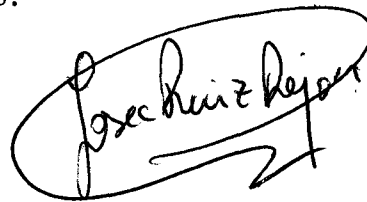


R.29.953

T  
11  
95

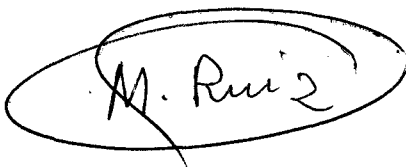
ANALISIS DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE  
MUSCARI COMOSUM L. (LILIACEAE)

Memoria que para aspirar al grado de Doctor en Ciencias presenta el licenciado JOSE CARMELO RUIZ REJON, Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada Enero 1985.



Visto Bueno

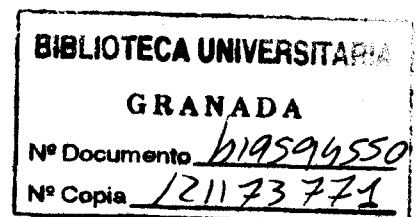
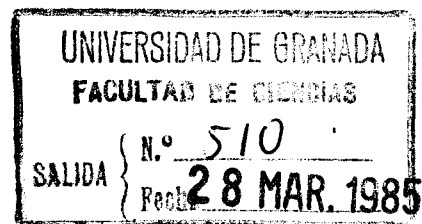
El Director de la Tesis



Fdo. Manuel Ruiz Rejón

Profesor Titular

Departamento de Genética



Parte de los resultados de esta Tesis han sido presentados en las XVII, XVIII, XIX y XX Jornadas de Genética Luso-Españolas celebradas en Oporto (1981), Granada (1982), Coimbra (1983), y Salamanca (1984); han sido publicados en Isozymes: Vol 10: Genetics and Evolution, así como han sido aceptados para su publicación en la revista Biochemical Systematics and Ecology.



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Estadística	113
Tabla	2
Núm.	200

Leí mi tesis el día 3 de Febrero de 1983 obteniendo la calificación de Sobresaliente "Cum laude".

EL Tribunal estuvo compuesto por:

Prof. Dr. Juan Ramón Medina Precioso catedrático de la Univ. de Sevilla.

Prof. Dr. Gonzalo Alvarez Jurado de la Univ. de Santiago de Compostela.

Prof. Dr. José Fernandez Piqueras de la Univ. Autónoma de Madrid.

Prof. Dr. José Lutgardo Oliver Jimenez de la Univ. Autónoma de Madrid.

Prof. Dr. Rafael Diaz de la Guardia Guerrero de la Univ. de Granada.



A Emi

A mi familia

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Manuel Ruiz Rejón bajo cuya dirección, y gracias a su constante ayuda estímulo y orientación, fué posible la realización de este trabajo.

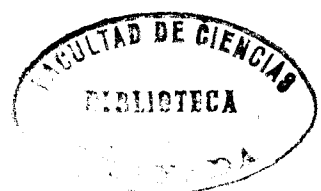
Al Dr. Luis Pascual Reguera, por su iniciación en las técnicas de electroforesis.

A los Drs. José L. Oliver y A. Marín, así como al profesor D. Eugenio Martín y a la licenciada Maria González, por su ayuda en los tratamientos estadísticos realizados mediante ordenador.

Al licenciado Rafael Lozano por su ayuda en la confección de las láminas y portada.

Mi gratitud más sincera a todos mis compañeros del Dpto., así como a Diego López, por las ayudas y estímulos que me dieron en todo momento.

La obtención de material para la realización de este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración desinteresada de las siguientes personas y entidades: Drs. E. Bataglia; C. Marceno, M. A. Cardona, J. de Barros Neves y J. Ortega, D. Juan Ruiz, D. Salvador Cuesta y D. Giorgios Tagalos, así como la Sociedad Botánica de Vaucluse (Francia).



INDICE

1.- <u>INTRODUCCION</u> .....	1
2.- <u>POLIMORFISMOS CROMOSOMICOS EN POBLACIONES NATURALES</u> .....	4
2.1 Las inversiones en la naturaleza.....	4
2.2 Papel evolutivo de los polimorfismos para inversiones	7
2.2.1 Valor adaptativo de las inversiones.....	7
2.2.2 Interpretación neutralista de los polimorfis-	
mos cromosómicos.....	11
2.2.3 Mecanismos de mantenimiento de los polimorfismos	
cromosómicos.....	11
3.- <u>POLIMORFISMO PROTEICO</u> .....	15
3.1 Variabilidad genética en poblaciones naturales de	
especies vegetales.....	15
3.2 Factores que afectan a los niveles de variabilidad en	
plantas.....	16
3.2.1 Categoría taxonómica .....	17
3.2.2 Sistema reproductivo.....	17
3.2.2.1 Forma de reproducción.....	17
3.2.2.2 Sistema de apareamiento.....	17
3.2.2.3 Mecanismos de reproducción.....	18
3.2.3 Fertilidad.....	18
3.2.4 Número cromosómico.....	19
3.2.5 Regimén de vida.....	20
3.2.6 Heterogeneidad ambiental.....	20
3.3 Papel evolutivo del polimorfismo proteico y mecanis-	
mos de su mantenimiento en las poblaciones naturales..	21
3.3.1 Teoría seleccionista.....	22
3.3.2 Teoría neutralista.....	23
3.4 Variación geográfica de aloenzimas en poblaciones naturales..	24
I.- <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u> .....	27
Revisión bibliográfica sobre <u>Muscari comosum</u> .....	28
Variabilidad genética de <u>Muscari comosum</u> .....	30

II .- <u>OBJETIVOS</u> .....	33
4.- <u>MATERIAL Y METODOS</u> .....	36
4.1 <u>MATERIAL</u> .....	36
4.2 <u>METODOS</u> .....	40
4.2.1 Técnicas citogenéticas.....	40
4.2.1.1 Estudio de la mitosis.....	40
4.2.1.2 Estudio de la meiosis.....	41
4.2.1.3 Técnica de badas-C.....	41
4.2.2 Técnicas de electroforesis.....	42
4.2.2.1 Preparación de las muestras.....	42
4.2.2.2 Preparación del gel.....	42
4.2.2.3 Electroforesis.....	43
4.2.2.4 Soluciones tampón .....	43
4.2.2.5 Sistemas de incubación y coloración.....	44
4.2.2.6 Fijación y conservación.....	45
4.3 <u>METODOS ESTADISTICOS</u> .....	46
4.3.1 Cálculo de las frecuencias cromosómicas y génicas.....	46
4.3.2 Medidas de la variabilidad genética.....	46
4.3.3 Análisis de la estructura de poblaciones.....	47
4.3.4 Cálculo de la distancia genética.....	49
4.3.5 Análisis factoriales: Análisis de componentes principales y análisis de correspondencias.....	51
5.- <u>RESULTADOS</u> .....	54
5.1 Complemento cromosómico de <u>Muscari comosum</u> .....	55
5.2 Polimorfismos cromosómicos existentes en la segunda pareja del cariotipo de <u>M. comosum</u> .....	57
5.2.1 Tipos cromosómicos de la segunda pareja.....	57



