ligamiento entre posiciones polimórficas y que es el más utilizado en la bibliografía, fue el estimador más utilizado en las comparaciones.

	n	H	π	θ	FR	(NR)
BCN						
Total	49	0.00498 ± 0.00059	0.00505 ± 0.00066	0.01014 ± 0.00292	(± 0.00442)	
O _{st}	10	0.00289 ± 0.00092	0.00292 ± 0.00095	0.00412 ± 0.00238	(± 0.00325)	
O ₃₊₄	31	0.00589 ± 0.00083	0.00598 ± 0.00090	0.01149 ± 0.00331	(± 0.00539)	
O ₃₊₄₊₈	8	0.00206 ± 0.00080	0.00207 ± 0.00069	0.00293 ± 0.00207	(± 0.00270)	
TA						
Total	54	0.00408 ± 0.00047	0.00412 ± 0.00044	0.00895 ± 0.00269	(± 0.00393)	
O _{st}	37	0.00311 ± 0.00053	0.00314 ± 0.00049	0.00710 ± 0.00251	(± 0.00354)	
O ₃₊₄	13*	0.00468 ± 0.00086	0.00474 ± 0.00081	0.00601 ± 0.00269	(± 0.00398)	
O ₃₊₄₊₈	8	0.00248 ± 0.00061	0.00251 ± 0.00064	0.00293 ± 0.00207	(± 0.00270)	
BCN + TA						
Total	103	0.00448 ± 0.00037	0.00454 ± 0.00039	0.00993 ± 0.00265	(± 0.00381)	
O _{st}	47	0.00302 ± 0.00046	0.00304 ± 0.00044	0.00665 ± 0.00235	(± 0.00322)	
O ₃₊₄	44*	0.00553 ± 0.00064	0.00561 ± 0.00068	0.01043 ± 0.00301	(± 0.00462)	
O ₃₊₄₊₈	16	0.00227 ± 0.00052	0.00229 ± 0.00046	0.00333 ± 0.00192	(± 0.00245)	
TEN						
Total	54	0.00272 ± 0.00048	0.00278 ± 0.00052	0.00642 ± 0.00227	(± 0.00306)	
SAN						
Total	54	0.00554 ± 0.00042	0.00563 ± 0.00040	0.00386 ± 0.00173	(± 0.00212)	
O _{st}	18	0.00168 ± 0.00000	0.00168 ± 0.00013	0.00109 ± 0.00109	(± 0.00119)	
O ₃₊₄	29	0.00573 ± 0.00033	0.00582 ± 0.00041	0.00362 ± 0.00181	(± 0.00226)	
O ₃₊₄₊₈	7	0.00000	0.00000	0.00000		

Tabla 41. Distribución de la heterozigosidad por nucleótido de la región *rp49* entre ordenaciones cromosómicas. H (Engels 1981), π (Nei & Tajima 1981), θ (Hudson 1982); FR, error standard asumiendo que exista recombinación libre y NR asumiendo que no exista recombinación. n, tamaño de la muestra. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. TEN, Tenerife. SAN, Santiago. * Tamaño muestral considerando las 4 líneas de la ordenación cromosómica O₃₊₄ que añadieron a la población de Ter Apel.

La estimación de la heterozigosidad por nucleótido para el total poblacional de la población de Barcelona fué de 0.00505 (Nei & Tajima 1981). Con el mismo estimador se obtuvo un valor de 0.00412 para la población de Ter Apel, 0.00278 para Tenerife y 0.00563 para Santiago. Al agrupar las poblaciones de Barcelona y Ter Apel la estima fué 0.00454.

3.6.2.1 Distribución por ordenaciones cromosómicas

Al comparar las estimaciones de la heterozigosidad por nucleótido de diferentes ordenaciones cromosómicas se observó (tabla 41), al igual que cuando se compararon los índices de diversidad haplotípica, que la ordenación cromosómica O_{3+4+8} presentó los valores más bajos y la ordenación O_{3+4} los más altos. En la población de Ter Apel, sin embargo, la estimación de la heterozigosidad por nucleótido de la ordenación O_{3+4} por el estimador de Hudson fué menor que la de O_{st} . Esta menor heterozigosidad es debida a que en la ordenación O_{st} de la población de Ter Apel, a diferencia de lo que ocurre en la población de Barcelona, existen varios polimorfismos para los que la variante más rara está presente en una sólo línea. Estos polimorfismos únicos hacen aumentar la estima ya que el estimador de Hudson no tiene en cuenta las frecuencias de los polimorfismos, sino el número de los mismos.

La estimación de la heterozigosidad por nucleótido para la población de Barcelona según el estimador de Nei & Tajima (1981) fué de 0.00292 para la ordenación cromosómica O_{st} , 0.00598 para O_{3+4} y 0.00207 para O_{3+4+8} . Para la población de Ter Apel los valores fueron de 0.00314, 0.00474 y 0.00251, para las ordenaciones O_{st} , O_{3+4} y O_{3+4+8} , respectivamente. Cuando se agruparon estas dos poblaciones las estimaciones fueron de 0.00304, 0.00561 y 0.00229.

En la población de Santiago la estima fué de 0.00168 para la ordenación O_{st} y 0.00582 para la ordenación O_{j+4} . La ordenación O_{3+4+8} presentó un valor de 0 ya que en esta ordenación no segregaba ningún polimorfismo.

3.6.2.2 Distribución por zonas funcionales

En la tabla 42 se presentan las estimaciones de la heterozigosidad por nucleótido distribuidas en las tres zonas funcionales en las que se dividió la región *rp49*. La región codificadora presentó siempre valores menores que los obtenidos en las regiones 5' y 3' (excepto en la región 3' de la población de Santiago en la que no se detectó ningún polimorfismo). Tanto con los estimadores de Engels como de Nei y Tajima la estima de la región 5' fué siempre superior a la de la región 3'. La heterozigosidad de la región 3' estimada mediante el estimador de Hudson fué superior a la de la región 5' en las poblaciones de Ter Apel y Tenerife. Sin embargo, debido a que en la región 3' se estudiaron pocas dianas de restricción, la estima de la heterozigosidad de esta región presenta un error standard importante.

n	H	π	θ	FR	(NR)
BCN					
Región 5' 49	0.00929 ± 0.00114	0.00956 ± 0.00125	0.01751 ± 0.00583	(± 0.00818)	
Codificad. 49	0.00098 ± 0.00051	0.00103 ± 0.00053	0.00221 ± 0.00221	(± 0.00233)	
Región 3' 49	0.00171 ± 0.00167	0.00228 ± 0.00216	0.01284 ± 0.01284	(± 0.01351)	
TA					
Región 5' 54	0.00647 ± 0.00076	0.00657 ± 0.00076	0.01105 ± 0.00451	(± 0.00573)	
Codificad. 54	0.00091 ± 0.00050	0.00096 ± 0.00052	0.00447 ± 0.00316	(± 0.00347)	
Región 3' 54	0.00309 ± 0.00212	0.00350 ± 0.00238	0.02089 ± 0.01477	(± 0.01621)	
BCN + TA					
Región 5'103	0.00777 ± 0.00068	0.00795 ± 0.00075	0.01471 ± 0.00490	(± 0.00636)	
Codificad.103	0.00094 ± 0.00036	0.00098 ± 0.00037	0.00385 ± 0.00272	(± 0.00292)	
Región 3'103	0.00242 ± 0.00136	0.00290 ± 0.00162	0.01798 ± 0.01271	(± 0.01364)	
TEN					
Región 5' 54	0.00512 ± 0.00100	0.00541 ± 0.00126	0.01105 ± 0.00451	(± 0.00573)	
Codificad. 54	0.00117 ± 0.00052	0.00122 ± 0.00053	0.00216 ± 0.00216	(± 0.00226)	
Región 3' 54	0.00155 ± 0.00151	0.00207 ± 0.00197	0.01253 ± 0.01253	(± 0.01315)	
SAN					
Región 5' 54	0.01038 ± 0.00082	0.01065 ± 0.00071	0.00696 ± 0.00348	(± 0.00413)	
Codificad. 54	0.00279 ± 0.00056	0.00289 ± 0.00057	0.00216 ± 0.00216	(± 0.00226)	
Región 3' 54	0.00000	0.00000	0.00000		

Tabla 42. Distribución de la heterozigosidad por nucleótido entre zonas funcionales del locus *rp49*. H (Engels 1981), π (Nei & Tajima 1981). θ (Hudson 1982); FR, error standard asumiendo que exista recombinación libre y NR asumiendo que no exista recombinación. En la región 3' no está incluida la región que afecta al locus *serendipity*. n, tamaño de la muestra. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. TEN, Tenerife. SAN, Santiago. Codificad, zona codificadora.

Para la región 5' también se estimó la heterozigosidad por nucleótido de las diferentes ordenaciones cromosómicas (tabla 43). No se realizó para la zona codificadora y la región 3' ya que en estas regiones se detectaron pocas posiciones polimórficas, y por tanto, las estimas no serían informativas (presentarían errores standard muy altos). En las poblaciones de Barcelona, Ter Apel y Santiago, al igual que para toda la región *rp49*, la estima de la heterozigosidad por nucleótido de la ordenación cromosómica O_{3+4} presentó los valores más altos. Sin embargo, a diferencia de lo observado para la totalidad de la región *rp49*, la región 5' de la ordenación cromosómica O_{3+4+8} en Barcelona y Ter Apel es más polimórfica que la de la ordenación O_{st} -excepto en la población de Ter Apel para el estimador de Hudson-, aunque las diferencias no son significativas.

	n	H	π	θ	FR	(NR)
BCN						
O _{st}	10	0.00406 ± 0.00173	0.00412 ± 0.00153	0.00638 ± 0.00451	(± 0.00567)	
O ₃₊₄	31	0.01111 ± 0.00165	0.01146 ± 0.00172	0.01985 ± 0.00661	(± 0.00988)	
O ₃₊₄₊₈	8	0.00467 ± 0.00183	0.00476 ± 0.00158	0.00667 ± 0.00472	(± 0.00615)	
TA						
O _{st}	37	0.00392 ± 0.00083	0.00396 ± 0.00085	0.00814 ± 0.00407	(± 0.00498)	
O ₃₊₄	13*	0.00800 ± 0.00170	0.00816 ± 0.00154	0.01082 ± 0.00541	(± 0.00756)	
O ₃₊₄₊₈	8	0.00558 ± 0.00140	0.00575 ± 0.00150	0.00667 ± 0.00472	(± 0.00615)	
BCN + TA						
O _{st}	47	0.00388 ± 0.00075	0.00393 ± 0.00076	0.00763 ± 0.00381	(± 0.00458)	
O ₃₊₄	44*	0.01009 ± 0.00126	0.01039 ± 0.00133	0.01801 ± 0.00600	(± 0.00853)	
O ₃₊₄₊₈	16	0.00513 ± 0.00119	0.00526 ± 0.00108	0.00772 ± 0.00446	(± 0.00567)	
SAN						
O _{st}	18	0.00401 ± 0.00002	0.00407 ± 0.00031	0.00262 ± 0.00262	(± 0.00285)	
O ₃₊₄	29	0.00954 ± 0.00065	0.00977 ± 0.00088	0.00601 ± 0.00347	(± 0.00415)	
O ₃₊₄₊₈	7	0.00000	0.00000	0.00000		

Tabla 43. Distribución de la heterozigosidad por nucleótido de la región 5' entre ordenaciones cromosómicas. H (Engels 1981), π (Nei & Tajima 1981). θ (Hudson 1982); FR, error standard asumiendo que exista recombinación libre y NR asumiendo que no exista recombinación. n, tamaño de la muestra. BCN, Barcelona. TA, Ter Apel. SAN, Santiago. * Tamaño muestral considerando las 4 líneas de la ordenación cromosómica O₃₊₄ que añadieron a la población de Ter Apel.

3.7 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

Se calculó el desequilibrio de ligamiento [parámetros D (Lewontin & Kojima 1960), D' (Lewontin 1964) y r (Hill & Robertson 1968)] para todos los pares de polimorfismos por sustitución nucleotídica de cada población. Sólo se calculó el desequilibrio de ligamiento en pares de polimorfismos en los que la variante menos frecuente estuviera presente más de una vez en la muestra con objeto de evitar posibles desequilibrios espúreos. Se calculó también el desequilibrio de ligamiento entre posiciones polimórficas dentro de cada ordenación cromosómica. Al existir homogeneidad entre las poblaciones de Barcelona y Ter Apel se pudo analizar también el desequilibrio de ligamiento tras agrupar ambas poblaciones. La significación estadística fué analizada mediante el test exacto de Fisher de dos colas. En la tabla 44 se muestran los desequilibrios estadísticamente significativos.

No se observaron fuertes desequilibrios de ligamiento en Barcelona, Ter Apel y Tenerife. En la población de Barcelona se detectaron 2 desequilibrios significativos entre los 28 tests efectuados (posiciones: #1 y #11; #12 y #14). En Ter Apel solo se detectó un desequilibrio significativo (posiciones #1 y #11) -posiciones también en desequilibrio, y con el mismo signo, en la población de Barcelona-. Al agrupar ambas poblaciones se observaron 3 desequilibrios significativos en los 45 tests efectuados: El desequilibrio detectado entre las posiciones #1 y #11 que resulta altamente significativo ($P = 0.0006$); un desequilibrio entre las posiciones #12 y #14 (ya detectado en la población de Barcelona) con una probabilidad $P = 0.0056$ y otro entre las posiciones #12 y #21. En la población de Tenerife se detectaron 2 desequilibrios significativos (posiciones: #2 y #9; #2 y #14) -de los 10 tests

efectuados-. Sin embargo, la población de Santiago presentó grandes desequilibrios entre posiciones polimórficas: 8 significativos de los 10 tests efectuados (2 de ellos con una probabilidad menor del 0.0001).

Cuando se analizó el desequilibrio de ligamiento en polimorfismos dentro de ordenaciones cromosómicas de las poblaciones de Barcelona, Ter Apel y Tenerife, tampoco se observaron fuertes desequilibrios. En la población de Barcelona se detectó un desequilibrio en la ordenación O_{3+4} (de 21 tests efectuados). En las poblaciones de Barcelona y Ter Apel agrupadas se observó uno en la ordenación O_{st} (de 3 tests) y otro en la ordenación O_{3+4} (de 21 tests). Por el contrario, las posiciones polimórficas de la ordenación O_{3+4} de la población de Santiago presentaron fuertes desequilibrios de ligamiento (los 6 tests realizados resultaron significativos con una probabilidad mínima del 0.005).