5.2.2 Comportamiento meiótico de la segunda pareja.....	58
5.2.2.1 Efectos intracromosómicos de los polimorfismos cromosómicos de la segunda pareja sobre la formación de quiasmas.....	63
5.2.2.2 Efectos de las reordenaciones cromosómicas de la segunda pareja de <u>M. comosum</u> sobre la formación de quiasmas en el resto del complemento .	66
5.2.3 Caracterización de la segunda pareja de <u>Muscari comosum</u> mediante bandeo-C.....	71
5.2.4 Variabilidad geográfica de los polimorfismos cromosómicos de <u>M.comosum</u> .....	74
5.2.4.1 Frecuencias cromosómicas de la segunda pareja de <u>M. comosum</u> .....	78
5.2.4.2 Medidas de la variabilidad cromosómica.....	81
5.2.4.3 Estructura genética de las poblaciones analizadas.....	81
5.2.2.4 Diferenciación cromosómica entre las poblaciones de <u>M. comosum</u> .....	89
5.2.4.5 Asociación entre la inversión y el segmento..	104
5.3 Anomalías en el comportamiento meiótico de la primera pareja de <u>M. comosum</u> .....	105
5.4 Variabilidad genética en poblaciones naturales de <u>M. comosum</u> .....	118
5.4.1 Control genético de la actividad alcohol deshidrogenasa.....	118
5.4.2 Control genético de la actividad glutamato oxaloacetato transaminas.....	119

5.4.3 Control genético de la actividad isocitrato deshidrogenasa.....	120
5.4.4 Control genético de la actividad glutamato deshidrogenasa.....	121
5.4.5 Frecuencias genotípicas y génicas.....	124
5.4.6 Medidas de la variabilidad génica.....	130
5.4.7 Estructura genética de las poblaciones.....	136
5.4.8 Diferenciación genética entre las poblaciones de <u>M. comosum</u> .....	141
5.4.9 Variabilidad genética total (cromosómica y génica) en el conjunto de las poblaciones.....	150
5.5 Asociación entre aloenzimas y ordenaciones cromosómicas..	158
5.5.1 Asociación entre los distintos tipos cromosómicos y el locus ADH-1.....	158
5.5.2 Asociación entre los citotipos con segmento y el locus GOT-1.....	161
<u>6.- DISCUSION</u> .....	166
6.1 Naturaleza de las anomalías cromosómicas en <u>M. comosum</u> ...	167
6.2 Naturaleza de la variabilidad cromosómica de <u>M. comosum</u> ..	175
6.2.1 Fenómenos que cambian el número cromosómico básico de <u>M. comosum</u> .....	175
6.2.2 Polimorfismos cromosómicos de la segunda pareja de <u>M. comosum</u> .....	177
6.2.2.1 Polimorfismos cromosómicos producidos por el cambio en la posición del centrómero.....	179
6.2.2.2 Polimorfismos cromosómicos debidos a las diferencias de longitud.....	187

6.3 Variabilidad genética existente en <u>M. comosum</u> .....	202
6.3.1 Variabilidad cromosómica.....	203
6.3.2 Variabilidad génica.....	206
6.4 Diferenciación geográfica en <u>M.comosum</u> .....	210
6.4.1 Diferenciación cromosómica entre las poblaciones de <u>M.comosum</u> analizadas.....	210
6.4.2 Diferenciación génica entre las poblaciones de M. comosum.....	216
6.4.3 Características adaptativas de la variabilidad genética de <u>M. comosum</u> .....	223
<u>7.- RESUMEN Y CONCLUSIONES</u> .....	236
<u>8.- BIBLIOGRAFIA</u> .....	245

INTRODUCCION



## 1 Introducción

Como indica Stebbins (1983), actualmente el estudio de la evolución orgánica se ha polarizado en dos sentidos distintos. Uno de ellos trata de analizar la evolución en sentido amplio: una sucesión de hechos que tuvieron lugar a lo largo de millones de años, y que originaron, sucesivamente, la materia viva, las células organizadas y los organismos pluricelulares incluido el hombre.

El otro sentido lo constituye el estudio de la evolución a nivel de las poblaciones, intentando reconocer, caracterizar y reproducir experimentalmente aquellos cambios evolutivos que pueden ser observados por un científico durante el curso de su vida.

Desde este último punto de vista, un problema que ha ocupado siempre la atención de pensadores y científicos es el de la variabilidad que presentan los seres vivos en sus áreas de distribución.

Así, Lamarck (1744-1829), a quién se considera como uno de los primeros evolucionistas, basó, principalmente, su teoría del "Transformismo" de los seres vivos, en la observación de las diferencias existentes entre los individuos de una misma especie que viven bajo distintas condiciones ambientales.

A su vez, Darwin (1809-1882), cuyos escritos constituyen la principal base de las teorías evolucionistas actuales, basó, en parte, su hipótesis de evolución por selección natural, en el análisis de la variabilidad geográfica que presentan los seres vivos.

Desde el establecimiento de la teoría sintética de la evolución en los años treinta (Dobzhansky, 1937; Huxley, 1942; Mayr, 1942; Simpson, 1944, 1953 y Stebbins 1950, entre otros), una de las contribuciones más importantes a la moderna teoría de la evolución está constituida por los

trabajos de Dobzhansky et al., (1959,1973) sobre los polimorfismos de los tipos estructurales de cromosomas y los polimorfismos bioquímicos en poblaciones naturales de Drosophila.

Estas observaciones y estudios en Drosophila han demostrado que las poblaciones naturales de Dípteros son extremadamente heterogéneas, y ello a dos niveles:

a) A nivel intra-poblacional, donde cada individuo presenta un genotipo único.

b) Y a nivel interpoblacional donde se observan diferencias significativas en las frecuencias de tipos cromosómicos y alelos de isoenzimas, en las áreas de distribución de varias especies de Drosófilidos.

Estas observaciones han sido confirmadas, en general, en muchos otros seres vivos, incluido el hombre (véase Dobzhansky et al., 1980).

La importancia de estos estudios desde el punto de vista evolutivo, viene avalada por varias razones:

1º) La existencia de variabilidad genética es necesaria para la evolución, porque, como ya indicó Darwin, el punto inicial de todo proceso evolutivo es la existencia de variación hereditaria (Darwin, 1859).

2º) La dosis de variabilidad genética observada en poblaciones naturales es importante en relación con su tasa evolutiva. En este sentido, R.A. Fisher demostró matemáticamente, en el llamado "Teorema fundamental de la Selección Natural" (1930), que la cantidad de variabilidad genética en relación a la eficacia biológica, es decir la eficacia reproductiva relativa, se halla directamente correlacionada con la tasa de cambios evolutivos provocados por la selección natural.

Posteriormente, Ayala (1965, 1968), en experimentos realizados en Drosophila serrata, demostró la correlación positiva que existe entre la cantidad de variabilidad genética y la tasa de cambio evolutivo.

3º) la existencia de variaciones geográficas en las variantes genéticas que presenta una especie puede ser importante desde el punto de vista evolutivo porque tales variaciones se pueden interpretar como resultado de la actuación de los agentes evolutivos. Al mismo tiempo tales variaciones pueden constituir el punto de partida de procesos evolutivos como la diversificación y especiación.

En este sentido se han interpretado, sobre todo, las variaciones geográficas de reordenaciones cromosómicas y variantes alélicas en distintos organismos.

## 2. Polimorfismos cromosómicos en poblaciones naturales

Según Ford (1940) el polimorfismo de una población es la ocurrencia en un mismo ambiente de dos o más formas discontinuas de una especie, en proporciones tales que la más rara de ellas no puede ser mantenida en la población solo por mutación recurrente.

Los polimorfismos cromosómicos que más abundantemente han sido descritos y analizados en poblaciones naturales son los que derivan de la presencia de las inversiones cromosómicas.

### 2.1 Las inversiones en la naturaleza

La inversión es un cambio estructural, por el cual un segmento cromosómico cambia de sentido dentro del propio cromosoma, (y por lo tanto la ordenación de los loci) con relación a una secuencia considerada como típica para dichos cromosomas (Sturtevant, 1926).

Las inversiones se pueden clasificar en:

a) Paracéntricas: la zona invertida no incluye el centrómero.

b) Pericéntricas: la zona invertida incluye al centrómero.

La existencia de polimorfismos cromosómicos para inversiones han sido exclusivamente descritos todos ellos en poblaciones naturales de especies animales.

El grupo zoológico donde este tipo de reordenaciones es más frecuente es en el de los Dípteros, siendo las inversiones paracéntricas las más representadas. Dentro de los Dípteros es en el género Drosophila (véase Dobzhansky, 1970) donde mejor se han estudiado los polimorfismos cromosómicos, tanto para inversiones paracéntricas (la mayoría) como para inversiones pericéntricas.

Otros Dípteros donde también han sido observados polimorfismos cromosómicos para inversiones cromosómicas son los Simúlidos (Rothfels, 1980); mosquitos Anopheles (Coluzzi, 1972; Coluzzi et al., 1977), en el género Chironomus (Philip, 1942; Martin y Lee, 1981) y en el género Coelopa (Butlin et al., 1982).

Otro grupo de animales donde también es frecuente la existencia de polimorfismos para inversiones es en el grupo de los Ortópteros (véase Hewitt, 1979; Cabrero y Camacho, 1982), existiendo, en este caso, tanto inversiones paracéntricas como pericéntricas. También se ha encontrado que, en algunas especies de roedores y de aves, existen polimorfismos para inversiones pericéntricas (Yosida et al., 1965, 1967, 1971; Shields, 1973, 1976; Díaz de la Guardia et al., 1979, 1981).

Por lo que se refiere a poblaciones naturales de plantas superiores la presencia de inversiones se ha puesto de manifiesto fundamentalmente como mutantes ocasionales (Zohary, 1955), así como en híbridos interespecíficos (Stebbins, 1971).

En las plantas, además, se ha considerado como señal de la



existencia de inversiones paracéntricas, la aparición de puentes y fragmentos en las anafases meióticas. Aún teniendo en cuenta que estas anomalías se pueden explicar por fenómenos citogenéticos como pueden ser los intercambios de tipo-U (John y Lewis, 1966), en todos los casos se han citado como fenómenos ocasionales.

El grupo de plantas dónde se ha citado con mayor frecuencia la existencia de inversiones, tanto paracéntricas como pericéntricas, es el de las Liliáceas (Brown y Zohary, 1955; Bradham, 1970, 1974; Bothmer, 1970; Sjodin, 1971; Noda, 1974; Watanabe y Noda 1974; Ainsworth et al., 1983).

Bradham (1969a) encontró en plantas del grupo Aloineae un tipo especial de inversiones denominado de tipo E. Este tipo de inversiones necesita de la presencia de dos inversiones (pericéntrica y paracéntrica) solapadas, y la ocurrencia de un quiasma en un lugar próximo al centrómero.

Quizás el único caso de polimorfismo cromosómico estable para inversiones en plantas sea el descrito en Muscari comosum (Liliaceae) (Garbari, 1966; 1968; Bentzer, 1972; Bentzer y Ellmer, 1975; Ruiz Rejón y Oliver, 1981; García, 1981). Estos autores describen la existencia de cuatro tipos cromosómicos en la segunda pareja del cariotipo de esta especie, atribuyendo la formación de estos tipos cromosómicos a la presencia de una inversión pericéntrica y posiblemente una duplicación, aunque los datos citogenéticos en los que se apoyaban estas hipótesis son muy superficiales.

## 2.2 Papel evolutivo de los polimorfismos para inversiones

La existencia de polimorfismos cromosómicos para inversiones en poblaciones naturales se ha interpretado evolutivamente desde dos puntos de vista:

- a) El polimorfismo cromosómico para inversiones es adaptativo.
- b) El polimorfismo cromosómico para inversiones es selectivamente neutro.

### 2.2.1 Valor adaptativo de las inversiones

En general, el significado adaptativo de las inversiones depende en gran parte de sus efectos en el entrecruzamiento de los cromosomas que llevan la inversión (John y Lewis, 1966).

Las inversiones poseen dos propiedades en relación con su comportamiento respecto a la formación de entrecruzamientos:

- Suprimen la recombinación entre las secuencias estandar e invertida
- En los casos en que se forma un quiasma en el bucle de inversión, se produce una barrera de esterilidad entre los individuos homocigotos para la inversión y los homocigotos para la forma estandar.

A partir de los trabajos de Dobzhansky (1941, 1948) en Drosophila se reconoce a las inversiones un posible valor adaptativo. Esta conclusión está basada, en principio, en dos observaciones:

- La existencia de poblaciones naturales en las que las frecuencias de ordenaciones cromosómicas varían paralelamente a factores ambientales importantes, apareciendo clinas relacionadas con dichos factores. Son numerosas las clinas descritas en el género Drosophila, que siguen un patrón geográfico relacionado con las variaciones ambientales (Stalkery Carson, 1948; Brcinc, 1962, 1966; Prevosti, 1966, 1971, 1972; Mukai et al., 1974; Ward et al., 1974; Mettler, et al., 1977; Knibb et al

1981; Knibb, 1982) o bien un patrón temporal como ocurre en D. flavopilosa y D. pseudoobscura (Dobzhansky, 1943; Brcinc, 1972; Anderson, et al. 1975) o altitudinal (Dobzhansky 1949; Srecrama et al., 1974). Sin embargo, cierto tipo de clinas (radiales y las de dirección Este-Oeste) detectadas por Prevosti (1978) en D. suboscuro son interpretadas por dicho autor como debidas a factores históricos.

- El segundo tipo de observaciones que apoyan el valor adaptativo de las inversiones está basada en análisis como los efectuados por Dobzhansky y Levene (1948). Estos autores observaron que las descendencias obtenidas en el laboratorio, en condiciones óptimas de supervivencia, a partir de hembras de la naturaleza recién inseminadas, están en equilibrio de Hardy-Weinberg por lo que se refiere a las ordenaciones para inversiones. En cambio, la descendencia de las hembras en el campo no estaba en equilibrio de H-W, sino que los heterocigotos estaban en mayor proporción que los homocigotos.