BARCELONA	O _{st}	Comparaciones: 1	Significativas: 0		
BARCELONA	O ₃₊₄	Comparaciones: 21	Significativas: 1		
	<u>#</u>	<u>D</u>	<u>D'</u>	<u>R</u>	<u>P</u>
	12 - 14	-0.0520	-0.6173	-0.5250	0.0369 *
BARCELONA	Total	Comparaciones: 28	Significativas: 2		
	<u>#</u>	<u>D</u>	<u>D'</u>	<u>R</u>	<u>P</u>
	1 - 11	0.0546	0.7278	0.3416	0.0269 *
	12 - 14	-0.0358	-0.6370	-0.5457	0.0149 *
TER APEL	O _{st}	Comparaciones: 1	Significativas: 0		
TER APEL	O ₃₊₄	Comparaciones: 3	Significativas: 0		
TER APEL	Total	Comparaciones: 10	Significativas: 1		
	<u>#</u>	<u>D</u>	<u>D'</u>	<u>R</u>	<u>P</u>
	1 - 11	0.0583	0.7589	0.3532	0.0144 *
BCN + TA	O _{st}	Comparaciones: 3	Significativas: 1		
	<u>#</u>	<u>D</u>	<u>D'</u>	<u>R</u>	<u>P</u>
	17 - 27	-0.0353	-1.0000	-0.4655	0.0259 *
BCN + TA	O ₃₊₄	Comparaciones: 21	Significativas: 1		
	<u>#</u>	<u>D</u>	<u>D'</u>	<u>R</u>	<u>P</u>
	12 - 14	-0.0377	-0.6239	-0.4714	0.0302 *
BCN + TA	Total	Comparaciones: 45	Significativas: 3		
	<u>#</u>	<u>D</u>	<u>D'</u>	<u>R</u>	<u>P</u>
	1 - 11	0.0566	0.7444	0.3479	0.0006 ***
	12 - 14	-0.0180	-0.6497	-0.4982	0.0056 **
	12 - 21	-0.0171	-0.3694	-0.3694	0.0179 *

(Tabla 44, continúa)

TENERIFE		Total	Comparaciones: 10		Significativas: 2
#		<u>D</u>	<u>D'</u>	<u>R</u>	<u>P</u>
2 - 9		0.0302	0.4490	0.3975	0.0388 *
2 - 14		0.0436	0.5404	0.4473	0.0125 *
SANTIAGO		O ₃₊₄	Comparaciones: 6		Significativas: 6
#		<u>D</u>	<u>D'</u>	<u>R</u>	<u>P</u>
1 - 11		0.2140	1.0000	1.0000	0.0000 ***
1 - 12		-0.1177	-1.0000	-0.5244	0.0052 **
1 - 21		0.1177	1.0000	0.5244	0.0052 **
11 - 12		-0.1177	-1.0000	-0.5244	0.0052 **
11 - 21		0.1177	1.0000	0.5244	0.0052 **
12 - 21		-0.2354	-1.0000	-1.0000	0.0000 ***
SANTIAGO		Total	Comparaciones: 10		Significativas: 8
#		<u>D</u>	<u>D'</u>	<u>R</u>	<u>P</u>
1 - 11		0.2085	1.0000	1.0000	0.0000 ***
1 - 12		-0.0604	-1.0000	-0.3282	0.0226 *
1 - 16		0.0494	1.0000	0.2902	0.0450 *
1 - 21		0.0604	1.0000	0.3282	0.0226 *
11 - 12		-0.0604	-1.0000	-0.3282	0.0226 *
11 - 16		0.0494	1.0000	0.2902	0.0450 *
11 - 21		0.0604	1.0000	0.3282	0.0226 *
12 - 21		-0.1622	-1.0000	-1.0000	0.0000 ***

Tabla 44. Desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos por sustitución nucleotídica. Aún cuando se especifica el número de comparaciones efectuadas, sólo se indica el resultado de aquellas que han resultado significativas. D, D' y r, parámetros del desequilibrio de ligamiento. #, número de posición polimórfica. P, probabilidad mediante el test exacto de Fisher de dos colas. Significación estadística: * P < 0.05. ** P < 0.01. *** P < 0.001.

DISCUSION

4.1 VARIABILIDAD EN LAS POBLACIONES EUROPEAS

4.1.1 VARIABILIDAD POR SUBSTITUCION NUCLEOTIDICA

En la tabla 45 se muestran las estimaciones de la heterozigosidad por nucleótido (π , Nei & Tajima 1981) para diferentes regiones de *Drosophila* en estudios realizados mediante comparación de mapas de restricción. Se ha estimado que la heterozigosidad media para varias regiones de *D. melanogaster* es del orden de $\pi = 0.005$. No obstante, para algunas regiones concretas, como la región *yellow-achaete-scute*, la heterozigosidad llega a ser de tan sólo $\pi = 0.0001$ (Aguadé et al. 1989a). En esta región la reducción de variabilidad puede ser una consecuencia del bajo nivel de recombinación que presenta; la actuación de la selección sobre alguna substitución nucleotídica favorable puede conducir mediante el efecto "hitch-hiking", sobre todo en regiones con baja tasa de recombinación, a una reducción de la heterozigosidad debida a polimorfismos neutros. En *D. ananassae* la heterozigosidad media es de $\pi = 0.004$ (Stephan & Langley 1989). No obstante, dos de las tres poblaciones analizadas para el locus *vermilion* de *D. ananassae* presentan un nivel de variabilidad reducido, comparable al de la región *yellow-achaete-scute* de *D. melanogaster*.

Los niveles de variabilidad estimados en *D. pseudoobscura* (Schaeffer et al. 1987; Riley et al. 1989) y *D. simulans* (Aquadro et al. 1988) son ostensiblemente mayores que los estimados en *D. melanogaster* y *D. ananassae*. En esos estudios se ha estimado que la variabilidad nucleotídica de las regiones *rosy* y *Adh* son de unas tres y cuatro veces respectivamente superiores en *D. pseudoobscura* que en *D. melanogaster*, y que la de la región

rosy es unas seis veces mayor en *D. simulans* que en *D. melanogaster*. Según Aquadro et al. (1988) esta mayor heterozigosis por nucleótido de *D. pseudoobscura* y *D. simulans* podría ser explicada como consecuencia de un mayor tamaño efectivo poblacional de estas especies. De acuerdo con la teoría neutralista, la heterozigosis esperada es aproximadamente igual a $4N_e\mu$, siendo N_e el tamaño efectivo poblacional y μ la tasa de mutación por nucleótido hacia alternativas selectivamente neutras. Un aumento del tamaño efectivo poblacional, por lo tanto, tendrá como consecuencia un aumento de la heterozigosis para una misma tasa de mutación.

Tabla 45. Heterozigosis por nucleótido (π , Nei & Tajima 1981) para distintos loci de *Drosophila*. C, cromosoma: A, autosómico; X, cromosoma X. T, tipo de técnica: S, Southern blot; F, "four-cutter analysis". P, poblaciones analizadas: 1, una única población; V, varias poblaciones conjuntamente o muestra no aleatoria. π , heterozigosis por nucleótido según Nei & Tajima (1981). *, heterozigosis por nucleótido calculada según Kreitman & Aguadé (1986a); **, heterozigosis por nucleótido calculada según el estimador de Engels (1981). Ref, referencia: 1, (Stephan & Langley 1989); 2, (Langley et al. 1982); 3, (Birley 1984); 4, (Cross & Birley 1986); 5, (Aquadro et al. 1986); 6, (Kreitman & Aguadé 1986a); 7, (Jiang et al. 1988); 8, (Aguadé 1988b); 9, (Kreitman & Aguadé 1986b); 10, (Langley et al. 1988); 11, (Eanes et al. 1989a); 12, (Leigh Brown 1983); 13, (Schaeffer et al. 1988); 14, (Aquadro et al. 1988); 15, (Langley & Aquadro 1987); 16, (Miyashita & Langley 1988); 17, (Beech & Leigh Brown 1989); 18, (Aguadé et al. 1989a); 19, (Eanes et al. 1989b); 20, (Aguadé et al. 1989b); 21, (Schaeffer et al. 1987). 22, (Riley et al. 1989). Nota: Se estimó el valor de π a partir de los datos (en los casos que fué posible) cuando no fué calculado por los autores. Simmons et al. (1989) analizaron la región *Adh* en 3 poblaciones de *Drosophila melanogaster* mediante "four-cutter analysis" sin indicar las estimas de las heterozigosis, sin embargo, no se pudieron calcular las heterozigosis por falta de datos.

Especie	Locus	C	T	P	π	Ref.	
<i>D. ananassae</i>	<i>forked</i>	X	S	1	0.008	1	
		X	S	1	0.006	1	
		X	S	1	0.002	1	
	<i>vermilion</i>	X	S	1	0.001	1	
		X	S	1	0.002	1	
		X	S	1	0.005	1	
<i>D. melanogaster</i>	<i>Adh</i>	A	S	V	0.006	2	
		A	S	1	0.006	3	
		A	S	1	0.010	4	
		A	S	1	0.012	4	
		A	S	V	0.006	5	
		A	F	1	0.006*	6	
		A	F	1	0.006*	6	
		A	S	1	0.007	7	
		A	S	1	0.006	7	
		A	S	1	0.005	7	
		A	F	V	0.003**	8	
		<i>Adh</i> Región 5'	A	F	V	0.004	9
		<i>Amy</i>	A	S	V	0.008	10
	<i>G6pd</i>	X	S	V	0.001	11	
	<i>hsp70</i>	A	S	1	0.002	12	
	<i>Notch</i>	X	S	V	0.005	13	
	<i>rosy</i>	A	S	1	0.003	14	
	<i>white</i>	X	S	V	0.011	15	
		X	S	V	0.009	16	
		X	F	V	0.004	16	
		<i>yellow-achaete-scute</i>	X	S	1	0.003	17
		X	S	1	0.001	17	
		X	S	1	0.0006	18	
X		S	1	0.0003	18		
X		S	1	0.0001	18		
X		S	1	0.002	19		
X		S	1	0.004	19		
<i>zeste-1ko</i>	X	S	1	0.0006	19		
	X	S	1	0.0002	19		
	X	S	1	0.003	19		
	X	S	V	0.004	20		
	<i>D. pseudoobscura</i>	<i>Adh</i>	A	S	1	0.023	21
		<i>rosy</i>	A	F	V	0.010	22
	<i>D. simulans</i>	<i>rosy</i>	A	S	1	0.019	14

Tabla 45. Heterozigosidad por nucleótido (π , Nei & Tajima 1981) para distintos loci de *Drosophila*.

El nivel de heterozigosidad que se ha estimado en la región *rp49* de *D. subobscura* ($\pi = 0.00505$ para la población de Barcelona, $\pi = 0.00412$ para la población de Ter Apel y $\pi = 0.00454$ para el conjunto de estas poblaciones) es comparable a la heterozigosidad media observada en *D. melanogaster* (exceptuando las regiones *yellow-achaete-scute* y *G6pd*) y *D. ananassae*. Estos resultados, por lo tanto, parece que contrastan con las altas heterozigosidades obtenidas en *D. pseudoobscura* [$\pi = 0.023$ en la región *Adh* (Schaeffer et al. 1987) y $\pi = 0.010$ en la región *rosy* (Riley et al. 1989)] y en *D. simulans* [$\pi = 0.019$ en la región *rosy* (Aquadro et al. 1988)]. La heterozigosidad estimada de la región *rosy* de *D. pseudoobscura* puede parecer poco mayor que la de la región *rp49*. No obstante, la región *rosy* estudiada por Riley et al. (1989) fué mayoritariamente codificadora, mientras que una fracción importante de la región *rp49* fué no codificadora (región 5'). Esta menor heterozigosidad de *D. subobscura* respecto a *D. pseudoobscura* se constata al comparar las heterozigosidades de la región *rosy* de *D. pseudoobscura* ($\pi = 0.010$) con la de la zona codificadora de la región *rp49* de *D. subobscura* ($\pi = 0.001$).

Al comparar el porcentaje de diferencias de aminoácidos a nivel interespecífico entre *D. melanogaster* y *D. pseudoobscura* o *D. subobscura* para los loci *Xdh*, *Adh*, *Hsp82*, *Ubx*, *Gart*, *l(3)s12* y *rp49*, se observa que la menor tasa la presenta el locus *Hsp82* seguido del *rp49*, mientras que el locus *Xdh* (o *rosy*) presenta una tasa mayor (Aguadé 1988a; Riley 1989). Así pues, el locus *rp49* presenta una tasa de sustitución de aminoácidos pequeña, debido probablemente a la gran limitación funcional que presentaría la proteína codificada -una proteína ribosómica-, por ser una proteína estructural. Además, el locus *rp49* es el que presenta la tasa de sustitución silenciosa más baja de

todas las comparaciones efectuadas por Sharp & Li (1989) entre especies del grupo *melanogaster* y del grupo *obscura*. Según estos autores el gen *rp49* junto a los genes *Hsp82* y *Adh* serían genes de evolución lenta. Una predicción de la teoría neutralista es la relación directa entre la tasa de divergencia interespecífica y el nivel de polimorfismo intraespecífico. Por lo tanto, el gen *rp49* de *D. subobscura* podría poseer unos niveles de variabilidad intraespecífica más bajos que, por ejemplo, el gen *rosy* en esta misma especie. La ausencia de estimas de heterozigosidad para la región *rp49* en *D. melanogaster* impide efectuar una comparación directa y por tanto sacar una conclusión del nivel de variabilidad en *D. subobscura*. Sin embargo, no parece arriesgado predecir que el nivel de variabilidad nucleotídica en *D. subobscura* pudiese ser del mismo orden que el de *D. pseudoobscura* y *D. simulans* y por lo tanto superior al de *D. melanogaster*.

Miyashita & Langley (1988) han observado que el número de polimorfismos que segregan en la región 5' del locus *white* de *D. melanogaster* es significativamente mayor de los que segregan en la unidad transcripcional. Sin embargo, cuando compararon la variabilidad debida a substituciones nucleotídicas silenciosas no observaron heterogeneidad entre las diferentes regiones funcionales de locus *white*. Estos autores interpretan que estos hechos son consistentes con la acción de la selección purificadora frente a las substituciones de aminoácido. Estos resultados obtenidos por Miyashita & Langley (1988), contrastan con los del estudio de Kreitman & Aguadé (1986b) en la región *Adh*. Estos autores observaron que el nivel de variabilidad de la región codificadora era similar al de las regiones flanqueantes. Sin embargo, detectaron un exceso de polimorfismos silenciosos en la región codificadora del locus *Adh* comparado con la región flanqueante 5'. Hudson et al. (1987)

han desarrollado un test para comprobar la predicción de la teoría neutralista de que las regiones que evolucionan a una alta tasa también exhibirán altos niveles de polimorfismo (Kimura 1983). Este test requiere tanto datos de la divergencia interespecífica de por lo menos dos regiones como de la variabilidad intraespecífica en una de las especies en estas mismas regiones. Tras aplicar este test a la regiones 5' flanqueante y codificadora del locus *Adh* entre *D. melanogaster* y *D. sechellia*, concluyen que existe una desviación significativa de la predicción esperada por la teoría neutralista; el exceso de polimorfismos silenciosos en la zona codificadora sería consistente con la presencia de un polimorfismo equilibrado en dicha región.

En el presente estudio, al igual que en el de Miyashita & Langley (1988), se ha observado un mayor número de polimorfismos por sustitución nucleotídica en la región flanqueante 5' del locus *rp49* que en la zona codificadora del mismo. Sin embargo, sólo resultó significativo el test de heterogeneidad realizado en la población de Barcelona (no siéndolo ni en Ter Apel, ni en el conjunto de Barcelona y Ter Apel). El mejor parámetro para comparar la existencia de diferencias de variabilidad entre distintas regiones funcionales, tendría que ser el de la heterozigosidad por nucleótido por ser independiente tanto del tamaño de la muestra (número de cromosomas) como del tamaño de la región de análisis (número de nucleótidos). En la región *rp49* (para el conjunto de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel) se observó un heterozigosidad 8 veces mayor en la región 5' que en la codificadora ($\pi = 0.00795$ y $\pi = 0.00098$ respectivamente). Sin embargo, en la actualidad no existe ningún test estadístico válido para comparar estas diferencias de heterozigosidad.

Hudson (comunicación personal), bajo la suposición de neutralidad, propone una aproximación para comparar diferencias de heterozigosidad (mediante el estimador θ). Primero se calcula el número esperado de posiciones polimórficas y su varianza para cada comparación (Watterson 1975). Suponiendo que:

$$\Sigma (\text{observados} - \text{esperados})^2 / \text{varianza} \approx \chi^2$$

se puede comprobar si las diferencias de heterozigosidad son estadísticamente significativas. En el conjunto de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel se comparó el nivel de heterozigosidad de la región 5' con el de la región codificadora ($\theta = 0.01471$ para la y $\theta = 0.00385$ para la región codificadora). El valor de la ji-cuadrado fué de 3.85; para un grado de libertad la probabilidad asociada a este valor es menor del 5%. Esto permite afirmar que existen diferencias significativas en el nivel de heterozigosidad de la región 5' respecto al de la región codificadora.

Al igual que Miyashita & Langley (1988) tampoco se observaron diferentes niveles de variabilidad nucleotídica silenciosa en la distintas regiones funcionales del locus *rp49*. Para este análisis se estimó que un 26% -para el juego de enzimas de restricción utilizado- de todos los cambios nucleotídicos de la región codificadora eran silenciosos (no generarían cambios de aminoácido). Esta estimación se realizó comprobando si los posibles cambios nucleotídicos que pueden producir pérdidas o ganancias de dianas de restricción son o no silenciosos. Si se considera que todos los cambios nucleotídicos observados en la zona codificadora son silenciosos, las heterozigosidades estimadas para cambios silenciosos en el conjunto de las

poblaciones de Barcelona y Ter Apel serían: $\theta = 0.015$ para la región 5', $\theta = 0.018$ para la región codificadora, y $\theta = 0.018$ para la región 3'. El suponer el carácter silencioso de los cambios nucleotídicos observados en la zona codificadora puede justificarse por una parte en la baja divergencia interespecífica del locus *rp49* a nivel proteico (Aguadé 1988a; Riley 1989) y por otra en el interés en maximizar la heterozigosidad debida a cambios silenciosos. Tras aplicar el test propuesto por Hudson, no se detectaron diferencias significativas entre estas estimas de heterozigosidad.