La existencia de clinas y el exceso de individuos heterocigotos en poblaciones naturales para distintas ordenaciones cromosómicas, causadas por inversiones, sugiere que las inversiones difieren entre sí por los conjuntos de alelos que portan, es decir por lo que se llama un supergen (Darlington y Matter, 1949), y que estas diferencias son adaptativas. Un dato que puede estar a favor de esta interpretación es la existencia de desequilibrio de ligamiento entre inversiones y alelos de aloenzimas (Prakash y Lewontin, 1966, 1968; Langley et al., 1977).

Según Lewontin (1974) el polimorfismo de inversiones constituye un caso claro de desequilibrio de ligamiento, y la selección natural favorecería el situar en un mismo cromosoma una colección de alelos que confieran a los individuos que los presentan una elevada eficacia biológica.

gica . El papel de las inversiones cromosómicas en la evolución puede consistir por tanto en la conservación de las ordenaciones alélicas valiosas desde el punto de vista adaptativo (Dobzhansky et al. 1980).

Sin embargo, existen dos posibles hipótesis para explicar la asociación entre aloenzimas y reordenaciones cromosómicas (García y Prevosti, 1981):

- Si la inversión se ha producido una sola vez en la historia de la especie la asociación puede ser debida al efecto fundador. La asociación se mantendrá si la recombinación entre el segmento invertido y el normal está bloqueada, y según sea de grande o pequeña la frecuencia de mutación en los loci incluidos en la inversión (Nei, 1975).

- Es posible que algunos de los alelos isoenzimáticos incluidos en el complejo de genes coadaptados que está incluido en la inversión den a ésta un valor adaptativo, Loukas et al., (1979) encuentran una posible asociación que puede ser explicada por esta teoría . Otros casos de asociación entre alelos isoenzimáticos y inversiones cromosómicas son los detectados por Prakash y Lewontin, (1968); Langley et al., (1974) Mukai y Volker (1977), Prevosti (1978); Day et al., (1982), entre otros.

Un caso especialmente claro de desequilibrio de ligamiento, entre una inversión y dos alelos isoenzimáticos, mantenido por selección es el que Fontdevila et al., (1983) encuentran en Drosophila suboscuro.

Esta especie presenta dos inversiones  $O_{ST}$  y  $O_{3+4}$  que presentan en sus respectivas frecuencias variaciones estacionales, lo que es evidencia de que el polimorfismo cromosómico es flexible en esta especie. Asimismo, se producen variaciones estacionales en las frecuencias génicas de los aloenzimas LAP y PEPT-1, que se encuentran localizados dentro de una misma inversión del cromosoma  $O_2$ . Los cambios alélicos sucedían acoplados a los cambios producidos en la reordenación  $O_{ST}$  y no a

los cambios de la ordenación  $O_{3+4}$ . Estos cambios estacionales observados en el desequilibrio de ligamiento revelan la acción de la selección en su mantenimiento.

Una evidencia a favor del posible valor adaptativo de los polimorfismos cromosómicos para inversiones en Drosophila es la aportada por Carson (1955) quién postuló una ley sobre la distribución geográfica de los polimorfismos cromosómicos. Según este autor los valores máximos para el polimorfismo se encuentran en el centro de las áreas de distribución de las especies, como respuesta adaptativa a las condiciones ambientales óptimas que existen en dicha zona. En cambio las frecuencias más bajas del polimorfismo para inversiones se dan en las poblaciones marginales. En dichas poblaciones las condiciones ambientales son más variables por lo que las especies necesitan un sistema genético que proporcione mayor variabilidad genética, y que facilite la adaptación a dichas condiciones. Esto se conseguirá si se disminuye el polimorfismo cromosómico y por lo tanto aumenta la recombinación. Tal patrón se observa en algunas especies de Drosophila (Carson, 1958; Da Cunha et al., 1959; Carson y Heed, 1964; Sperlich, 1964).

En este sentido, habría que mencionar, de acuerdo con Lewontin (1974), que las poblaciones marginales no tienen, por qué coincidir con los bordes geográficos de distribución de las especies, sino que pueden ser poblaciones de borde ecológico. En estas poblaciones las condiciones ambientales serían temporalmente desfavorables para la especie, que se verá sometida así, por tanto, a una fuerte presión de selección.

La amplia distribución de una ordenación en toda el área geográfica ocupada por una especie, es asimismo, prueba de que ésta tiene cierto valor adaptativo (Prevosti, 1978). La ordenación ha podido desarrollar o un genotipo que produzca un fenotipo adaptado a toda el área geográfica o una serie de genotipos adaptados a distintas condiciones ambientales.

### 2.2.2 Interpretación neutralista de los polimorfismos cromosómicos

Podría haber una posible explicación del polimorfismo para inversiones desde el punto de vista de la teoría neutralista, relacionado con su origen inusual y con las propiedades de la inversión (Day et., 1982). Es decir, al existir inicialmente un número bajo de individuos portadores y también un bajísimo potencial de recombinación de alelos entre el segmento invertido y el normal, un polimorfismo para inversión y el desequilibrio de ligamiento que puede llevar aparejado, pueden ser mantenidos en una población durante muchas generaciones mediante una combinación entre mutación y deriva genética (Lande, 1979).

### 2.2.3 Mecanismos de mantenimiento del polimorfismo cromosómico

El mecanismo de mantenimiento de los polimorfismos cromosómicos, en general, y el de las inversiones, en particular, ha sido ampliamente estudiado en gran cantidad de casos, sobre todo en especies del género Drosophila (Dobzhansky, 1971; Yu y Spiess, 1978; Krimbas y Loukas, 1979).

En algunos casos, cuando la variabilidad genética produce una obvia diferenciación fenotípica, el mecanismo selectivo que afecta al polimorfismo y que conduce a su adaptación, se puede definir claramente (Ford, 1975). Por el contrario, queda poco claro o ambiguo (Lewontin, 1974) el mecanismo selectivo que mantiene el polimorfismo, en aquellas variaciones que no causan efectos fenotípicos obvios, tal como ocurre en muchas variaciones cromosómicas.

Sin embargo, la actuación de la selección natural en el mantenimiento de polimorfismos cromosómicos de inversiones ha sido demostrado en algunos casos de especies de Drosophila (Da Cunha, 1955; Dobzhansky, 1971; Anderson et al., 1975; Singh, 1982, 1983) en especies de saltamontes (Lewontin y White, 1960; Hewitt y Schroeter, 1968) y en otras especies de Dípteros (Butlin et al., 1978; Collins et al., 1978).

De las varias formas de selección equilibradora (13 tabuladas e Hartl 1980), la heterosis y la selección dependiente de la frecuencia son las que presentan mayor importancia en relación con el polimorfismo cromosómico.

La heterosis, o selección a favor de los heterocigotos para un polimorfismo cromosómico por inversiones ha sido ampliamente demostrado en diferentes especies de Drosophila. ( D. pseudoobscura, Dobzhansky 1971; D. subobscura, Risch 1971; D. pavani, Brcinc y Budnik, 1976; D. melanogaster, Barnes, 1983).

Asimismo en diversas especies de Dípteros se ha observado que los individuos heterocigotos para inversiones presentan mayor tasa de reproducción y de supervivencia que los homocigotos. (Kaul y Parsons, 1965; Monclús y Prevosti, 1971; Stlaker, 1976; Watanabe, Watanabe .1977; Yu y Spies, 1978; Collins, 1978).