Al existir datos de la variabilidad intraespecífica tanto del DNA mitocondrial en *Drosophila subobscura* (Latorre et al. 1986; Afonso et al. 1990; Rozas et al. 1990) como del DNA nuclear (*rp49* en el presente estudio) podemos analizar la existencia de diferencias en sus respectivas tasas evolutivas. Debido a la alta densidad de unidades de transcripción en el DNA mitocondrial de *Drosophila*, en el que excepto la región A+T apenas existen regiones intergénicas (Clary et al. 1984), el nivel del polimorfismo de la región codificadora de un locus nuclear sería el más apropiado para ser comparado con el del DNA mitocondrial. El nivel de polimorfismo obtenido por Rozas et al. (1990) al estudiar el mtDNA de *D. subobscura* de la misma población de Barcelona analizada en este estudio ha sido $\pi = 0.00363$. Para la región codificadora del locus *rp49* de la población de Barcelona la heterozigosidad por nucleótido es $\pi = 0.00103$. Por lo tanto la tasa de polimorfismo es 3.5 veces mayor en el DNA mitocondrial que en el locus *rp49*. Este relación es mayor que la obtenida en otras especies de *Drosophila*. En trabajos anteriores (Powell et al. 1986; Solignac et al. 1986; Caccone et al. 1988; Sharp & Li 1989) se propone que la tasa de cambio del DNA mitocondrial es como máximo 2 veces mayor que la del nuclear; esta situación

difiere de la de mamíferos en los que la tasa es de 5 a 10 veces superior (Brown et al. 1982). Sin embargo, debido a que los errores acumulados en la estimación de estas tasas son importantes, esta tasa de 3.5 podría no ser significativamente distinta de 2. Por lo tanto, no se puede decir, sin ambigüedad, que la tasa de evolución del DNA mitocondrial respecto del DNA nuclear en *D. subobscura* sea mayor que la estimada para otras especies de *Drosophila*. En el caso de que esta relación de 3.5 fuese significativamente mayor de 2, este resultado podría ser debido al supuesto bajo nivel de polimorfismo del locus *rp49*.

4.1.2 VARIABILIDAD POR INSERCIONES-DELECCIONES

En los análisis de la variabilidad realizados en *Drosophila* se ha observado que las inserciones-delecciones de tamaño grande (más de 100 pb) -en algún caso identificadas como elementos transponibles (Leigh Brown 1983; Aquadro et al. 1986)- son comunes en las poblaciones naturales (con una frecuencia de líneas con inserción-delección por kilobase que fluctúa entre 0.002 y 0.045 -calculado a partir de los trabajos citados en la tabla 45-). Sin embargo, a diferencia de las inserciones-delecciones pequeñas o de los polimorfismos por sustitución nucleotídica, las inserciones-delecciones grandes frecuentemente son únicas por lo que se ha sugerido que tendrían un efecto deletéreo (Aquadro et al. 1986; Golding et al. 1986). En el presente estudio no se ha identificado ninguna inserción-delección de tamaño grande. De hecho, en estudios realizados por "four-cutter analysis" se esperaría una menor frecuencia de estas inserciones-delecciones por analizarse proporcionalmente una menor región intergénica. Efectivamente, en los estudios realizados por "four-cutter analysis" apenas se han identificado inserciones-delecciones de gran tamaño.

Miyashita & Langley (1988) mediante dicha técnica identificaron 2 deleciones de tamaño grande (de 200 y 300 pares de bases) en la zona flanqueante 5', a unas 2 kilobases de la región codificadora del locus *white*, obteniendo una tasa de 0.003 inserciones-deleciones por individuo y kilobase. Sin embargo, cuando utilizan la técnica de Southern, la tasa aumenta a 0.018. Con esta técnica detectaron varias inserciones mayores de 1 kilobase (hasta de 10 kb), localizando a unas 4 kilobases la más próxima a la región codificadora del locus.

En el presente trabajo, como en la mayoría de estudios realizados en *Drosophila*, se ha observado que la distribución de frecuencias de las inserciones-deleciones pequeñas (en este caso de 1 a 12 pares de bases) es comparable a la de los polimorfismos por sustitución nucleotídica.

El análisis de la secuencia del locus *rp49* (Aguadé 1988a) sugiere que varias de estas inserciones-deleciones de pocos pares de bases podrían generarse por "misspairing" (apareamiento erróneo de bases que puede ocasionar duplicaciones o deleciones durante la replicación o reparación del DNA) (Levinson & Gutman 1987). El polimorfismo #3, con 7 "alelos" (o longitudes distintas) y unas diferencias de tamaño entre ellos estimadas en múltiplos de 3 pares de bases, se acotó entre las posiciones 64 y 163 donde existen secuencias nucleotídicas que son múltiplos de 3 pares de bases (GGT, GTT, TCA). El polimorfismo #20 está localizado en el intrón del locus *rp49* en el cual existen secuencias repetidas (AATGG, ATGC). El polimorfismo #26, está localizado en una región en la que existen series de varias adeninas o timinas ("homoruns"). Estas secuencias nucleotídicas repetidas pueden facilitar el "misspairing".

4.1.3 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

La asociación entre loci alozímicos dentro de una misma ordenación cromosómica ha sido raramente detectada en *D. subobscura* (para una revisión: Zapata & Alvarez 1987). Sin embargo, como indica Brown (1975), se requieren muestras grandes para detectar asociaciones entre loci si los desequilibrios son débiles o las frecuencias génicas son extremas, condiciones que están presentes en varios de los estudios realizados en *D. subobscura* (Zapata & Alvarez 1987).

A nivel nucleotídico, se ha observado desequilibrio de ligamiento entre posiciones nucleotídicas en algunas regiones de *D. melanogaster*: *Adh* (Langley et al. 1982; Birley 1984; Cross & Birley 1986; Aquadro et al. 1986), *white* (Miyashita & Langley 1988) y *yellow-achaete-scute* (Aguadé et al. 1989a; Beech & Leigh Brown 1989; Eanes et al. 1989b). En las regiones *Amy* (Langley et al. 1988), *Notch* (Schaeffer et al. 1988) y *zeste-tko* (Aguadé et al. 1989b) se ha detectado una frecuencia menor de desequilibrios de ligamiento.

Varios mecanismos no selectivos pueden explicar la existencia de desequilibrio de ligamiento entre posiciones nucleotídicas -deriva, endogamia, migración, "hitch-hiking", subdivisión de poblaciones (Hedrick 1985)- sobre todo, en regiones cromosómicas relativamente pequeñas, pues la probabilidad de recombinación será pequeña. Al estudiar el locus *white* de *D. melanogaster* Miyashita & Langley (1988) observaron una disminución progresiva del desequilibrio al aumentar la distancia entre polimorfismos, descenso del desequilibrio esperado de acuerdo con las predicciones teóricas; dichos autores pudieron establecer que la situación de equilibrio se alcanza a partir de unas 2

kilobases de distancia. En regiones con tasas de recombinación más bajas se esperaría encontrar desequilibrios entre posiciones más alejadas, tal como se ha observado en la región *yellow-achaete-scute* de *D. melanogaster* (Aguadé et al. 1989a; Beech & Leigh Brown 1989; Eanes et al. 1989b).

Los altos desequilibrios de ligamiento observados en la región *Adh* de *D. melanogaster*, sin embargo, parecen no ser debidos a mecanismos puramente históricos. En las 13 kilobases analizadas de la región *Adh*, Aquadro et al. (1986) detectaron un completo desequilibrio de ligamiento en los cromosomas portadores del aloenzima *Fast*. Estos autores comentan que esos fuertes desequilibrios podrían ser el producto de una historia evolutiva compleja influenciada por el efecto "hitch-hiking" con relación a alguna variante selectivamente favorecida. La observación de Miyashita & Langley (1988) de una mayor concentración de desequilibrios de ligamiento significativos en la región transcripcional del locus *white* de *D. melanogaster*, tampoco parece una consecuencia obvia de mecanismos puramente históricos.

En *D. subobscura* se detectaron algunos desequilibrios de ligamiento entre posiciones nucleotídicas: 2 de 28 comparaciones en Barcelona, 1 de 10 en Ter Apel y 3 de 45 en el conjunto de Barcelona y Ter Apel. El hecho de que para un nivel de significación del 5% de cada 20 comparaciones se esperaría encontrar por azar un desequilibrio significativo que no lo fuera en realidad, sugiere la no existencia de asociación entre los polimorfismos de estas poblaciones. La importancia de la recombinación en la evolución de la región *rp49*, evidenciada por la existencia de varios pares nucleotídicos discordantes (11 de 28 en Barcelona, 5 de 10 en Ter Apel y 13 de 45 en el conjunto de Barcelona y Ter Apel), es consistente con este bajo nivel de

desequilibrio de ligamiento.

No obstante, dos de los desequilibrios de ligamiento observados parecen no ser atribuibles a errores estadísticos: los polimorfismos nucleotídicos #1 y #11 muestran un desequilibrio de ligamiento en la misma dirección tanto en Barcelona como en Ter Apel; cuando se agrupan estas poblaciones la probabilidad asociada al test de independencia es muy baja ($p = 0.0006$). Al aplicar dicho test a los polimorfismos #12 y #14, en el conjunto de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel, se obtiene también una probabilidad asociada inferior al 5% ($p = 0.006$). Sin embargo, apenas existen desequilibrios de ligamiento dentro de una misma ordenación cromosómica. Por lo tanto, podemos concluir que en la región *rp49* de *D. subobscura* no se detecta un significativo desequilibrio de ligamiento; los aparentes desequilibrios de ligamiento observados entre los polimorfismos #1 y #11, y #12 y #14 -detectados al analizar desequilibrios de ligamiento en los totales poblacionales- serían consecuencia de la asociación de esos polimorfismos con ciertas ordenaciones cromosómicas.

4.2 VARIABILIDAD Y ORDENACIONES CROMOSOMICAS

4.2.1 ORIGEN Y DIFERENCIACION DE LAS ORDENACIONES CROMOSOMICAS

Clásicamente se ha considerado que las inversiones cromosómicas tienen un origen único. El principal razonamiento deriva de la baja probabilidad de recurrencia, ya que implicaría 2 roturas cromosómicas simultáneas exactamente en los mismos puntos del cromosoma y la posterior unión del fragmento cromosómico que se libera en posición invertida. Sin embargo, con la observación de la distribución no al azar de los puntos cromosómicos de rotura (Bernstein & Goldschmidt 1961; Krimbas & Loukas 1980) junto con el descubrimiento de los elementos transponibles en *Drosophila* y su potencialidad en producir reordenaciones cromosómicas (Engels & Preston 1984; Tsubota et al. 1989), se ha especulado sobre un origen múltiple de las inversiones cromosómicas.

Si el origen de las inversiones cromosómicas es único, en el origen de las mismas no segregaría ningún polimorfismo dentro de cada inversión, existiendo, por lo tanto, un único haplotipo para la región afectada por el segmento invertido. Posteriormente, por mutación y recombinación entre cromosomas portadores de la misma inversión, la nueva ordenación cromosómica se iría diferenciando. Según este punto de vista cada ordenación cromosómica representaría un "pool" génico que evolucionaría independientemente del de otras inversiones cromosómicas. Los raros sucesos de dobles entrecruzamientos o conversión génica entre distintas ordenaciones cromosómicas, permitirían el paso de información entre distintas ordenaciones

cromosómicas, y por lo tanto, la no independencia absoluta entre los supuestos "pools" génicos.

En el presente estudio se ha identificado más de un haplotipo en cada una de las tres ordenaciones cromosómicas. Además, se han identificado varios polimorfismos y haplotipos compartidos entre diferentes ordenaciones cromosómicas. Los polimorfismos compartidos pueden ser explicados por mutación recurrente o por raros dobles entrecruzamientos o conversión génica entre ordenaciones cromosómicas. Sin embargo, si suponemos que no existen puntos con alta tasa de mutación no se esperaría un efecto importante de la mutación recurrente. Por lo tanto, si las inversiones cromosómicas tienen un origen único, sólo cabe explicar estos polimorfismos compartidos entre diferentes ordenaciones cromosómicas por dobles entrecruzamientos o conversión génica entre ordenaciones cromosómicas.

En la región *rp49* el número de polimorfismos y haplotipos compartidos es elevado. La ordenación cromosómica O_{st} , en la cual segregan 8 polimorfismos por sustitución nucleotídica, comparte 6 con la ordenación O_{3+4} . La ordenación O_{3+4+8} comparte los 3 polimorfismos que segregan en ella tanto con la ordenación O_{st} como con la O_{3+4} . Estos resultados indican, que el intercambio génico entre ordenaciones cromosómicas es un mecanismo importante en la historia evolutiva de las ordenaciones cromosómicas. Alternativamente, la existencia de polimorfismos compartidos sería compatible con un origen polifilético de las inversiones cromosómicas. Aún cuando generalmente continúa aceptándose un origen único de las inversiones, hasta que no se efectúen estudios a nivel poblacional de las secuencias nucleotídicas que afectan a los puntos de rotura de las mismas, no se tendrá una respuesta

inequívoca en este tema.

El mecanismo principal responsable de la transferencia de información genética entre ordenaciones cromosómicas parece ser la conversión génica, y no el debido a raros dobles entrecruzamientos entre distintas ordenaciones cromosómicas (Chovnick 1973). Este autor, mediante cruzamientos entre distintos mutantes de la región *rosy* de *D. melanogaster*, observó que la tasa de entrecruzamientos, dentro de la región afectada por la inversión cromosómica, está fuertemente disminuida en los heterocigotos para la inversión. Sin embargo, la tasa de conversión génica en dicha región es del mismo orden tanto en homocigotos como en heterocigotos para la inversión.

En el locus *Adh* de *D. melanogaster* también se ha detectado flujo de información entre ordenaciones cromosómicas a nivel nucleotídico. Este locus, a diferencia de lo que ocurre en el locus *rp49*, no queda incluido en el fragmento afectado por la inversión *In(2L)t* aunque está cerca del punto de rotura. Aquadro et al. (1986) analizaron la variabilidad en este locus en 48 líneas, 5 de las cuales presentaban la ordenación cromosómica *In(2L)t*. En esta ordenación cromosómica observaron 2 haplotipos que diferían entre sí por 5 polimorfismos, cuatro de estos polimorfismos estaban compartidos por las dos ordenaciones cromosómicas. Estos autores concluyen que o bien uno de estos haplotipos se originó por recombinación entre las dos ordenaciones cromosómicas o bien, aunque menos probable, la ordenación cromosómica *In(2L)t* se originó en más de una ocasión. Aguadé (1988b) ha estudiado más ampliamente la variabilidad en el locus *Adh* de distintas ordenaciones cromosómicas de *D. melanogaster*. Al estudiar dicha variabilidad en 39 cromosomas *St* y 40 portadores de la inversión *In(2L)t* se observaron también

varios polimorfismos compartidos entre las dos ordenaciones cromosómicas -de los 8 polimorfismos por substitución nucleotídica detectados en los cromosomas *St* y de los 11 en los cromosomas portadores de la inversión *In(2L)t*, 6 estaban compartidos-. Estos resultados permitieron concluir que, en el caso de no existir mutación recurrente, la existencia de polimorfismos compartidos pueden ser explicados tanto por recombinación o conversión génica entre ordenaciones cromosómicas como por un origen polifilético de las mismas.

4.2.2 ASOCIACION DE POLIMORFISMOS CON ORDENACIONES CROMOSOMICAS

Varios autores han observado la existencia de asociaciones entre polimorfismos, a nivel enzimático, y ordenaciones cromosómicas en poblaciones naturales de *Drosophila*. En *D. subobscura* han sido descritas tanto para el segmento I del cromosoma O (Loukas et al. 1979a, 1980b; Charlesworth et al. 1979; García & Prevosti 1981; Pinsker & Sperlich 1981) como para otras regiones cromosómicas (Zouros et al. 1974; Loukas & Krimbas 1975; Pinsker et al 1978; Cabrera et al. 1983; para una revisión: Zapata & Alvarez 1987).

Se han dado dos tipos de hipótesis para explicar esta asociación entre inversiones cromosómicas y loci situados dentro o muy cerca de las mismas. La hipótesis neutralista -o mecánica- (Mukai et al. 1974; Nei 1975; Sheppard 1975) parte de la base del origen único de las inversiones cromosómicas. Cada nueva inversión presentará un único alelo para cada locus, resultando de ello un desequilibrio entre loci e inversión cromosómica. Este

desequilibrio transitorio se mantendrá durante bastante tiempo (Ishii & Charlesworth 1977; Nei & Li 1980) al ser bajas las tasas de dobles entrecruzamientos, conversión génica y mutación recurrente. La hipótesis seleccionista (Prakash & Lewontin 1968) explica la asociación como consecuencia de la acción de la selección natural. La selección favorecería un conjunto de genes coadaptados dentro de una inversión cromosómica.

En el presente estudio, a nivel del DNA nuclear, también se han observado algunas asociaciones significativas de polimorfismos por substitución nucleotídica con ordenaciones cromosómicas del segmento I del cromosoma O de *D. subobscura*. Si la mayoría de los polimorfismos de la región *rp49* tienen un carácter neutro -lo que sería especialmente de esperar para los polimorfismos localizados fuera de la unidad transcripcional- o casi-neutro, se esperaría que estas asociaciones fuesen debidas principalmente a causas mecánicas.

4.2.3 ORDENACION CROMOSOMICA ANCESTRAL

Bajo la hipótesis neutralista, la variabilidad de la región afectada por una inversión cromosómica, a partir de su origen, se esperaría que aumentase con el tiempo. Teóricamente, si las tasas de los procesos generadores de variabilidad fueran iguales en todas las ordenaciones cromosómicas, los valores de diversidad, tanto nucleotídica como haplotípica, serían proporcionales al tiempo transcurrido desde el origen de las mismas. Si las ordenaciones cromosómicas tuvieran un origen múltiple, también se esperaría una proporcionalidad entre heterocigosidad y el tiempo transcurrido desde el primer origen de la inversión. El efecto de un origen múltiple sería análogo al de la

recombinación entre ordenaciones cromosómicas (esto es, transferencia de información genética entre ordenaciones). Por tanto, la comparación de la variabilidad existente entre distintas ordenaciones cromosómicas puede dar información acerca de la edad relativa de las mismas.

En el caso de las ordenaciones cromosómicas del segmento I del cromosoma O de *D. subobscura* se han expuesto varios argumentos a favor del primitivismo de la ordenación cromosómica O_{3+4} vs. O_{st} . La posición central que ocupa la ordenación O_{3+4} en la filogenia de las ordenaciones cromosómicas con un gran número de ordenaciones derivadas, su distribución prácticamente universal y su presencia en poblaciones antiguas y aisladas como las islas Canarias o de Madeira ha sido un importante argumento a favor del mayor primitivismo de esta ordenación (Prevosti 1971, 1972). Mediante argumentos teóricos, basados en una modificación de la regla de las tríadas de Wallace, Zapata et al. (1982) han expuesto un método para la construcción de filogenias cromosómicas. Mediante este método han propuesto que la ordenación cromosómica O_{3+4} sería más antigua que la ordenación O_{st} . Fontdevila et al. (1983) interpretan que los cambios estacionales encontrados en el desequilibrio gamético entre loci enzimáticos dentro de la ordenación O_{st} apuntan también a favor del primitivismo de la ordenación cromosómica O_{3+4} . Según estos autores la ordenación cromosómica más primitiva (O_{3+4}) poseería un contenido génico principalmente adaptado para unas condiciones climáticas estables mientras que en la ordenación cromosómica derivada (O_{st}) existiría una serie de conjuntos de genes adaptados para diferentes cambios ambientales (estacionales).

También se han expuesto argumentos a favor de una mayor antigüedad de la ordenación O_{st} , en este caso basados en la comparación de variabilidad. Prevosti (1978) y García (1979) detectaron un mayor nivel de variabilidad en los loci *Lap* y *Pept-1* dentro de la ordenación cromosómica O_{st} , comentando que esta ordenación podría ser la primitiva. Posteriormente Prevosti et al. (1983b) concluyen que la asociación de estos marcadores alozímicos con las ordenaciones O_{st} y O_{3+4} podría ser debida a interacciones epistáticas con otros genes y por lo tanto a la acción de la selección natural. En este caso, estos marcadores no serían los idóneos como trazadores de la antigüedad de las inversiones. No obstante, Larruga & Pinsker (1984), al utilizarlos como marcadores y al detectar una mayor variabilidad en la ordenación O_{3+4} , proponen que esta ordenación sería la más antigua.

A nivel del DNA los polimorfismos que no provocan cambio de aminoácido (polimorfismos silenciosos) serían buenos candidatos a ser polimorfismos neutros. En las zonas no codificadoras todas las posiciones son consideradas silenciosas. En las zonas codificadoras únicamente una fracción de las posiciones pueden ser consideradas silenciosas. La estimación de la heterozigosidad por nucleótido mediante el estimador de Nei & Tajima (1981) fué de 0.00304 para la ordenación O_{st} , 0.00561 para O_{3+4} y 0.00229 para O_{3+4+8} (para el "pool" de Barcelona y Ter Apel). Las heterozigosidades de la zona flanqueante 5' (en donde todas las posiciones son silenciosas y generalmente consideradas neutras) fueron de 0.00393 para la ordenación O_{st} , 0.01039 para O_{3+4} y 0.00526 para O_{3+4+8} (para el mismo conjunto de poblaciones). Estos datos sugieren una mayor antigüedad de la ordenación cromosómica O_{3+4} . Como se ha comentado anteriormente, Hudson (comunicación personal) ha propuesto una aproximación para comparar

diferencias de heterozigosidad (mediante el estimador θ). Se comparó en el conjunto de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel el nivel de heterozigosidad de la región 5' de la ordenación cromosómica O_{st} con el de la ordenación cromosómica O_{3+4} ($\theta = 0.00763$ para la ordenación O_{st} y $\theta = 0.01801$ para la ordenación O_{3+4}). El valor de la ji-cuadrado fué de 3.76; para un grado de libertad la probabilidad asociada a este valor es ligeramente superior al 5%. Así pues, las diferencias de las heterozigosidades entre las dos ordenaciones cromosómicas no resultan significativas (al 5%), aunque están en la frontera de la significación.

Existen otros indicios (número de sucesos recombinacionales, número de polimorfismos, número de haplotipos, estimaciones de la diversidad haplotípica) que igualmente sugieren la mayor antigüedad de la ordenación cromosómica O_{3+4} respecto a la ordenación O_{st} . A pesar de existir dependencia en la información proporcionada por los mismos, ésta no es total. Al analizar las poblaciones de Barcelona y Ter Apel en su conjunto, con tamaños muestrales similares para O_{3+4} y O_{st} (44 y 47 respectivamente), se ha detectado un mayor número de sucesos recombinacionales en la ordenación O_{3+4} (6 dentro de O_{3+4} y sólo uno dentro de O_{st}). También se ha detectado un mayor número de posiciones polimórficas por substitución nucleotídica (12 respecto a 8) y por inserción-delección (8 respecto a 5) en la ordenación cromosómica O_{3+4} . Además, 7 de los polimorfismos por substitución nucleotídica que segregan en la ordenación O_{3+4} fueron identificados en más de una línea, mientras que en la ordenación cromosómica O_{st} únicamente 3 polimorfismos se encuentran múltiplemente representados.

El número de haplotipos también fué mayor en la ordenación cromosómica O_{3+4} que en O_{st} , tanto los identificados al considerar los polimorfismos por sustitución nucleotídica (17 respecto a 10), como por inserción-delección (28 respecto a 21), como los identificados al considerar todo tipo de polimorfismo (39 respecto a 35). Los índices de diversidad haplotípica son también mayores en la ordenación O_{3+4} que en O_{st} (0.8647 respecto a 0.6790 para sustitución nucleotídica; 0.9757 respecto a 0.9371 para inserción-delección y 0.9937 respecto a 0.9870 para el total). Además, esta tendencia en los índices de diversidad haplotípica se presenta en todos los casos excepto uno al analizar individualmente las poblaciones de Barcelona y Ter Apel (con tamaños muestrales para O_{3+4} y O_{st} bastante diferentes). A nivel nucleotídico, por lo tanto, todos los datos apuntan a una mayor antigüedad de la ordenación cromosómica O_{3+4} .

Existe algún indicio que sugiere que la ordenación cromosómica O_{3+4+8} sería la de origen más reciente. Sin embargo, debido a que se han analizado pocos cromosomas de esta ordenación es difícil comparar con las otras dos. Para esta comparación el mejor parámetro es la heterozigosidad por nucleótido pues es independiente del tamaño muestral. Como se ha mostrado, las estimas de la heterozigosidad indican que la ordenación cromosómica O_{3+4} sería ancestral a la ordenación O_{3+4+8} . Sin embargo, estas estimas no aclaran qué ordenación, O_{st} u O_{3+4+8} , se ha originado más recientemente (al comparar toda la región *rp49* el menor valor lo presenta la ordenación O_{3+4+8} , y sin embargo al comparar la zona 5' lo presenta la ordenación O_{st}). La indicación que más claramente sugiere que la ordenación O_{3+4+8} podría ser la que se originó más recientemente, es la fuerte asociación de polimorfismos por sustitución nucleotídica con esta ordenación cromosómica.

4.3 VARIABILIDAD EN LA POBLACION DE TENERIFE

Los resultados obtenidos a nivel cromosómico (Prevosti 1971, 1974; Prevosti et al. 1975), a nivel enzimático (Cabrera et al. 1980; Larruga et al. 1983) y a nivel del DNA mitocondrial (Afonso et al. 1990) indican que las poblaciones de *Drosophila subobscura* de las islas Canarias están muy diferenciadas respecto a las poblaciones continentales europeas. Prevosti (1974) y Prevosti et al. (1975) a partir de los datos del polimorfismo cromosómico propusieron que las poblaciones de las islas Canarias estarían geográficamente aisladas del continente (tanto europeo como africano) manteniendo características del período en el cual se establecieron. Los datos del polimorfismo cromosómico (Prevosti 1971) y enzimático (Cabrera et al. 1980), ponen de manifiesto la existencia de una gran homogeneidad entre las islas del archipiélago.

En el presente estudio, a nivel nucleotídico, la población de Tenerife también mostró grandes diferencias al compararse con las 2 poblaciones europeas analizadas (Barcelona y Ter Apel). De los 8 polimorfismos por sustitución nucleotídica identificados en la región *rp49* de la población de Tenerife, 4 resultaron específicos de esta población. Dos de estos polimorfismos, además, se detectaron en más de una línea. En la población de Tenerife, también se identificó una variante de un polimorfismo por inserción-delección multialélico (#10) específica de la población, que estaba representada en 6 líneas.

La frecuencia de varios de los polimorfismos por sustitución nucleotídica identificados en la población de Tenerife difirió significativamente

de la de las poblaciones europeas. Se identificaron 3 polimorfismos cuya frecuencia difería significativamente entre la población de Tenerife y la de Barcelona (de 16 comparaciones), 5 entre Tenerife y Ter Apel (de 17), y 7 entre Tenerife y las poblaciones de Barcelona y Ter Apel agrupadas (de 18). Asimismo, la distribución de haplotipos de la población de Tenerife difiere significativamente de las europeas. Esta diferenciación entre la población de Tenerife y las poblaciones europeas contrasta con la gran homogeneidad existente entre las poblaciones de Barcelona y Ter Apel -tanto al comparar las frecuencias de los polimorfismos por sustitución nucleotídica como la distribución de los haplotipos identificados al considerar únicamente las sustituciones nucleotídicas-. La estimación de las diferencias nucleotídicas netas (δ) entre poblaciones, refleja este patrón de diferenciación: 0.00004 entre Barcelona y Ter Apel, 0.00063 entre Barcelona y Tenerife, y 0.00072 entre Tenerife y Ter Apel.

No obstante, al existir diferencias significativas en el contenido génico de diferentes ordenaciones cromosómicas, esta heterogeneidad entre la población de Tenerife y las europeas podría ser el resultado de una diferenciación entre ordenaciones cromosómicas y no entre estas poblaciones. Por ello, para evitar una diferenciación espúrea, resulta más adecuado efectuar la comparación dentro de ordenación cromosómica. Al comparar la variabilidad de la ordenación cromosómica O_{3+4} (única ordenación identificada para el cromosoma O en la población de Tenerife), también se observaron diferencias significativas entre la población de Tenerife y las de Barcelona y Ter Apel. En efecto, se detectaron diferencias en la frecuencia de 4 polimorfismos por sustitución nucleotídica entre la población de Tenerife y la de Barcelona (de 16 comparaciones efectuadas); 3 entre Tenerife y Ter Apel (de 12); y 4 entre

Tenerife y el conjunto de Barcelona y Ter Apel (de 16). También se observaron diferencias significativas, entre la población de Tenerife y las poblaciones europeas, en la distribución de haplotipos por sustitución nucleotídica. La estimación de las diferencias nucleotídicas netas (δ), al considerar únicamente la ordenación cromosómica O_{3+4} , es coherente con los resultados anteriores: 0.00025 entre Barcelona y Ter Apel, 0.00054 entre Barcelona y Tenerife, y 0.00098 entre Tenerife y Ter Apel.

Se ha estimado que el nivel de heterozigosidad de las poblaciones de Canarias a nivel cromosómico es menor que el de las poblaciones europeas; Larruga et al. (1983) estimaron una heterozigosidad de 0.190 en una población de Tenerife respecto a 0.466 y 0.419 para una población de Jaén y otra de Marruecos respectivamente. A nivel enzimático, sin embargo, apenas existen diferencias: 0.082 en la población de Tenerife vs. 0.112 y 0.083 para Jaén y Marruecos (Larruga et al. 1983). En otro estudio de variabilidad enzimática realizado en las mismas poblaciones por Cabrera et al. (1983) los niveles de heterozigosidad obtenidos fueron: 0.21 en una población de Tenerife vs. 0.21 y 0.20 para Jaén y Marruecos respectivamente.

La heterozigosidad estimada en la región *rp49* en la población de Tenerife, fué más baja que la estimada en Barcelona y Ter Apel ($\pi = 0.00278$ para Tenerife; $\pi = 0.00505$ para Barcelona, $\pi = 0.00412$ para Ter Apel, y $\pi = 0.00454$ para el conjunto de las poblaciones europeas). La diferencia en el nivel de heterozigosidad entre la población de Canarias y las de Europa se acentúa al considerar únicamente la ordenación cromosómica O_{3+4} ($\pi = 0.00278$ en Tenerife; $\pi = 0.00598$ para Barcelona, $\pi = 0.00474$ para Ter Apel, y $\pi = 0.00561$ para el conjunto de las poblaciones europeas). Se

compararon las diferencias de heterozigosidad entre la población de Tenerife y el conjunto de Barcelona y Ter Apel mediante el test que propone Hudson (comunicación personal). Se comparó el nivel de heterozigosidad de la región 5' (región en la que existe una mayor probabilidad de que la variabilidad sea neutra) de la población de Tenerife con el correspondiente al de la ordenación cromosómica O_{3+4} del conjunto de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel ($\theta = 0.01105$ para la población de Tenerife y $\theta = 0.01801$ para el conjunto de Barcelona y Ter Apel). El valor de la ji-cuadrado fué de 3.73; para un grado de libertad la probabilidad asociada a este valor es ligeramente superior al 5%. Aún cuando las heterozigosidades de la población de Tenerife y el conjunto de Barcelona y Ter Apel no llegan a ser estadísticamente diferentes (al nivel del 5%) están muy próximas a serlo.

Bajo la suposición de neutralidad, la heterozigosidad esperada es aproximadamente igual a $4N_e\mu$, siendo N_e el tamaño efectivo poblacional y μ la tasa de mutación por nucleótido hacia alternativas selectivamente neutras. Por lo tanto, si las tasas de mutación son iguales, un aumento del tamaño efectivo ocasionaría un aumento de la heterozigosidad. Si las diferencias de heterozigosidad estimadas entre la población de Tenerife y las europeas fuesen realmente significativas, esto podría indicar un menor tamaño efectivo poblacional en la población insular.

Sorprendentemente, la heterozigosidad nucleotídica estimada en el DNA mitocondrial (Afonso et al. 1990; Rozas et al. 1990) es algo mayor en las poblaciones de las islas Canarias que en las europeas: $\pi = 0.0047$ para Tenerife vs. $\pi = 0.0021$, $\pi = 0.0036$ y $\pi = 0.0042$ para las poblaciones de Marruecos, Barcelona y Alemania, respectivamente. Contrariamente a lo que se

podría esperar, las tasas de evolución del DNA mitocondrial respecto al DNA nuclear son similares en Barcelona y en Tenerife. Este cálculo se realizó mediante la estima de la heterozigosidad de la región codificadora del locus *rp49* de la población de Tenerife ($\pi = 0.00122$) y la del mtDNA estimada por Afonso et al. (1990) en otra población de Tenerife ($\pi = 0.0047$); por lo tanto, la estimación de la tasa de evolución del mtDNA respecto al DNA nuclear es de 3.9 veces, por una tasa de 3.5 obtenida en la población de Barcelona (como se comentó anteriormente, hay que ser cautos con estos valores pues existe un importante error en su estima). Antes de poder explicar satisfactoriamente este diferente patrón de heterozigosidad entre el DNA nuclear y mitocondrial hace falta realizar otros estudios que permitan dilucidar si esta desviación es generalizada o corresponde a un caso particular de las poblaciones analizadas o de la región *rp49*.