En especies vegetales, también se ha señalado la existencia de un caso de heterosis para una inversión pericéntrica, existente en una especie de Cyrtanthus (Ising, 1969). En este caso los individuos heterocigotos para la inversión producen mayor número de semillas que los individuos homocigotos.

Wright y Dobzhansky (1946) y Anderson et al., (1968) demostraron experimentalmente, en poblaciones fundadas en cajas de de poblaciones con distintas frecuencias iniciales de inversiones, que dichas frecuencias evolucionan hasta un valor de equilibrio que conserva el polimorfismo. Esto ocurre debido a la mayor eficacia biológica de los heterocigotos, que puede ser debida a dos causas:

- Al no haber entrecruzamiento entre la zona estandar e invertida, se favorece la posibilidad de la existencia de ventaja heterocigota en uno, varios o muchos de los loci contenidos en la inversión.

- Si los reordenamientos cromosómicos estandar e invertido, acumulan mutaciones recesivas deletéreas por complementación, la ausencia de recombinación previene su eliminación del pool génico (Muller, 1964; Charlesworth, 1978; Laurie-Alberg, y Merrell, 1979).

Un caso de heterosis para una inversión pericéntrica ha sido reseñado por Dobzhansky y Pavlosky (1955) en poblaciones naturales de Drosophila tropicalis de América Central.

La selección dependiente de la frecuencia ocurre cuando las eficacias biológicas de los genotipos varían con sus frecuencias. Este tipo de selección, que siempre parece estar asociado con alta densidad de población (Ayala y Campbell, 1974; Nassar, 1979), ha sido citado como posible mecanismo de mantenimiento de polimorfismo cromosómicos para inversiones en Drosophila melanogaster (Nassar et al., 1973) D. ananassae (Tobari y Kojima, 1967; Kojima y Tobari, 1969) y D. paulistorum (Gromko y Richmond, 1978) y en el saltamontes Austroicetes interioris (Nankivell, 1974).

Otro posible mecanismo de mantenimiento del polimorfismo cromosómico es la selección disruptiva. Este tipo de selección favorece diferentes genotipos en diferentes subambientes, si el ambiente en que se desarrolla una especie no es homogéneo, sino que puede ser heterogéneo con respecto a diversos factores como el clima, recursos alimentarios,



espacio vital. Además hay que considerar que la heterogeneidad puede ser temporal o espacial.

Dos son las posibles estrategias adaptativas que la especie puede desarrollar frente a esta heterogeneidad ambiental: Una tener un genotipo único adaptado a varios ambientes, la otra sería el polimorfismo, o sea varios genotipos adaptados a diferentes subambientes. La estrategia más frecuente en la naturaleza está aún por aclarar (Ayala y Valentine, 1983).

También la estrategia podría ser una combinación de monomorfismo genético para enfrentarse a la heterogeneidad temporal (ambientes inestables) y el polimorfismo para enfrentarse a la heterogeneidad espacial (ambientes manchados).

En este sentido, Powell (1971) y McDonald y Ayala (1974) demostraron en poblaciones experimentales de D. melanogaster que las poblaciones con mayor mosaicismo ambiental eran significativamente más polimórficas.

Otra posible forma de mantenimiento de los polimorfismos cromosómicos en las poblaciones naturales podría ser mediante el tipo de selección denominada "Alocopróctica" (Serradilla y Ayala, 1983). Según este tipo de selección, la fertilidad será mayor en aquellos cruces en los que los individuos son homocigotos para distintos alelos u ordenaciones, que en los que los individuos son homocigotos para el mismo alelo u ordenación.

### 3. Polimorfismo proteico

El desarrollo de las técnicas de electroforesis y tinción histoquímica por Hunter y Market (1957) permitió el descubrimiento de los isoenzimas o formas moleculares múltiples de los enzimas (Market y Moller, 1959).

Desde los trabajos iniciales de Lewontin y Hubby (1966), Jhonson, (1966) y Harris (1966), el estudio de los isoenzimas ha permitido ir acumulando gran cantidad de datos sobre la variabilidad genética existente tanto en el reino animal (Nevo, 1978; Nevo et al., 1983) como en el vegetal (Brown, 1979 ; Hamrick et al., 1979; Nevo, 1983).

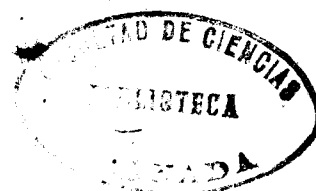
Mediante estos estudios se ha demostrado que del 30% al 80% de todos los loci son polimórficos en las poblaciones naturales de los seres vivos, y que la heterocigosidad media por individuo oscila entre el 5% y el 20%. (Lewontin, 1974).

#### 3.1 Variabilidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales

Aunque no son muy numerosos los estudios de variabilidad genética en poblaciones naturales de plantas, dichos estudios han demostrado la existencia de cantidades muy importantes de variabilidad genética en poblaciones naturales de plantas.

En general se observan altos niveles de polimorfismo proteico, encontrando poblaciones naturales monomórficas sólo en casos de poblaciones constituidas por colonizadores endogámicos, o en los extremos marginales del área de distribución de la especie (Brown, 1978; Brown; 1979; Hamrick et al., 1979).

Así, Hamrick et al., (1979), revisando los datos sobre plantas, encuentran que 113 taxones de especies vegetales de diferentes caracterís-



ticas biológicas y geográficas presentan un 36.8% de loci polimórficos, siendo su heterocigosidad media de 15.66%.

Estos valores, que son aproximadamente iguales a los que presentan los invertebrados, son bastante mayores que los encontrados en los animales vertebrados (Ayala y Kiger, 1980).

La gran cantidad de variación genética encontrada en el estudio de organismos vegetales se puede explicar por razones ecológicas y/o históricas (Hamrick et al., 1979).

Las plantas al ser sedentarias se puede esperar, por eso, que respondan a su ambiente como especies de grano grueso, pudiendo responder a la heterogeneidad espacio-temporal de diversas formas que conllevan por ejemplo el desarrollo de plasticidad fenotípica individual (Bradshaw et al., 1965; Bradshaw, 1972; Harper, 1977) o bien la evolución de fenotipos localmente adaptados (Antonovics, 1971; Jain 1976).

Asimismo el tamaño de población en plantas es generalmente grande y relativamente estable y por estos motivos son menos propensas a ser afectadas por fenómenos de deriva genética y más apropiadas para mantener altos niveles de variación genética (Nevo, 1983).

A continuación revisamos algunos posibles factores que afectan a los niveles de variabilidad genética en poblaciones de plantas.

### 3.2 Factores que afectan a los niveles de variabilidad en plantas

Se han intentado correlacionar gran cantidad de factores ambientales y biológicos con la variación genética de plantas como son:

### 3.2.1 Categoría taxonómica

Cuando se comparan entre sí los distintos grupos taxonómicos, se puede observar que las Gimnospermas son más variables en general que las monocotiledóneas y dicotiledóneas (Hamrick et al., 1979). Estas diferencias, se deben a que normalmente las Gimnospermas son árboles de vida larga y de fecundación cruzada, factores que están asociados a una alta variabilidad (Nevo, 1983).