Tanto los datos del polimorfismo cromosómico (Prevosti et al. 1974) como los del DNA mitocondrial (Afonso et al. 1990) parecen indicar que las poblaciones de Canarias son bastante antiguas. Los resultados de la región *rp49* también sugieren que las poblaciones insulares no son recientes: a) Existen varios polimorfismos por sustitución nucleotídica específicos de la población (4 de un total de 8), y alguno de ellos identificado en más de un individuo. Sin embargo, en la población de Barcelona sólo existe uno (de un total 12) identificado en una única línea, y 2 en la población de Ter Apel (de un total de 11), detectados cada uno de ellos igualmente en una única línea. b) De los 12 haplotipos por sustitución nucleotídica identificados en la población, 8 son específicos y muestran una tendencia a estar agrupados entre ellos cuando se conectan (figura 13). c) Se han detectado 3 sucesos recombinacionales entre estos haplotipos específicos.

4.4 VARIABILIDAD EN LA POBLACION DE SANTIAGO

D. subobscura era un especie considerada exclusivamente paleártica hasta que en 1978 fué descubierta en Puerto Montt, Chile (Brncic et al. 1981). Posteriormente, en 1982, fué también descrita en Port Townsend, EEUU (Beckenbach & Prevosti 1986). Debido a que en Norte y Sudamérica se han capturado individuos del género *Drosophila* durante varios años, se puede asegurar que la colonización de América por *D. subobscura* es un proceso reciente (posterior a 1975 en Norteamérica y a 1978 en Sudamérica). Tanto en Sudamérica (Chile y parte de Argentina) como en Norteamérica (costa oeste de EEUU) *D. subobscura* se fué extendiendo y asentando establemente en varias localidades, siendo incluso la especie dominante en alguna de ellas (Budnik & Brncic 1982; Prevosti et al 1983a; López 1985; Brncic et al. 1985; para una revisión: Prevosti et al. 1987; Ayala et al. 1989).

Tras un proceso de colonización, debido a que las poblaciones colonizadas se fundan a partir de un número limitado de individuos del área original (efecto fundador), es de esperar un cambio en el patrón de la variabilidad genética de la especie. Por un lado, debido a que en la muestra colonizadora puede no estar representado todo el acervo génico de la especie, es previsible una disminución del número de variantes. Por otro lado, el efecto fundador puede ocasionar un cambio en las frecuencias génicas de las variantes. La magnitud de estas dos consecuencias del efecto fundador está relacionada con el número de individuos colonizadores.

Los datos existentes para el polimorfismo cromosómico (Brncic et al. 1981, 1982; Prevosti et al. 1985, 1988) indican que las poblaciones americanas

colonizadas por *D. subobscura* presentan un nivel considerable de variabilidad. Prevosti et al. (1985, 1988) han observado en una población individual hasta 19 ordenaciones cromosómicas distintas en el conjunto de los 5 cromosomas acrocéntricos de la especie, y hasta 7 en el cromosoma O. Estas 7 ordenaciones del cromosoma O han sido observadas en la población de Santiago de Chile analizada por Prevosti et al (1985).

En el presente estudio, el nivel del polimorfismo cromosómico fué comparable al de otros estudios realizados en poblaciones americanas, y al observado en las poblaciones de Barcelona y Ter Apel. Se han identificado 5 ordenaciones cromosómicas distintas para el cromosoma O (el mismo número que las observadas en Barcelona y Ter Apel), no observándose las ordenaciones O_7 y O_{3+4} identificadas por Prevosti et al. (1985). La ausencia de estas ordenaciones en la muestra no resulta extraña ya que dichas ordenaciones habían sido identificadas a una baja frecuencia (0.5% y 2.1% respectivamente). Los datos del polimorfismo cromosómico del presente estudio, al igual que los obtenidos anteriormente por otros autores, no indican que la población de Santiago (ni la de otras poblaciones americanas) presenten una disminución de variabilidad con respecto a las poblaciones europeas.

Los datos del polimorfismo enzimático de las poblaciones de Sudamérica (Prevosti et al. 1982) y Norteamérica (Balañá 1989) sí que reflejan una disminución de variabilidad. Todos los electromorfos más comunes en Europa están presentes en las poblaciones americanas, faltando la mayoría de los raros. Sólomente dos alelos, Idh^{17} y Odh^{14} de los sistemas aloenzimáticos *Idh* y *Odh* respectivamente, detectados en frecuencias inferiores al 10% en las poblaciones europeas estudiadas por Loukas et al. (1979a), han sido

observados en las poblaciones colonizadas, y con frecuencias más elevadas. Sólo un alelo, *Hk-I*^{0.73} del sistema aloenzimático *Hk-I*, detectado por Loukas et al. (1979a) en frecuencias superiores al 10% no se encuentra en las poblaciones americanas. La ausencia de la mayoría de los alelos poco frecuentes en dichas poblaciones sugiere que el número de colonizadores no fué muy numeroso.

A nivel del DNA mitocondrial los resultados son fundamentalmente análogos. Rozas et al. (1990) en su estudio de varias poblaciones americanas de *D. subobscura* sólo observaron 2 haplotipos de un total de 26 identificados en el Viejo Mundo (Afonso et al. 1990; Rozas et al. 1990). Los 2 haplotipos identificados en las poblaciones americanas corresponden a los haplotipos más comunes de las poblaciones europeas, no detectándose, ninguno de los haplotipos que en Europa segregan a frecuencias inferiores al 10%.

La variabilidad en la región *rp49* de la población de Santiago, presentó un patrón similar al de la variabilidad aloenzimática y del DNA mitocondrial estudiada por Prevosti et al. (1982), Balañá (1989) y Rozas et al. (1990). En la población de Santiago se identificó un menor número de polimorfismos por sustitución nucleotídica: 5 polimorfismos por sustitución nucleotídica respecto a los 12, 11 y 8 de las poblaciones del Viejo Mundo (Barcelona, Ter Apel y Tenerife respectivamente); los polimorfismos nucleotídicos, sin embargo, segregaron con una frecuencia mayor en Santiago que en las poblaciones del Viejo Mundo. A excepción del polimorfismo #27 (con frecuencias del 6% y 11% en Barcelona y Ter Apel respectivamente), los polimorfismos más comunes de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel están presentes en la población de Santiago, faltando los poco frecuentes. En la

población de Santiago, no obstante, se identificó un polimorfismo (#16) no observado en las poblaciones de Barcelona y Ter Apel; esto no indica necesariamente la ausencia del mismo en dichas poblaciones, ya que podría segregarse a baja frecuencia. Este patrón (presencia de los polimorfismos más comunes y ausencia de los poco frecuentes), sin embargo, no se cumplió al comparar las poblaciones de Tenerife y Santiago. Entre estas dos poblaciones existe una gran diferenciación. Esta diferenciación no es más que una ratificación de la información aportada por los datos del polimorfismo cromosómico de que el área de origen de las poblaciones americanas no es el archipiélago canario.

La comparación de los polimorfismos por sustitución nucleotídica que segregaban dentro de una ordenación cromosómica entre la población de Santiago y las poblaciones de Barcelona y Ter Apel apunta esencialmente a la misma tendencia: presencia de los polimorfismos más comunes y ausencia de los poco frecuentes (con la excepción del polimorfismo #16, que segrega en la ordenación O_{11} de la población de Santiago y que no fue detectado en las poblaciones europeas).

La estimación de la heterocigosidad por nucleótido -según el estimador de Hudson (1982)- de la población de Santiago resultó menor a la obtenida en las poblaciones europeas de Barcelona y Ter Apel: $\theta = 0.0039$ para la población de Santiago; $\theta = 0.0101$ para Barcelona; $\theta = 0.0090$ para Ter Apel; y $\theta = 0.0064$ para Tenerife. Como se comentó, este estimador no tiene en cuenta las frecuencias de los polimorfismos aunque sí su número. La menor heterocigosidad de la población de Santiago es por tanto un reflejo del menor número de posiciones polimórficas.

La estimación de la heterozigosidad por nucleótido -según el estimador de Nei & Tajima (1981)- de la población de Santiago resultó, sin embargo, ligeramente mayor a la obtenida en las poblaciones europeas. Este resultado, a priori, puede sorprender ya que generalmente se asocia el efecto fundador con una reducción de variabilidad. Además, a priori sería más sorprendente ya que en las poblaciones de Barcelona y Ter Apel los polimorfismos poco frecuentes dan cuenta de una buena parte de la estima de la heterozigosidad por nucleótido -estimador de Nei & Tajima- (los polimorfismos con una frecuencia inferior al 10% explican aproximadamente la mitad del valor de la heterozigosidad por nucleótido). Sin embargo, el efecto fundador puede afectar a las frecuencias de los polimorfismos. En concreto, la variante más rara de los polimorfismos por sustitución nucleotídica de la población de Santiago segregó a una frecuencia más alta que en las poblaciones europeas, ocasionando como consecuencia el alto índice de heterozigosidad por nucleótido.

Esta frecuencia relativamente alta de las variantes de los polimorfismos por sustitución nucleotídica de la región *rp49* (frecuencias iguales o superiores a un 17%) puede indicar que la colonización fué llevada a cabo por un número de individuos bastante pequeño: a) si la muestra de individuos colonizadores fuese grande, cabría esperar que fuese representativa de la población de origen y por tanto que se presentasen pocos cambios en las frecuencias génicas; b) si las frecuencias actuales fuesen un fiel reflejo de las frecuencias en la muestra colonizadora, y si la muestra de individuos colonizadores fuese grande, cabría esperar que algún polimorfismo presentara alguna variante a baja frecuencia (en principio menor del 17%).

La heterozigosidad nucleotídica en el DNA mitocondrial no sigue el mismo patrón que el observado para la región *rp49*. Rozas et al. (1990), analizando las mismas poblaciones de Barcelona y Santiago, estiman que la heterozigosidad por nucleótido, según Nei & Tajima (1981), es 1.6 veces mayor en la población europea. En el DNA mitocondrial de las poblaciones continentales europeas de *D. subobscura* se detecta un único polimorfismo por sustitución nucleotídica con una alta frecuencia (oscilando del 30% al 70%) y de uno a cuatro polimorfismos a frecuencias muy bajas (Afonso et al. 1990). Estos polimorfismos raros no se encuentran en las poblaciones americanas, mientras que el polimorfismo que segregaba con una alta frecuencia en las poblaciones europeas está presente en las poblaciones colonizadas con una frecuencia similar.

Los datos más informativos en el estudio de esta población del área colonizada provienen del análisis de la distribución de haplotipos. Al comparar el número de haplotipos identificados -al considerar tanto las sustituciones nucleotídicas como las inserciones/delecciones como ambos tipos de polimorfismo- en la población de Santiago con los encontrados en Barcelona, Ter Apel y Tenerife se observó una gran disminución de la variabilidad. En la población sudamericana se detectaron 4 haplotipos al considerar las sustituciones nucleotídicas respecto a los 17, 15 y 12 de las poblaciones de Barcelona, Ter Apel y Tenerife; 7 haplotipos al considerar las inserciones-delecciones por los 23, 28 y 17 de las poblaciones de Barcelona, Ter Apel y Tenerife; y 8 haplotipos al considerar ambos tipos de polimorfismo en contraste con los 36, 43 y 23 de las poblaciones de Barcelona, Ter Apel y Tenerife. Esta disminución del número de haplotipos se observa asimismo para cada una de las 3 ordenaciones cromosómicas.

Todos los haplotipos (al considerar tanto las sustituciones nucleotídicas como las inserciones/delecciones) de la población de Santiago mostraron una frecuencia elevada excepto el §§§10 y el §§§40 (tabla 38). Cada uno de estos últimos haplotipos se identificó en sólo una de las líneas estudiadas, mientras que el resto de los haplotipos fueron observados en un mínimo de 6. Estos 2 haplotipos poco frecuentes, que difieren de otro de los haplotipos identificados en el mismo grupo cromosómico en tan sólo un polimorfismo por inserción-delección, pueden haberse generado en el área colonizada por delecciones de DNA. Así, el haplotipo §§§10 (tabla 38) difiere del §§§62 (ambos en la ordenación cromosómica O_{3+4+8}) únicamente para el polimorfismo #20 (delección de unos 5 pb). De forma similar el haplotipo §§§40 difiere del §§§18 (en la ordenación cromosómica O_{3+4}) únicamente para el polimorfismo #3 (delección de unos 3 pb). Debido a la supuesta alta tasa de generación de inserciones-delecciones de pequeño tamaño por "misspairing", pero también a la baja frecuencia de los citados haplotipos y a su relación con otros haplotipos frecuentes en la misma ordenación cromosómica, no parece probable, aunque no pueda descartarse, que los haplotipos §§§10 y §§§40 formaran parte de la muestra que colonizó el continente americano.

Si realmente estos 2 haplotipos se generaron en el área colonizada, serían 6 los haplotipos diferentes encontrados en Chile procedentes del área original. El alto nivel de desequilibrio de ligamiento detectado en esta población puede ser una indicación de la ausencia entre estos haplotipos de alguno generado por recombinación en el área colonizada. Como ya se ha comentado, el número de ordenaciones cromosómicas distintas para el cromosoma O que se ha identificado en el continente americano ha sido de 7 (Prevosti et al. 1987, 1988). De estas 7, la ordenación cromosómica O_7

-observada sólo en algunas poblaciones y en muy bajas frecuencias- se cree que pudo originarse por recombinación a partir de la ordenación cromosómica O_{3+4+7} , por lo que sería 6 el número total de ordenaciones cromosómicas distintas para el cromosoma O. Por lo tanto, debido a que el cromosoma O de las poblaciones americanas es el que presenta más ordenaciones cromosómicas distintas, todas las ordenaciones observadas en las poblaciones americanas de *D. subobscura*, podrían estar presentes en una muestra de 6 cromosomas (número mínimo de cromosomas que tuvieron que llegar al continente americano). Los datos obtenidos del análisis de la variabilidad a otros niveles son compatibles con este número mínimo de cromosomas -a nivel aloenzimático Prevosti et al. (1982) y Balañá (1989) encontraron un máximo de 3 variantes en los sistemas enzimáticos estudiados y Latorre et al. (1986) y Rozas et al. (1990) sólo encuentran 2 haplotipos distintos para el DNA mitocondrial.

Sorprendentemente el número de haplotipos identificados (6) -al considerar todo tipo de polimorfismo- coincide con el número de ordenaciones cromosómicas observadas en el continente americano. Además, la distribución de estos haplotipos entre los 3 grupos cromosómicos considerados, debido a la localización del locus *rp49*, es la que se esperaría si hubiera sido 6 el número de cromosomas aportados por los individuos colonizadores: se identificaron 2 haplotipos en el grupo O_{st} -en el cual se han identificado 2 ordenaciones cromosómicas, la O_{st} y la O_{5^-} , 1 en el grupo O_{3+4+8} -donde sólo se ha observado la ordenación O_{3+4+8^-} y 3 en el grupo O_{3+4} -en el cual se han detectado 3 ordenaciones, la O_{3+4} , la O_{3+4+2} y la O_{3+4+7^-} .

Si la muestra de individuos que colonizaron el continente americano hubiese contenido más de un cromosoma portador de la misma ordenación y éstos se hubiesen perpetuado hasta la actualidad, sería necesario que en la muestra colonizadora un mismo haplotipo estuviera presente más de una vez dentro de uno de los 3 grupos cromosómicos. Sin embargo, la probabilidad de este suceso es bastante baja ya que la diversidad haplotípica parece ser muy alta en las poblaciones continentales europeas. En efecto, en las poblaciones de Barcelona y Ter Apel se detectaron 70 haplotipos distintos entre las 103 líneas analizadas hallándose el haplotipo más frecuente sólo en 6 individuos. En estas poblaciones se observa una menor diversidad en la ordenación O_{3+4+8} para el número de haplotipos: en la ordenación O_{st} , para la que se analizaron 47 cromosomas, se identificaron 35 haplotipos, el más frecuente observado en 3 individuos; en la ordenación O_{3+4} , con 44 cromosomas analizados, se observaron 39 haplotipos, siendo de 3 la frecuencia máxima; mientras que en la ordenación O_{3+4+8} , con 16 cromosomas analizados, se identificaron 9 haplotipos, el más frecuente de ellos observado en 4 individuos.