### 3.2.2 Sistema reproductivo

En este sentido son varios los factores que se pueden intentar correlacionar con la variación:

#### 3.2.2.1 Forma de reproducción

Las especies con una mezcla de reproducción sexual y asexual mantienen unos valores más altos de variación que las que mantienen un solo mecanismo reproductivo (Hamrick et al., 1979).

Esta mayor variación puede explicarse, en parte, por la observación de que muchas de las plantas con reproducción mezclada son alógamas obligadas por ejemplo Agrostis, Liatris, Opuntia, y ninguna se autofecunda. Esta asociación de reproducción vegetativa y alogamia ha sido observada ampliamente en especies vegetales (Grant, 1975).

#### 3.2.2.2 Sistema de apareamiento

Existe una relación positiva entre la cantidad de fecundación cruzada y la variación genética que presenta una especie (Gottlieb, 1977, 1981; Brown, 1979).

Cuando se comparan especies relacionadas, con distintos sistemas reproductivos, se encuentra que las especies alógamas tienen una mayor tasa de variabilidad que las preferentemente autógamas (Gottlieb,

1973; Rick et al. 1977; Schoen, 1982).

Las plantas autógamas estrictas muestran una mayor diferenciación geográfica entre poblaciones, y una mayor asociación de multilocus que las especies alógamas (Brown, 1979; Brown et al., 1980).

### 3.2.2.3 Mecanismos de polinización

Existen grandes diferencias de variabilidad entre los tres posibles mecanismos de polinización (Hamrick et al., 1979).

Las plantas con polinización por el viento, presentan altos niveles de variación. Esto se debe a que producen grandes cantidades de polen, lo que conlleva que éste sea distribuido a largas distancias; lo que favorece tamaños de poblaciones efectivos grandes, una menor autofecundación, menor fijación de genes por deriva y selección y más variación intrapoblacional.

Sin embargo la mayoría de las plantas polinizadas por animales, viven en hábitats estabilizados, y, al ser polinizados la mayoría por insectos, esto les proporciona una baja dispersión de su polen, lo que provoca un descenso en su variación genética.

El tercer mecanismo, la autofecundación, obviamente produce un descenso en la cantidad de variación genética que el organismo puede presentar.

### 3.2.3 Fertilidad

Las especies con fertilidad alta, medida como número de semillas producidas, son altamente variables. Dos son las posibles explicaciones que se han intentado aplicar en este caso:

- a) Las especies con alta fertilidad son capaces de producir una

gran variedad de progenie recombinante capaz de sobrevivir en una gran variedad de hábitats. Esto conduciría al mantenimiento de altos niveles de variabilidad, si la proliferación de nuevos individuos de la especie se debe a la acción del azar (Hamrick et al., 1979).

b) Las especies con alta fertilidad, sufrirían una selección más intensa que la que aparentemente se observa. Si esta selección natural es balanceada, de ello se derivará que presentarán unos altos niveles de variación genética (Hamrick et al., 1979).

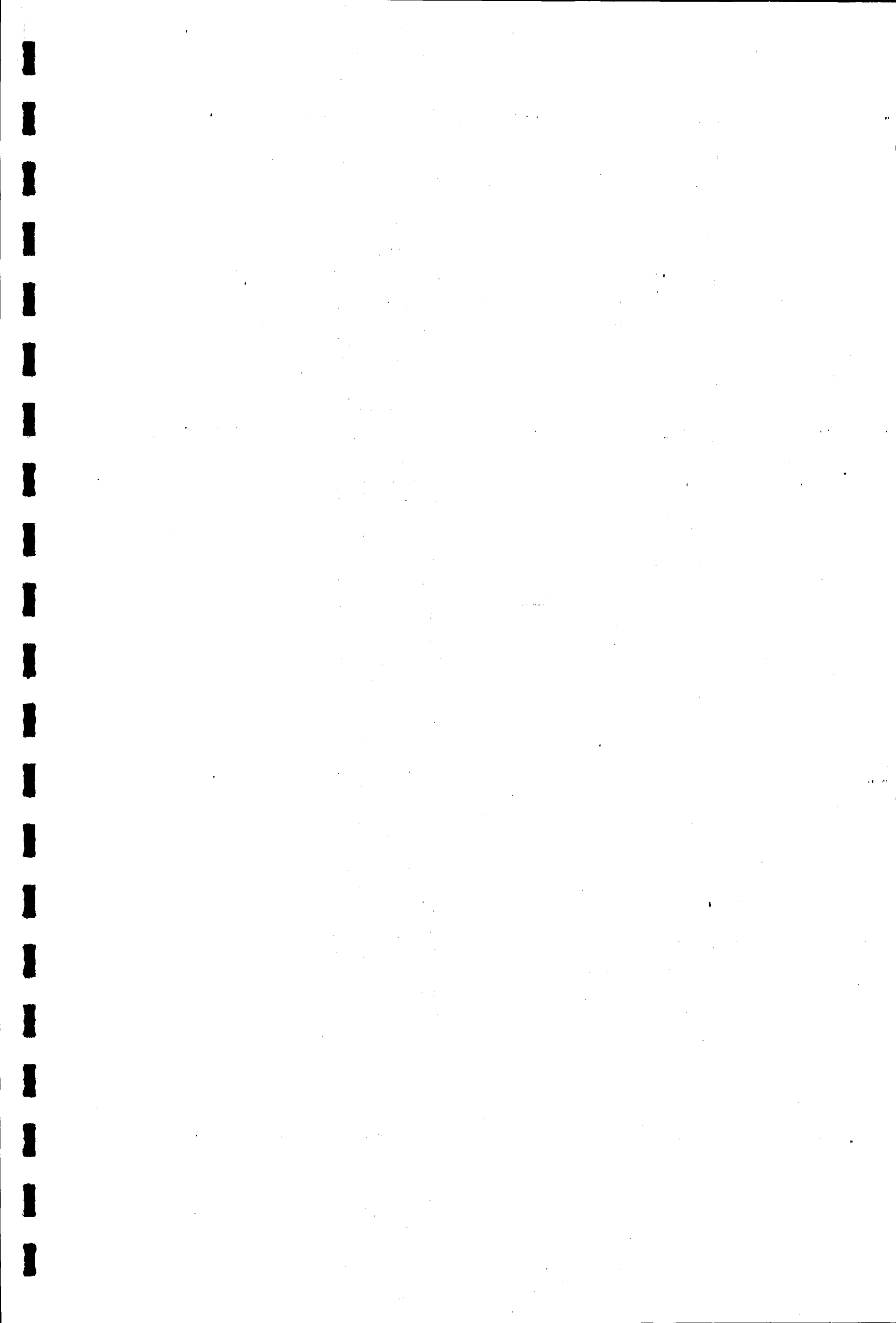
#### 3.2.4 Número cromosómico

Grant (1975) intentó correlacionar el número cromosómico y la variación genética. En general se podría argumentar que las especies diploides que tuvieran mayor número cromosómico, con lo que tendrían teóricamente mayor cantidad de recombinación, podrían mantener mayor variación genética. Sin embargo cuando se realizan estudios para confirmar esta hipótesis, se encuentra que los resultados son negativos (Hamrick et al., 1979).

Posteriormente Pierce y Mitton (1979, 1980) sugieren la posible existencia de una correlación negativa entre la heterocigosis génica y el tamaño del genoma, para una gran variedad de organismos. Este tipo de correlación ha sido criticado (Larson, 1981) en el sentido de que por los datos aportados no estaba suficientemente demostrada.

Sin embargo, los resultados obtenidos comparando los niveles de variabilidad genética existentes en especies poliploides versus diploides indican que las primeras son más polimórficas que las especies diploides (Roose y Gottlieb 1976; Quirós 1983; Martínez Zapater, 1983).

La poliploidia es un fenómeno frecuente en las plantas superiores, suponiéndose que en muchos casos el éxito de los poliploides se debe a



la mayor diversidad genética y heterocigocidad que pueden mantener (Gottlieb, 1976; Stebbins, 1980).

### 3.2.5 Regimén de vida

En general no se puede llegar a una conclusión clara sobre las diferencias entre los niveles de variación existentes entre especies cultivadas y especies no cultivadas.

Levin (1976) al analizar la variabilidad existente en la especie Phlox drumondii encuentra que dicha variación es mayor en las poblaciones naturales que en las cultivadas. Igualmente Mcleod et al., (1979) encuentran los mismos resultados en especies de Capsicum, incluso en el caso de las especies autógamias.

Así, comparando especies cultivadas con no cultivadas, en general, Hamrick et al., (1979) encuentran que las primeras son más variables:  $H = .215$  y  $H = .118$ , respectivamente.

### 3.2.6 Heterogeneidad ambiental

La amplitud y las condiciones de heterogeneidad ambiental de la zona ecogeográfica en donde se desarrolla una especie van a influir en la cantidad de variación genética presente en dicha especie.

Es posible distinguir dos clases de estrategias según sea la respuesta a la heterogeneidad ambiental:

- Especies generalistas o de grano fino (Levin, 1968; Selander y Kaufman, 1973), capaces de vivir en condiciones diversas, pudiendo explotar todas las zonas de su entorno, y como consecuencia de ello las especies deben de desarrollar un sistema adaptativo mediante uno o pocos genotipos que pueden ser eficaces en dicho tipo de ambientes.



Especies vegetales de este tipo han sido descritas, como Eupatorium microstemon (Baker, 1965) Festuca ovina (Bradshaw et al., 1971) Typha latifolia (McNaughton et al. 1974) y especies herbáceas, en general, (Baker, 1965; May, 1965).

- El segundo tipo de especies son las llamadas especialistas o de grano grueso, formadas por un complejo de variantes ecotípicas, cada uno de ellos adaptados a un ambiente específico. Estas especies presentan una gran variedad de genotipos, muchos de los cuales están altamente adaptados a alguna condición especial del hábitat que ocupan. Entre las especies de este tipo se encuentran Lycopersicon cheesmanii (Rick y Fobes, 1975) Taraxacum officinale (Solbrig y Simpson, 1974) Lupinus texensis (Babbel y Selander, 1974) Fragaria vesca (Hancock y Bringhurst, 1978).

### 3.3 Papel evolutivo del polimorfismo proteico y mecanismos de su mantenimiento en las poblaciones naturales

En la actualidad está bien establecida de una forma definitiva que la cantidad de variabilidad genética en poblaciones naturales es muy elevada, existiendo gran controversia, sin embargo, en cuanto a los mecanismos que mantienen esta variación

Las fuerzas más importantes que producen cambios evolutivos en la naturaleza tanto a nivel fenotípico y nivel molecular, son: la selección natural, mutación, migración, y deriva genética. La importancia relativa y el papel a jugar por cada una de ellas en los cambios evolutivos son a menudo desconocidos y contradictorios, particularmente a nivel molecular (Nevo, 1983).

Actualmente dos teorías intentan explicar la diversidad genética en general, y la enzimática, en particular, en la naturaleza (Lewontin, 1974; Nei, 1975): Las teorías seleccionistas y la teoría neutralista. Otra tercera teoría, la del cambio balanceado (Wright, 1970, 1977, 1978), intenta combinar fuerzas estocásticas y determinísticas para explicar la variación a nivel genotípico.

### 3.3.1 Teoría seleccionista

Existen una serie de datos que, para los partidarios de esta teoría, probarían el valor adaptativo de los polimorfismos enzimáticos. Entre estas observaciones podemos señalar: Las variaciones estructurales y funcionales de los aloenzimas (Jhonson, 1974; Harris et al; 1977, Koehn y Eanes, 1978) la variación geográfica que las frecuencias de determinados alelos (Clegg y Allard, 1972; Allard, 1975; Stubert et al., 1977; Kahler et al., 1980) y la relación existente entre la variación genotípica y el control homeostático de los organismos (Gillespies y Langley, 1974).

Serían varias formas de selección equilibrada, que implican diferencias en la viabilidad y fertilidad entre genotipos, las que se han sugerido como mecanismos que favorecen el mantenimiento del polimorfismo enzimático. Entre estos mecanismos se encuentran:

La heterosis o sobredominancia de los heterocigotos (Mitton y Koehn, 1975; Clegg et al., 1976), selección dependiente de las frecuencias y densidad (Jain y Jain, 1970; Clarke, 1975, 1979; Synder y Ayala 1979), selección relacionada con la heterogeneidad ambiental y temporal (Brown et al., 1976; Nevo et al., 1981). La selección disruptiva, también puede jugar un papel importante en el mantenimiento

del polimorfismo enzimático favoreciendo diferentes genotipos en diferentes subambientes. (McDonald y Ayala, 1974).

### 3.3.2 Teoría neutralista

Esta teoría expuesta inicialmente por Kimura (1968, 1979) Kimura y Ohta (1971), Nei (1975), propone que la mayor parte de los electromorfos encontrados no tendrían ventajas selectivas, sino que serían selectivamente equivalentes entre sí y con eficiencia funcional equivalente.

De esta forma, el polimorfismo existente en las poblaciones naturales sería el resultado de distintos procesos al azar, tales como la velocidad de mutación, deriva genética y migración al azar (Kimura, 1968, 1969; Kimura y Ohta, 1969; Kimura y Muruyama, 1971). Asimismo, el tamaño efectivo de las poblaciones es un factor de gran importancia dentro de la teoría neutralista.

Según la teoría neutralista (Kimura, 1979) la selección darwiniana actuaría a nivel fenotípico, principalmente mediante la acción del ambiente sobre los poligenes, mientras que a nivel genotípico, el polimorfismo molecular es invisible a la acción de la selección natural, y sólo sería mantenido principalmente por acción de la deriva.

La controversia neutralismo versus seleccionismo permanece actualmente (Nei, 1980), aunque como señala Powel (1975) ambas teorías no son incompatibles, ya que ninguna pretende explicar todos los casos de polimorfismo enzimáticos analizados.

Además, como ha apuntado Hartl (1981), el problema podría simplificarse, y la dicotomía entre alelos neutros y selectivos sería artificial, si los alelos pudieran cambiar su signo selectivo, no sólo con el ambiente externo sino también con el fondo genético interno (Dykhuizen

y Hartl, 1980; Hartl y Dykhuizen, 1981) y según fuera la jerarquía dentro de las distintas unidades susceptibles de selección (Bargiello y Grossfield, 1979 ).