La probabilidad de que 2 cromosomas tomados al azar presenten el mismo haplotipo es $1 - h$, siendo h el índice de diversidad haplotípica de Nei & Tajima (1981). Esta probabilidad, para cada uno de los tres grupos cromosómicos y para el total poblacional, del conjunto de las poblaciones de Barcelona y Ter Apel es la siguiente:

$$O_{st} = 0.0130$$

$$O_{3+4} = 0.0063$$

$$O_{3+4+8} = 0.0917$$

$$\text{Total} = 0.0126$$

Así pues, si la distribución haplotípica de Barcelona y Ter Apel fuese representativa del área de origen de los individuos colonizadores, es poco probable que el mismo haplotipo estuviera representado dos veces en la muestra colonizadora; aunque para la ordenación cromosómica O_{3+4+8} la probabilidad es de un 9.17%.

La variabilidad existente en la actualidad en las poblaciones americanas puede representar toda la variabilidad que llegó con la muestra colonizadora o bien una fracción de la misma. En efecto, si todos los cromosomas que llegaron con la muestra original tuviesen descendientes por réplica en las poblaciones actuales y debido al carácter diploide de la especie, esperaríamos encontrar entre los cromosomas actuales los descendientes de un número par de cromosomas. En cambio si los cromosomas que se hallan en la actualidad son descendientes por réplica únicamente de una fracción de los cromosomas originales, se podrían encontrar los descendientes de un número par o impar de cromosomas.

Bajo la primera alternativa la hipótesis más probable es que la muestra colonizadora consistiera en 6 cromosomas. Esto es debido a que el raro caso de que un mismo haplotipo estuviera representado dos veces en la muestra colonizadora, tendría que haber sucedido 2 veces, -suceso muy poco probable-. En el caso de que realmente fuese 6 el número de cromosomas, se podría especular -debido a que únicamente se han detectado 2 haplotipos para el DNA mitocondrial (Latorre et al. 1986; Rozas et al. 1990)- que la muestra de individuos que colonizó América estaría formada por 2 hembras fecundadas por un único macho.

Bajo la alternativa de que la muestra colonizadora original comprendiese más individuos pero que únicamente hayan subsistido los descendientes por réplica de una fracción de los cromosomas originales, la hipótesis más probable también sería que el número de cromosomas fuese 6. Sin embargo, a diferencia del caso anterior, no sería tan improbable que el número de cromosomas fuese 7. En este caso, la ordenación cromosómica que con más probabilidad podría haber estado representada 2 veces en la muestra portando el mismo haplotipo para la región *rp49* sería la O_{3+4+8} .

No obstante, en la actualidad no se conoce el área de origen de los individuos colonizadores. Podría suceder que en dicha área hubiera una baja diversidad haplotípica (y por lo tanto una mayor probabilidad de que la muestra colonizadora comprendiese un número mayor de cromosomas). Esta hipótesis parece poco probable, ya que si las dos poblaciones europeas estudiadas (Barcelona y Ter Apel) -separadas entre sí por 1300 km y por la barrera geográfica de los Pirineos- son homogéneas, parecería probable que lo fueran también la mayoría de las poblaciones continentales europeas. Alternativamente, los individuos colonizadores podrían ser originarios de alguna región aislada (por ejemplo una población insular), donde, al igual que la población de Tenerife, es probable que exista una disminución de variabilidad con respecto al continente. Si fuera este el caso, aumentaría la probabilidad de que la muestra colonizadora comprendiese un número de cromosomas mayor. Para poder conocer con más exactitud el número de cromosomas originales, es necesario, o bien conocer la población de origen de los individuos colonizadores o bien aumentar el tamaño de la región nucleotídica objeto de estudio (ya que aumentará el índice de diversidad haplotípica y por lo tanto disminuiría la probabilidad de equivocarse al

descartar que el mismo haplotipo estuviese representado más de una vez en la muestra colonizadora).

Esta estimación del número de colonizadores a partir del polimorfismo nucleotídico es menor que la propuesta por otros autores a partir de la información que proporciona el polimorfismo cromosómico. Brncic et al. (1981) consideraron que el número de colonizadores más probable se situaría entre 10 y 15 individuos. Para esta estimación se consideró el este de la Península Ibérica como área de origen de los individuos colonizadores, debido a la supuesta presencia de la ordenación cromosómica O_{22} en las poblaciones chilenas. Posteriormente, tras detectarse que hubo una confusión en la identificación de dicha ordenación que en realidad era la O_5 (Prevosti et al. 1985), se hizo improbable aquel origen de la población colonizadora y por lo tanto, aquella estimación. En otro estudio, Mestres et al. (1990) a partir de la frecuencia de la ordenación cromosómica O_5 en las poblaciones paleárticas, consideran que el número de individuos colonizadores estaría comprendido entre 9 y 149.



CONCLUSIONES

1. En las cuatro poblaciones estudiadas se han detectado 19 polimorfismos por sustitución nucleotídica y 8 por inserción-delección. En estas poblaciones se han identificado 34 haplotipos al considerar las sustituciones nucleotídicas, 55 al considerar las inserciones-delecciones y 96 al considerar ambos tipos de polimorfismo.
2. La variabilidad nucleotídica estimada para la región *rp49* de *D. subobscura* en las poblaciones europeas ($\pi = 0.0045$), es comparable a la de *D. melanogaster* y *D. ananassae*, y menor a la de *D. simulans* y *D. pseudoobscura* estimada para otras regiones del genoma.
3. Para la región *rp49* no se ha detectado heterogeneidad entre las dos poblaciones europeas para ninguna de las 3 ordenaciones cromosómicas consideradas.
4. En las poblaciones europeas se han detectado asociaciones de polimorfismos por sustitución nucleotídica con diferentes ordenaciones cromosómicas, indicando una cierta diferenciación de las ordenaciones cromosómicas.
5. La ausencia general de desequilibrios de ligamiento significativos entre posiciones nucleotídicas dentro de una misma ordenación cromosómica indica la importancia de la recombinación en la evolución de la región *rp49*.
6. En las poblaciones europeas se han detectado varios polimorfismos por sustitución nucleotídica compartidos entre varias ordenaciones

- cromosómicas, evidenciando la existencia de un importante intercambio genético entre ordenaciones cromosómicas.
7. La comparación de las estimas de variabilidad nucleotídica (tanto de diversidad haplotípica como de heterozigosidad por nucleótido) sugieren que la ordenación cromosómica O_{3+4} es ancestral respecto a la ordenación O_{st} .
 8. La comparación de las frecuencias de los polimorfismos por sustitución nucleotídica y de la distribución haplotípica indica una diferenciación de la población de Tenerife respecto a las europeas.
 9. El análisis de los polimorfismos y haplotipos específicos así como la conexión entre haplotipos, apoyan la idea de la antigüedad de las poblaciones canarias.
 10. De acuerdo con las expectativas de un efecto fundador, la población de Santiago de Chile presentó una reducción del número polimorfismos y en especial del de haplotipos.
 11. Aún cuando la heterozigosidad nucleotídica estimada para la población de Santiago ($\pi = 0.0056$) fué similar a la estimada en las poblaciones europeas, esta observación no contradice la existencia de un efecto fundador, ya que la variante más rara de los polimorfismos por sustitución nucleotídica segregó en dicha población a una frecuencia mayor que en las otras poblaciones europeas analizadas.

12. El número de los haplotipos identificados para la región *rp49* de Santiago de Chile indica que los haplotipos que se hallan en la actualidad son descendientes por réplica de únicamente 6 a 8 cromosomas.

BIBLIOGRAFIA

- AFONSO, J. M., VOLTZ, A., HERNANDEZ, M., RUTTKAY, H., GONZALEZ, A. M., LARRUGA, J. M., CABRERA, V. M. & SPERLICH, D. 1990. "Mitochondrial DNA variation and genetic structure in Old-World populations of *Drosophila subobscura*". Mol. Biol. Evol. (en prensa).
- AGUADE, M. 1987. "Four-cutter analysis: a powerful tool in population genetics". Génét. Ibér. **39**, 199-210.
- AGUADE, M. 1988a. "Nucleotide sequence comparison of the *rp49* gene region between *Drosophila subobscura* and *D. melanogaster*". Mol. Biol. Evol. **5**, 433-441.
- AGUADE, M. 1988b. "Restriction map variation at the *Adh* locus of *Drosophila melanogaster*. in inverted and noninverted chromosomes". Genetics **119**, 135-140.
- AGUADE, M., MIYASHITA, N. & LANGLEY, C. H. 1989a. "Reduced variation in the *yellow-achaete-scute* region in natural populations of *Drosophila melanogaster*". Genetics **122**, 607-615.
- AGUADE, M., MIYASHITA, N. & LANGLEY, C. H. 1989b. "Restriction-map variation at the *zeste-tko* region in natural populations of *Drosophila melanogaster*". Mol. Biol. Evol. **6**, 123-130.
- ANTONARAKIS, S. E., BOEHM, C. D., GIARDINA, P. J. V. & KAZAZIAN JR., H. H. 1982a. "Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the β -globin gene cluster". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 137-141.
- ANTONARAKIS, S. E., ORKIN, S. H., KAZAZIAN, H. H., GOFF, S. C., BOEHM, C. D., WABER, P. G., SEXTON, J. P., OSTRER, H., FAIRBANKS, V. F. & CHAKRAVARTI, A. 1982b. "Evidence for multiple origins of the β^E -globin gene in Southeast Asia". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 6608-6611.
- AQUADRO, C. F. & GREENBERG, B. D. 1983. "Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals". Genetics **103**, 287-312.

- AQUADRO, C. F., DESSE, S. F., BLAND, M. M., LANGLEY, C. H. & LAURIE-AHLBERG, C. C. 1986. "Molecular population genetics of the alcohol dehydrogenase gene region of *Drosophila melanogaster*". *Genetics* **114**, 1165-1190.
- AQUADRO, C. F., LADO, K. M. & NOON, W. A. 1988. "The *rosy* region of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. I. Contrasting levels of naturally occurring DNA restriction map variation and divergence". *Genetics* **119**, 875-888.
- AVISE, J. C., LANSMAN, R. A. & SHADE, R. O. 1979a. "The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*". *Genetics* **92**, 279-295.
- AVISE, J. C., GIBLIN-DAVIDSON, C., LAERM, J., PATTON J. C. & LANSMAN, R. A. 1979b. "Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6694-6698.
- AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E., REEB, C. A. & SAUNDERS, N. C. 1987. "Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics". *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 489-522.
- AYALA, F. J. 1965. "Evolution of fitness in experimental populations of *Drosophila serrata*". *Science* **150**, 903-905.
- AYALA, F. J. 1972. "Darwinian versus non-Darwinian evolution in natural populations of *Drosophila*", en *Proc. 6th Berkeley Symp. Math. Stat. Prob.*, **5**, 211-236. "Darwinian, Neo-Darwinian, and Non-Darwinian evolution", editado por LE CAM, L. M., NEYMAN, J. y SCOTT, E. L. University of California press, Berkeley.
- AYALA, F. J., SERRA, L. & PREVOSTI, A. 1989. "A grand experiment in evolution: the *Drosophila subobscura* colonization of the Americas". *Genome* **31**, 246-255.

- BABA-AÏSSA, F. & SOLIGNAC, M. 1984. "La plupart des populations de *Drosophila simulans* ont probablement pour ancêtre une femelle unique dans un passé récent". C. R. Acad. Sc. Paris, t. 299, Série III 8, 289-292.
- BALANÑA, J. 1989. "Estudi de l'associació entre els polimorfismes cromosòmic i enzimàtic en poblacions nord-americanes de *Drosophila subobscura*". Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- BECKENBACH, A. T. 1984. "Genetics of a colonizing species, *Drosophila ambigua*, in North America". Genetics 107, s9.
- BECKENBACH, A. T. & PREVOSTI, A. 1986. "Colonization of North America by the European species, *Drosophila subobscura* and *D. ambigua*". The American Midland Naturalist 115, 10-18.
- BEECH, R. N. & LEIGH BROWN, A. J. 1989. "Insertion-deletion variation at the *yellow-achaete-scute* region in two natural populations of *Drosophila melanogaster*". Genet. Res., Camb. 53, 7-15.
- BEGON, M. 1976. "Dispersal, density and microdistribution in *Drosophila subobscura* Collin". J. Anim. Ecol. 45, 441-456.
- BENDER, W., SPIERER, P. & HOGNESS, D. S. 1983. "Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*". J. Mol. Biol. 168, 17-33.
- BERNSTEIN, N. & GOLDSCHMIDT, E. 1961. "Chromosome breakage in structural heterozygotes". Amer. Nat. 95, 53-56.
- BERNSTEIN, S. C., THROCKMORTON, L. H. & HUBBY, J. L. 1973. "Still more genetic variability in natural populations". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3928-3931.
- BIGGIN, M. D., GIBSON, T. J. & HONG, G. F. 1983. "Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965.

- BIRLEY, A. J. 1984. "Restriction endonuclease map variation and gene activity in the *Adh* region in a population of *Drosophila melanogaster*". *Heredity* **52**, 103-112.
- BLACKMAN, R. K. & MESELSON, M. 1986. "Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila hsp82* gene". *J. Mol. Biol.* **188**, 499-515.
- BODMER, M. & ASHBURNER, M. 1984. "Conservation and change in the DNA sequences coding for alcohol dehydrogenase in sibling species of *Drosophila*". *Nature* **309**, 425-429.
- BONNER, T. I., BRENNER, D. J., NEUFELD, B. R. & BRITTEN, R. J. 1973. "Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence". *J. Mol. Biol.* **81**, 123-135.
- BRNCIC, D., PREVOSTI, A., BUDNIK, M., MONCLUS, M. & OCAÑA, J. 1981. "Colonization of *Drosophila subobscura* in Chile I. First population and cytogenetic studies". *Genetica* **56**, 3-9.
- BRNCIC, D., BUDNIK, M. & PREVOSTI, A. 1982. "Ordenaciones cromosómicas en las poblaciones chilenas de *Drosophila subobscura*". *Medio Ambiente Vol* **6**, 23-32.
- BRNCIC, D., BUDNIK, M. & GUIÑEZ, R. 1985. "An analysis of a Drosophilidae community in Central Chile during a three years period". *Z. F. Zool. Systematik u. Evolutionsforschung* **23**, 90-100.
- BROWN, A. H. D. 1975. "Sample sizes required to detect linkage disequilibrium between two or three loci". *Theor. Pop. Biol.* **8**, 184-201.
- BROWN, G. G. & SIMPSON, M. V. 1981. "Intra- and interspecific variation of the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships". *Genetics* **97**, 125-143.
- BROWN, W. M. & VINOGRAD, J. 1974. "Restriction endonuclease cleavage maps

- of animal mitochondrial DNAs". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 4617-4621.
- BROWN, W. M. & WRIGHT, J. W. 1979. "Mitochondrial DNA analysis and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (Genus *Cnemidophorus*)". Science **203**, 1247-1249.
- BROWN, W. M., GEORGE JR, M. & WILSON, A. C. 1979. "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 1967-1971.
- BROWN, W. M. 1980. "Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 3605-3609.
- BROWN, W. M., PRAGER E. M., WANG, A. & WILSON, A. C. 1982. "Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution". J. Mol. Evol. **18**, 225-239.
- BROWN, W. M. 1985. "The mitochondrial genome of animals", 95-130, en "Molecular Evolutionary Genetics". Editado por R. J. MacIntyre. Plenum Press, New York.
- BUDNIK, M. & BRNCIC, D. 1982. "Colonizacion de *Drosophila subobscura* Collin en Chile". Actas V Congr. Latinoam. Genética, 177-188.
- BUZZO, K., FOUTS, D. L. & WOLSTENHOLME, D. R. 1978. "EcoRI cleavage site variants of mitochondrial DNA molecules from rats". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 909-913.
- CABRERA, V. M., GONZALEZ, A. M. & GULLON, A. 1980. "Enzymatic polymorphism in *Drosophila subobscura* populations from the Canary islands". Evolution **34**, 875-887.
- CABRERA, V. M., GONZALEZ, A. M., LARRUGA, J. M. & VEGA, C. 1983. "Linkage disequilibrium in chromosome A of *Drosophila subobscura*". Genetica **61**, 3-8.

- CACCONE, A., AMATO, G. D. & POWELL, J. R. 1988. "Rates and patterns of scnDNA and mtDNA divergence within the *Drosophila melanogaster* subgroup". *Genetics* **118**, 671-683.
- CHARLESWORTH, B., CHARLESWORTH, D. & LOUKAS, M. 1979. "A study of linkage disequilibrium in British populations of *Drosophila subobscura*, with an Appendix by K. Morgan". *Genetics* **92**, 983-994.
- CHOVNICK, A. 1973. "Gene conversion and transfer of genetic information within the inverted region of inversion heterozygotes". *Genetics* **75**, 123-131.
- CHURCH, G. M. & GILBERT, W. 1984. "Genomic sequencing". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
- CLARY, D. O., WAHLEITHNER, J. A. & WOLSTENHOLME, D. R. 1984. "Sequence and arrangement of the genes for cytochrome *b*, URF1, URF4L, URF4, URF5, URF6 and five tRNAs in *Drosophila* mitochondrial DNA". *Nucleic Acids Res.* **12**, 3747-3762.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y. & HSU, L. 1972. "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110- 2114.
- COHN, V. H., THOMPSON, M. A. & MOORE, G. P. 1984. "Nucleotide sequence comparison of the *Adh* gene in three *Drosophilids*". *J. Mol. Evol.* **20**, 31-37.
- COHN, V. H. & MOORE, G. P. 1988. "Organization and evolution of the Alcohol Dehydrogenase gene in *Drosophila*". *Mol. Biol. Evol.* **5**, 154-166.
- CONSTANTI, M., PASCUAL, M., RIBO, G. & PREVOSTI, A. 1986. "Sexual isolation between populations of *Drosophila subobscura* I. European strains". *Genét. Ibér.* **38**, 213-221.
- COOKE, P. H. & OAKESHOTT, J. G. 1989. "Amino acid polymorphisms for esterase-6 in *Drosophila melanogaster*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1426-1430.

- COYNE, J. A. & KREITMAN, M. 1986. "Evolutionary genetics of two sibling species, *Drosophila simulans* and *D. sechellia*". *Evolution* **40**, 673-691.
- CROSS, S. R. H. & BIRLEY, A. J. 1986. "Restriction endonuclease map variation in the *Adh* region in populations of *Drosophila melanogaster*". *Biochem. Genet.* **24**, 415-433.
- DAYHOFF, M. O. 1972. en "Atlas of protein sequence and structure". National Biomedical Research Foundation. Washington, D.C.
- DE FRUTOS, R. & LATORRE, A. 1982. "Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. I. J and U chromosomes". *Genetica* **58**, 177-188.
- DE FRUTOS, R., LATORRE, A. & PASCUAL, L. 1987. "Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. IV. Position effect at the boundaries of the E₁₂ inversion". *Genetica* **75**, 11-22.
- DENARO, M., BLANC, H., JOHNSON, M. J., CHEN, K. H., WILMSEN, E., CAVALLI-SFORZA, L. L. & WALLACE, D. C. 1981. "Ethnic variation in *Hpa*I endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5768-5772.
- EANES, W. F., AJIOKA, J. W., HEY, J. & WESLEY C. 1989a. "Restriction-map variation associated with the *G6PD* polymorphism in natural populations of *Drosophila melanogaster*". *Mol. Biol. Evol.* **6**, 384-398.
- EANES, W. F., LABATE, J. & AJIOKA, J. W. 1989b. "Restriction-map variation with the *yellow-achaete-scute* region in five populations of *Drosophila melanogaster*". *Mol. Biol. Evol.* **6**, 492-502.
- ENGELS, W. R. 1981. "Estimating genetic divergence and genetic variability with restriction endonucleases". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6329-6333.
- ENGELS, W. R. & PRESTON, C. R. 1984. "Formation of chromosome rearrangements by *P* factors in *Drosophila*". *Genetics* **107**, 657-678.

- FAURON, C. M. R. & WOLSTENHOLME, D. R. 1980. "Intraspecific diversity of nucleotide sequences within the adenine + thymine-rich region of mitochondrial DNA molecules of *Drosophila mauritiana*, *Drosophila melanogaster*. and *Drosophila simulans*". Nucleic Acids Res. **8**, 5391-5410.
- FENERJIAN, M. G., MARTINEZ-CRUZADO, J. C., SWIMMER, C., KING, D. & KAFATOS, F. C. 1989. "Evolution of the autosomal chorion cluster in *Drosophila*. II. Chorion gene expression and sequence comparisons of the *s16* and *s19* genes in evolutionarily distant species". J. Mol. Evol. **29**, 108-125.
- FERRIS, S. D., WILSON A. C. & BROWN, W. M. 1981a. "Evolutionary tree for apes and humans based on cleavage maps of mitochondrial DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 2432-2436.
- FERRIS, S. D., BROWN, W. M., DAVIDSON, W. S. & WILSON, A. C. 1981b. "Extensive polymorphism in the mitochondrial DNA of apes". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 6319-6323.
- FISHER, R. A. 1930. "The genetic theory of natural selection". Dover, New York.
- FLETCHER, T. S., AYALA, F. J., THATCHER, D. R. & CHAMBERS, G. K. 1978. "Structural analysis of the ADH^s electromorph of *Drosophila melanogaster*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 5609-5612.
- FONTDEVILA, A., ZAPATA, C., ALVAREZ, G., SANCHEZ, L., MENDEZ, 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.
- GARBE, J. C., BENDENA, W. G. & PARDUE, M. L. 1989. "Sequence evolution of the *Drosophila* Heat shock locus *hsw*. I. The nonrepeated portion of the gene". Genetics **122**, 403-415.
- GARCIA, M. P. 1979. "Desequilibrio en el ligamiento en aloenzimas y ordenaciones del cromosoma O de *Drosophila subobscura*". Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

- GARCIA, M. P. & PREVOSTI, A. 1981. "Association between allozyme alleles and chromosomal arrangements of the O chromosome in *Drosophila subobscura*. I Data of natural populations". Genét. Ibér. 33, 151-174.
- GODDARD, J. M., MASTERS, J. N., JONES, S. S., ASHWORTH, W. D. & WOLSTENHOLME, D. R. 1981. "Nucleotide sequence variants of *Rattus norvegicus* mitochondrial DNA". Chromosoma 82, 595-609.
- GOLDING, G. B., AQUADRO, C. F. & LANGLEY, C. H. 1986. "Sequence evolution within populations under multiple types of mutation". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 427-431.
- GREENBERG, B. D., NEWBOLD, J. E. & SUGINO, A. 1983. "Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA". Gene 21, 33-49.
- HARRIS, H. 1966. "Enzyme polymorphisms in man". Proc. Royal Soc. Lond. (B) 164, 298-310.
- HEDRICK, P. W. 1985. "Genetics of populations". Jones and Bartlett publishers, Inc. Boston.
- HELLING, R. B., GOODMAN, H. M. & BOYER, H. W. 1974. "Analysis of endonuclease R-*EcoRI* fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis". J. Virol. 14, 1235-1244.
- HIGGS, D. R., GOODBOURN, S. E. Y., WAINSCOAT, J. S., CLEGG, J. B. & WEATHERALL, D. J. 1981. "Highly variable regions of DNA flank the human α -globin genes". Nucleic Acids Res. 9, 4213-4224.
- HILL, W. G. & ROBERTSON, A. 1968. "Linkage disequilibrium in finite populations". Theor. Appl. Genet. 38, 226-231.
- HOLMES, D. S. & QUIGLEY, M. 1981. "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids". Anal. Biochem. 114, 193-197.
- HOYER, B. H., McCARTHY, B. J. & BOLTON, E. T. 1964. "A molecular approach

in the systematics of higher organisms". *Science* **144**, 959-967.

- HUBBY, J. L. & LEWONTIN, R. C. 1966. "A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*". *Genetics* **54**, 577-594.
- HUDSON, R. R. 1982. "Estimating genetic variability with restriction endonucleases". *Genetics* **100**, 711-719.
- HUDSON, R. R. & KAPLAN, N. L. 1985. "Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences". *Genetics* **111**, 147-164.
- HUDSON, R. R., KREITMAN, M. & AGUADE, M. 1987. "A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data". *Genetics* **116**, 153-159.
- ISHII, K. & CHARLESWORTH, B. 1977. "Associations between allozyme loci and gene arrangements due to hitch-hiking effects of new inversions". *Genet. Res.* **30**, 93-106.
- JEFFREYS, A. J. 1979. "DNA sequence variants in the α - τ -, β - τ -, δ - and β -globin genes of man". *Cell* **18**, 1-10.
- JIANG, C., GIBSON, J. B., WILKS, A. V. & FREETH A. L. 1988. "Restriction endonuclease variation in the region of the alcohol dehydrogenase gene: a comparison of null and normal alleles from natural populations of *Drosophila melanogaster*". *Heredity* **60**, 101-107.
- KAFATOS, F. C., EFSTRATIADIS, A., FORGET, B. G. & WEISSMAN, S. M. 1977. "Molecular evolution of human and rabbit β -globin mRNAs". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5618-5622.
- KAN, Y. W. & DOZY, A. M. 1978. "Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: Relationship to sickle mutation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5631-5635.
- KIMURA, M. 1968. "Evolutionary rate at the molecular level". *Nature* **217**, 624-626.

- KIMURA, M. 1977. "Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution". *Nature* **267**, 275-276.
- KIMURA, M. 1979. "Model of effectively neutral mutations in which selective constraint is incorporated". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3440-3444.
- KIMURA, M. 1983. "The neutral theory of molecular evolution". Cambridge University Press, Cambridge.
- KING, J. L. & OHTA, T. 1975. "Polyallelic mutational equilibria". *Genetics* **79**: 681-691.
- KOHONEN-CORISH, M., LOKKI, J., SAURA, A. & SPERLICH, D. 1985. "The genetic load in a northern marginal population of *Drosophila subobscura*". *Hereditas* **102**, 255-258.
- KONGSUWAN, K., YU, Q., VINCENT, A., FRISARDI, M. C., ROSBASH, M., LENGYEL, J. A. & MERRIAM, J. 1985. "A *Drosophila Minute* gene encodes a ribosomal protein". *Nature* **317**, 555-558.
- KREITMAN, M. 1983. "Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*". *Nature* **304**, 412-417.
- KREITMAN, M. & AGUADE, M. 1986a. "Genetic uniformity in two populations of *Drosophila melanogaster* as revealed by filter hybridization of four-nucleotide-recognizing restriction enzyme digests". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3562-3566.
- KREITMAN, M. & AGUADE, M. 1986b. "Excess polymorphism at the *Adh* locus in *Drosophila melanogaster*". *Genetics* **114**, 93-110.
- KRIMBAS, C. B. & LOUKAS, M. 1980. "The inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*". *Evolutionary Biology* **12**, 163-234.
- KUNZE-MÜHL, E. & MÜLLER, E. 1958. "Weitere untersuchungen über die chromosomale struktur und die natürlichen strukturtypen von *Drosophila subobscura* Coll". *Chromosoma (Berl.)* **9**, 559-570.

- LAIRD, C. D., McCONAUGHY, B. L. & McCARTHY, B. J. 1969. "Rate of fixation of nucleotide substitutions in evolution". *Nature* **224**, 149-154.
- LAKOVAARA, S. & SAURA, A. 1971. "Genic variation in marginal populations of *Drosophila subobscura*". *Hereditas* **69**, 77-82.
- LANGLEY, C. H., MONTGOMERY, E. & QUATTLEBAUM, W. F. 1982. "Restriction map variation in the *Adh* region of *Drosophila*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5631-5635.
- LANGLEY, C. H. & AQUADRO, C. F. 1987. "Restriction-map variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*: *White*-locus region". *Mol. Biol. Evol.* **4**, 651-663.
- LANGLEY, C. H., SHRIMPTON, A. E., YAMAZAKI, T., MIYASHITA, N., MATSUO, Y. & AQUADRO, C. F. 1988. "Naturally occurring variation in the restriction map of the *Amy* region of *Drosophila melanogaster*". *Genetics* **119**, 619-629.
- LARRUGA, J. M., CABRERA, V. M. GONZALEZ, A. M. & GULLON, A. 1983. "Molecular and chromosomal polymorphism in continental and insular populations from the southwestern range of *Drosophila subobscura*". *Genetica* **60**, 191-205.
- LARRUGA, J. M. & PINSKER, W. 1984. "The importance of geographic isolation, structural rearrangement and speciation for the genetic divergence of chromosome O in *Drosophila subobscura*, *Drosophila guanche*, and *Drosophila madeirensis*". *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.* **22**, 103-113.
- LATORRE, A., MOYA, A. & AYALA, F. J. 1986. "Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8649-8653.
- LATORRE, A., BARRIO, E., MOYA, A. & AYALA, F. J. 1988a. "Mitochondrial DNA evolution in the *Drosophila obscura* group". *Mol. Biol. Evol.* **5**, 717-728.
- LATORRE, A., MOYA, A. & DE FRUTOS, R. 1988b. "Patterns of puffing activity

- and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. IV. Effect of inversions on gene expression". *Evolution* **42**, 1298-1308.
- LEIGH BROWN, A. J. & LANGLEY, C. H. 1979. "Reevaluation of level of genic heterozygosity in natural population of *Drosophila melanogaster* by two-dimensional electrophoresis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2381-2384.
- LEIGH BROWN, A. J. & ISH-HOROWICZ, D. 1981. "Evolution of the 87A and 87C heat-shock loci in *Drosophila*". *Nature* **290**, 677-682.
- LEIGH BROWN, A. J. 1983. "Variation at the 87A heat shock locus in *Drosophila melanogaster*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5350-5354.
- LEVINGS III, C. S. & PRING, D. R. 1976. "Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize". *Science* **193**, 158-160.
- LEVINSON, G. & GUTMAN, G. A. 1987. "Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution". *Mol. Biol. Evol.* **4**, 203-221.
- LEWONTIN, R. C. & KOJIMA, K. 1960. "The evolutionary dynamics of complex polymorphisms". *Evolution* **14**, 458-472.
- LEWONTIN, R. C. 1964. "The interaction of selection and linkage. I. General considerations: heterotic models". *Genetics* **49**, 49-67.
- LEWONTIN, R. C. & FELSENSTEIN, J. 1965. "The robustness of homogeneity tests in 2 x N tables". *Biometrics* **21**, 19-33.
- LEWONTIN, R. C. 1973. "Population genetics". *Ann. Rev. Genet.* **7**, 1-17.
- LEWONTIN, R. C. 1974. "The genetic basis of evolutionary change". Columbia University Press, New York.
- LEWONTIN, R. C. & HUBBY, J. L. 1966. "A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila*

- pseudoobscura*". Genetics 54, 595-609.
- LI, W-H., LUO, C-C. & WU, C-I. 1985. "Evolution of DNA sequences", 1-94, en "Molecular Evolutionary Genetics". Editado por R. J. MacIntyre. Plenum Press, New York.
- LIZARDI, P. M., BINDER, R. & SHORT S. A. 1984. "Preparative isolation of DNA and biologically active mRNA from diethylaminoethyl membrane". Gene Anal. Techn. 1, 33-39.
- LOPEZ, M. M. 1985. "*Drosophila subobscura* has been found in the Atlantic coast of Argentina". Drosophila Information Service 61, 113.
- LOUKAS, M. & KRIMBAS, C. B. 1975. "The genetics of *Drosophila subobscura* populations. V. A study of linkage disequilibrium in natural populations between genes and inversions of the *E* chromosome". Genetics 80, 331-347.
- LOUKAS, M. & KRIMBAS, C. B. 1979. "The genetics of *Drosophila subobscura* populations. X. A study of dispersal". Genetica 50, 127-134.
- LOUKAS, M., KRIMBAS, C. B. & VERGINI, Y. 1979a. "The genetics of *Drosophila subobscura* populations. IX Studies on linkage disequilibrium in four natural populations". Genetics 93, 497-523.
- LOUKAS, M., KRIMBAS, C. B., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. & KASTRITSIS, C. D. 1979b. "Genetics of *Drosophila subobscura* populations". J. Hered. 70, 17-26.
- LOUKAS, M., KRIMBAS, C. B. & SOURDIS, J. 1980a. "The genetics of *Drosophila subobscura* populations. XIII. A study of lethal allelism". Genetica 54, 197-207.
- LOUKAS, M., KRIMBAS, C. B. & MORGAN, K. 1980b. "The genetics of *Drosophila subobscura* populations. XIV. Further data on linkage disequilibria". Genetics 95, 757-768.

- LOUKAS, M., VERGINI, Y. & KRIMBAS, C. B. 1981. "The genetics of *Drosophila subobscura* populations. XVII. Further genic heterogeneity within electromorphs by urea denaturation and the effect of the increased genic variability on linkage disequilibrium studies". *Genetics* **97**, 429-441.
- LOUKAS, M., DELIDAKIS, C. & KAFATOS, F. C. 1986. "Genomic blot hybridization as a tool of phylogenetic analysis: Evolutionary divergence in the genus *Drosophila*". *J. Mol. Evol.* **24**, 174-188.
- MANIATIS, T., JEFFREY, A. & VAN DESANDE, H. 1975. "Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis". *Biochemistry* **14**, 3787-3794.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. 1982. "Molecular cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- MARTINEZ-CRUZADO, J. C., SWIMMER, C., FENERJIAN, M. G. & KAFATOS, F. C. 1988. "Evolution of the autosomal chorion locus in *Drosophila*. I. General organization of the locus and sequence comparisons of genes *s15* and *s19* in evolutionarily distant species". *Genetics* **119**, 663-677.
- MATSUO, Y. & YAMAZAKI, T. 1989. "Nucleotide variation and divergence in the Histone multigene family in *Drosophila melanogaster*". *Genetics* **122**, 87-97.
- MAXAM, A. M. & GILBERT, W. 1977. "A new method for sequencing DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 560-564.
- MAYNARD SMITH, J. & HAIGH, J. 1974. "The hitch-hiking effect of a favourable gene". *Genet. Res.* **23**, 23-35.
- 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* (en prensa).
- MIYASHITA, N. & LANGLEY, C. H. 1988. "Molecular and phenotypic variation of

- the *white* locus region in *Drosophila melanogaster*". *Genetics* **120**, 199-212.
- MONCLUS, M. 1964. "Distribución y ecología de drosófilos en España. I. Especies de *Drosophila* de la región catalana". *Génet. Ibérica* **16**, 143-165.
- MORITZ, C., DOWLING, T. E. & BROWN, W. M. 1987. "Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics". *Ann. Rev. Ecol. Sys.* **18**, 269-292.
- MUKAI, T., WATANABE, T. K. & YAMAGUCHI, O. 1974. "The genetic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. XII. Linkage disequilibrium in a large local population". *Genetics* **77**, 771-793.
- NEI, M. 1975. "Molecular Population Genetics and Evolution". Amsterdam. Holland.
- NEI, M. 1978. "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals". *Genetics* **89**, 583-590.
- NEI, M. & LI, W-H. 1979. "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5269-5273.
- NEI, M. & LI, W-H. 1980. "Non-random association between electromorphs and inversion chromosomes in finite populations". *Genet. Res.* **35**, 65-83.
- NEI, M. & TAJIMA, F. 1981. "DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases". *Genetics* **97**, 145-163.
- NOLAN, C. & MARGOLIASH, E. 1968. "Comparative aspects of primary structures of proteins". *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 727-790.
- O'CONNELL, P. & ROSBASH, M. 1984. "Sequence, structure, and codon preference of the *Drosophila* ribosomal protein 49 gene". *Nucleic Acids Res.* **12**, 5495-5513.
- OHTA, T. 1976. "Role of very slightly deleterious mutations in molecular evolution and polymorphism". *Theor. Popul. Biol.* **10**, 254-275.

- ORKIN, S. H., KAZAZIAN JR., H. H., ANTONARAKIS, S. E., GOFF, S. C., BOEHM, C. D., SEXTON, J. P., WABER, P. G. & GIARDINA, P. J. V. 1982. "Linkage of β -thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster". *Nature* **296**, 627-631.
- PASCUAL, M., CONSTANTINI, M., RIBO, G. & PREVOSTI, A. 1986. "Sexual isolation between populations of *Drosophila subobscura*. II. American and European strains". *Genét. Ibér.* **38**, 223-230.
- PFRIEM, P. & SPERLICH, D. 1982. "Wild O chromosomes of *Drosophila subobscura* from different geographic regions have different effects on viability". *Genetica* **60**, 49-59.
- PINSKER, W., LANKINEN, P. & SPERLICH, D. 1978. "Allozyme and inversion polymorphism in a central European population of *Drosophila subobscura*". *Genetica* **48**, 207-214.
- PINSKER, W. & SPERLICH, D. 1979. "Allozyme variation in natural populations of *Drosophila subobscura* along a north-south gradient". *Genetica* **50**, 207-219.
- PINSKER, W. & SPERLICH, D. 1981. "Geographic pattern of allozyme and inversion polymorphism on chromosome O of *Drosophila subobscura* and its evolutionary origin". *Genetica* **57**, 51-64.
- POTTER, S. S., NEWBOLD, J. E., HUTCHISON III, C. A. & EDGELL, M. H. 1975. "Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4496-4500.
- POWELL, J. R. 1983. "Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow: Evidence from *Drosophila*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 492-495.
- POWELL, J. R., CACCONE, A., AMATO, G. D. & YOON, C. 1986. "Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9090-9093.

- PRAKASH, S. & LEWONTIN, R. C. 1968. "A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. III. Direct evidence of coadaptation in gene arrangements of *Drosophila*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 398-405.
- PREVOSTI, A. 1955. "Geographical variability in quantitative traits in populations of *Drosophila subobscura*". Cold Spring Harbor Symp. on Quantitative Biology 20, 294-298.
- PREVOSTI, A. 1971. "Chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura* Coll. populations from the Canary islands". Genét. Ibér. 23, 69-84.
- PREVOSTI, A. 1972. "Chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura* populations from the Madeira island". Genét. Ibér. 24, 11-21.
- PREVOSTI, A. 1974. "Chromosomal inversion polymorphism in the southwestern range of *Drosophila subobscura* distribution area". Genetica 45, 111-124.
- PREVOSTI, A., OCAÑA, J. & ALONSO, G. 1975. "Distances between populations of *Drosophila subobscura*, based on chromosome arrangement frequencies". Theor. Appl. Genet. 45, 231-241.
- PREVOSTI, A. 1978. "Polimorfismos cromosómico y evolución". Invest. Ciencia 26, 90-103.
- PREVOSTI, A., RIBO, G., GARCIA, M. P., SAGARRA, E., AGUADE, M., SERRA, L. & MONCLUS, M. 1982. "Los polimorfismos cromosómico y aloenzimático en las poblaciones de *Drosophila subobscura* colonizadoras de Chile". Actas V Congr. Latinoam. Genética, 189-197.
- PREVOSTI, A., SERRA, L. & MONCLUS, M. 1983a. "*Drosophila subobscura* has been found in Argentina". *Drosophila Information Service* 59, 103.
- PREVOSTI, A., GARCIA, M. P., SERRA, L., AGUADE, M., RIBO, G. & SAGARRA, E. 1983b. "Association between allelic isozyme alleles and chromosomal arrangements in European populations and Chilean colonizers of *Drosophila subobscura*". Editores RATAZZI, M. C., SCANDALIOS, J.

G. & WHITT, G. S. Isozymes Vol 10, 171-191.

- PREVOSTI, A., SERRA, L., RIBO, G., AGUADE, M., SAGARRA, E., MONCLUS, M. & GARCIA, M. P. 1985. "The colonization of *D. subobscura* in Chile. II. Clines in the chromosomal arrangements". *Evolution* 39, 838-844.
- PREVOSTI, A., SERRA, L., MONCLUS, M., MESTRES, F., LATORRE, A., RIBO, G. & AGUADE, M. 1987. "Colonización de America por *Drosophila subobscura*". *Evolución Biologica* 1, 1-24.
- PREVOSTI, A., RIBO, G., SERRA, L., AGUADE, M., BALAÑA, J., MONCLUS, M. & MESTRES, F. 1988. "Colonization of America by *Drosophila subobscura*: Experiment in natural populations supporting the adaptive role of chromosomal-inversion polymorphism". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5597-5600.
- RAMSHAW, J. A. M., COYNE, J. A. & LEWONTIN, R. C. 1979. "The sensitivity of gel electrophoresis as a detector of genetic variation". *Genetics* 93, 1019-1037.
- RILEY, M. A. 1989. "Nucleotide sequence of the *Xdh* region in *Drosophila pseudoobscura* and an analysis of the evolution of synonymous codons". *Mol. Biol. Evol.* 6, 33-52.
- RILEY, M. A., HALLAS, M. E. & LEWONTIN, R. C. 1989. "Distinguishing the forces controlling genetic variation at the *Xdh* locus in *Drosophila pseudoobscura*". *Genetics* 123, 359-369.
- ROTWEIN, P., CHYN, R., CHIRGWIN, J., CORDELL, B., GOODMAN, H. M. & PERMUTT, M. A. 1981. "Polymorphism in the 5'-flanking region of the human insulin gene and its possible relation to type 2 diabetes". *Science* 213, 1117-1120.
- ROZAS, J., HERNANDEZ, M., CABRERA, V. M. & PREVOSTI, A. 1990. "Colonization of America by *Drosophila subobscura*: Effect of the founder event on the mitochondrial DNA polymorphism". *Mol. Biol. Evol.* 7 (en prensa).

- RUBIN, G. M. 1983. "Dispersed repetitive DNAs in *Drosophila*", 329-361, en "Mobile Genetic Elements". Editado por J. A. Shapiro. Academic Press, New York.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. 1985. "Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science* **230**, 1350-1354.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* **239**, 487-491.
- SALSER, W. & ISAACSON, J. S. 1976. "Mutation rates in Globin genes: The genetic load and Haldane's dilemma". *Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **19**, 205-220.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- SANTOS, M., TARRIO, R., ZAPATA, C. & ALVAREZ, G. 1986. "Sexual selection on chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*". *Heredity* **57**, 161-169.
- SAURA, A., LAKOVAARA, S., LOKKI, J. & LANKINEN, P. 1973. "Genic variation in central and marginal populations of *Drosophila subobscura*". *Hereditas* **75**, 33-46.
- SCHAEFFER, S. W. & AQUADRO, C. F. 1987. "Nucleotide sequence of the *Adh* gene region of *Drosophila pseudoobscura*: Evolutionary change and evidence for an ancient gene duplication". *Genetics* **117**, 61-73.
- SCHAEFFER, S. W., AQUADRO, C. F. & ANDERSON, W. W. 1987. "Restriction-map variation in the alcohol dehydrogenase region of *Drosophila pseudoobscura*". *Mol. Biol. Evol.* **4**, 254-265.

- SCHAEFFER, S. W., AQUADRO, C. F. & LANGLEY, C. H. 1988. "Restriction-map variation in the *Notch* region of *Drosophila melanogaster*". *Mol. Biol. Evol.* **5**, 30-40.
- SERRA, L., PEGUEROLES, G. & MESTRES, F. 1987. "Capacity of dispersal of a colonizing species: *Drosophila subobscura*". *Genetica* **73**, 223-235.
- SHAH, D. M. & LANGLEY, C. H. 1979. "Inter- and intraspecific variation in restriction maps of *Drosophila* mitochondrial DNAs". *Nature* **281**, 696-699.
- SHARP, P. A., SUDGEN, B. & SAMBROOK, J. 1973. "Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis". *Biochemistry* **12**, 3055-3063.
- SHARP, P. M. & LI, W-H. 1989. "On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*". *J. Mol. Evol.* **28**, 398-402.
- SHAW, C. R. 1970. "How many genes evolve?". *Biochem. Genet.* **4**, 275-283.
- SHEPPARD, P. M. 1975. "Natural selection and heredity". 4 edición. Hutchinson University Library. London.
- SHORROCKS, B. 1977. "An ecological classification of european *Drosophila* species". *Oecologia (Berl.)* **26**, 335-345.
- SIMMONS, G. M., KREITMAN, M. E., QUATTLEBAUM, W. F. & MIYASHITA, N. 1989. "Molecular analysis of the alleles of alcohol dehydrogenase along a cline in *Drosophila melanogaster*. I. Maine, North Carolina, and Florida". *Evolution* **43**, 393-409.
- SINGH, R. S., LEWONTIN, R. C. & FELTON, A. A. 1976. "Genetic heterogeneity within electrophoretic 'alleles' of xanthine dehydrogenase in *Drosophila pseudoobscura*". *Genetics* **84**, 609-629.
- SLAUGHTER, C. A., COSEO, M. C., CANCRO, M. P. & HARRIS, H. 1981. "Detection of enzyme polymorphism by using monoclonal antibodies". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 1124-1128.

- SOLIGNAC, M., MONNEROT, M. & MOUNOLOU, J. C. 1983. "Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 6942-6946.
- SOLIGNAC, M., GENERMONT, J., MONNEROT, M. & MOUNOLOU, J. C. 1984. "Genetics of mitochondria in *Drosophila*: mtDNA inheritance in heteroplasmic strains of *D. mauritiana*". Mol. Gen. Genet. **197**, 183-188.
- SOLIGNAC, M., MONNEROT, M. & MOUNOLOU, J. C. 1986. "Mitochondrial DNA evolution in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*". J. Mol. Evol. **23**, 31-40.
- SOUTHERN, E. M. 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". J. Mol. Biol. **98**, 503-517.
- SPERLICH, D., FEUERBACH-MRAVLAK, 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.
- STEPHAN, W. & LANGLEY, C. H. 1989. "Molecular genetic Variation in the centromeric region of the X chromosome in three *Drosophila ananassae* populations. I. Contrasts between the *vermillion* and *forked* loci". Genetics **121**, 89-99.
- TAKAHASHI, M., OGINO, T. & BABA, K. 1969. "Estimation of relative molecular length of DNA by electrophoresis in agarose gel". Biochim. Biophys. Acta **174**, 183-187.
- THORNE, H. V. 1966. "Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA". Virology **29**, 234-239.
- TSUBOTA, S. I., ROSENBERG, D., SZOSTAK, H., RUBIN, D. & SCHEDL, P. 1989. "The cloning of the *Bar* region and the *B* breakpoint in *Drosophila melanogaster*: Evidence for a transposon-induced rearrangement". Genetics **122**, 881-890.

- UPHOLT, W. B. & DAWID, I. B. 1977. "Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D loop region". *Cell* **11**, 571-583.
- VASLET, C. A., O'CONNELL, P. IZQUIERDO, M. & ROSBASH, M. 1980. "Isolation and mapping of a cloned ribosomal protein gene of *Drosophila melanogaster*". *Nature* **285**, 674-676.
- VAWTER, L. & BROWN, W. M. 1986 "Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock". *Science* **234**, 194-196.
- VINCENT, A., COLOT, H. V. & ROSBASH, M. 1985. "Sequence and structure of the *Serendipity* locus of *Drosophila melanogaster*. A densely transcribed region including a blastoderm-specific gene". *J. Mol. Biol* **186**, 149-166.
- WATTERSON, G. A. 1975. "On the number of segregating sites in genetical models without recombination". *Theor. Pop. Biol.* **7**, 256-276.
- WHITE, T. J., ARNHEIM, N. & ERLICH, H. A. 1989. "The polymerase chain reaction". *Trends Genet.* **5**, 185-189.
- WILSON, A. C., CANN, R. L., CARR, S. M., GEORGE, M., GYLLENSTEN, U. B., HELM-BYCHOWSKI, K. M., HIGUCHI, R. G., PALUMBI, S. R., PRAGER, E. M., SAGE, R. D., & STONEKING, M. 1985. "Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics". *Biological Journal of the Linnean Society* **26**: 375-400.
- WRIGHT, S. 1978. "Evolution and the genetics of populations". Vol IV, University Chicago Press, Chicago.
- WYMAN, A. R. & WHITE, R. 1980. "A highly polymorphic locus in human DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6754-6758.
- ZAPATA, C., SANTOS, M. & ALVAREZ, G. 1982. "Origin of inversions and Wallace's rule of triads". *Evolution* **36**, 407-409.

- ZAPATA, C. & ALVAREZ, G. 1987. "Gametic disequilibrium in populations of *Drosophila subobscura*: A review of experimental evidence". *Genét. Ibér.* **39**, 593-616.
- ZOUROS, E. & KRIMBAS, C. B. 1973. "Evidence for linkage disequilibrium maintained by selection in two natural populations of *Drosophila subobscura*". *Genetics* **73**, 659-674.
- ZOUROS, E., KRIMBAS, C. B., TSAKAS, S. & LOUKAS, M. 1974. "Genic versus chromosomal variation in natural populations of *Drosophila subobscura*". *Genetics* **78**, 1223-1244.
- ZUCKERKANDL, E. 1987. "On the molecular evolutionary clock". *J. Mol. Evol.* **26**, 34-46.