#### 3.4 Variación geográfica de aloenzimas en poblaciones naturales

En general, todas las especies que viven a lo largo de un gran área geográfica que comprende distintos ambientes, presentan variación entre poblaciones y dicha variación puede afectar a varias características: morfológicas, fisiológicas, cromosómicas, bioquímicas etc. Las diferencias entre poblaciones interespecíficas pueden ser mantenidas incluso en distancias extremadamente cortas (Antonovics y Bradshaw, 1970; Gartside y McNeilly, 1971).

La diferenciación aloenzimática entre poblaciones de una misma especie ha sido descrita en varias especies como Avena barbata (Clegg y Allard, 1972; Kahler, et al., 1980) en Hordeum spontaneum y Triticum dicoccoides (Nevo et al., 1979, 1982) y en Oenothera (Levy et al., 1975; Levy y Levin, 1975), encontrándose que dichas variaciones estaban asociados con factores climáticos.

Existen varios factores que pueden influir en la cantidad de diferenciación geográfica. Así, se encuentra que las especies autofecundantes muestran mayor grado de diversidad entre poblaciones que las alógamas (Brown, 1979). Igualmente la diferenciación es menos evidente en árboles que en plantas herbáceas (Brown y Moran, 1979). A parte de factores bióticos como los señalados anteriormente, pueden existir igualmente factores o variables ambientales primarios como clima y suelo que pueden influir en los patrones de diferenciación geográfica (Clegg y Allard, 1972; Stubber et al., 1977).

Como resultado de esta relación, factores ambientales-variación genética, se produce la formación de clinas, que bien pueden ser espaciales o temporales (Bermann, 1975; Levy et al., 1975; Rick et al., 1977; Stubber et al., 1977).

Por otra parte, los estudios genéticos comparativos realizados entre poblaciones marginales y centrales del área de distribución de algunas especies de Drosophila, basados en estudios aloenzimáticos, no muestran que exista un descenso de variación génica en las áreas marginales respecto a las centrales, como sucede en el caso de los polimorfismos cromosómicos presentes en dichas especies (Prakash, Lewontin y Hubby; 1969; Prakash, 1973; Zouros et al., 1974). Sin embargo, en estudios llevados a cabo en poblaciones de especies de vertebrados se ha podido demostrar que ocurre un descenso en la cantidad de variación en las poblaciones marginales (Soulé, 1973).

En plantas, los resultados encontrados en este sentido son a menudo contradictorios. Así, Keeler (1978) encuentra que las poblaciones marginales de Veronica peregrina muestran un aumento en la cantidad de variación genética con respecto a las poblaciones centrales. Dichas diferencias se deberían a las condiciones de heterogeneidad ambiental temporal a las que dichas poblaciones estarían sometidas. Por el contrario, estudios realizados en Hordeum jubatum por Shumaker y Babble (1980) revelan que poblaciones de hábitats marginales, que tienen una alta identidad genotípica entre sí, tienen una menor variación genética que las poblaciones de las áreas centrales. Esta misma situación ocurre en poblaciones de Rumex acetosella (Farris y Schaal, 1983).

Sin embargo, en general, las poblaciones geográficas de plantas están genéticamente muy poco diferenciadas entre sí. Gottlieb (1977) encuentra que las poblaciones conespecíficas de plantas presentan una identidad media de

$I = .95 \pm .02$ , que, a su vez, es muy parecida a la identidad que presentan las poblaciones de especies animales.

Si las distancias genéticas existentes entre poblaciones están directamente relacionadas con el tiempo transcurrido desde su separación, los dendrogramas que se pueden construir a partir de ella pueden interpretarse como filogenias moleculares del grupo en estudio (Nei, 1975). Si estas distancias están en relación con los procesos de adaptación a cada ambiente sufridos por las poblaciones, entonces, para que los dendrogramas puedan ser interpretados como filogenias, ha de suponerse que los caracteres considerados han evolucionado a una tasa aproximadamente constante (Dobzhansky et al. 1980).

La distribución de las frecuencias de electromorfos entre poblaciones ha sido comúnmente usada para inferir el papel de la selección natural en el mantenimiento de la variación en la naturaleza (Aquadro y Avise, 1982). Así, la uniformidad geográfica de las frecuencias de electromorfos en muchos loci de Drosophila acompañados de heterogeneidad geográfica en otros loci, ha sido usado como evidencia del importante papel que la selección natural juega en el mantenimiento del polimorfismo (Ayala et al., 1972; Ayala y Tracey, 1974; Ayala, 1982).

Alternativamente, se ha sugerido que esta uniformidad geográfica podría deberse al resultado de la acción del flujo génico entre poblaciones, que actuaría homogenizando las frecuencias de electromorfos (Kimura y Maruyama, 1971; Maruyama y Kimura, 1974).

Sin embargo, y como señalan Butlin et al., (1982) actualmente el grado de diferenciación entre poblaciones es informativo solamente, y no es posible aclarar el posible valor adaptativo que dicha diferenciación entre poblaciones puede desempeñar.

REVISION  
BIBLIOGRAFICA

Revisión bibliográfica sobre *Muscari comosum*

*Muscari comosum* (L) Miller, es una especie bulbosa perteneciente, para algunos autores, al subgénero *Leopoldia* (Parl.) Zahar del género *Muscari* (Miller), o al género *Leopoldia* (Parl.) (Liliaceae) (véase Tutin et al., 1980; y Garbari y Greuter, 1970, respectivamente, para uno u otro criterio taxonómico).

Esta especie tiene una extensa área de distribución geográfica, la mayor de las especies del subgénero *Leopoldia*, grupo constituido por varias especies, la mayoría de distribución muy restringida. El área de distribución de *M. comosum* coincide con la tipificada por Jäger (1972) y que denomina de "tipo *Nigella*", comprendiendo Europa media y meridional Asia occidental, Egipto, el Norte de Africa, llegando hasta las Islas Canarias.

Este área de distribución está delimitada por ciertas líneas climáticas como son:

- La precipitación anual media de 100 mmls. marca el límite meridional.
- Los límites Norte y Oeste están señalados por la temperatura media de primavera de 12° C en Mayo.
- Los límites Norte y Este están marcado por una temperatura media en verano de 16° C en Julio.

Los hábitats donde normalmente se desarrolla esta especie son praderas secas y suelos cultivados y, en general, aquellos suelos que están influenciados por actividades agrícolas. Desde el punto de vista edáfico parece no tener ninguna demanda especial en las condiciones del suelo.

Presenta gran variedad fenotípica, siendo el rango de variación dentro de poblaciones tan grande como entre poblaciones (Bentzer, 1973;



Tutin et al., 1980).

Respecto a las características biológicas que esta especie presenta podemos señalar que su sistema reproductivo, en las poblaciones naturales, es de tipo sexual. En la naturaleza no se ha observado que se reproduzca asexualmente (Garbari, com. per.). Sin embargo, Bentzer (1972) observó que, ocasionalmente, cuando se cultiva en el laboratorio puede presentar reproducción asexual.

La fecundación en poblaciones naturales es realizada por insectos (Knoll, 1921). El comportamiento de los insectos polinizadores favorece la fecundación cruzada. En un estudio realizado por Pérez (1982) en seis poblaciones de Sierra Nevada (Granada), utilizando dos marcadores isoenzimáticos, se estimó que, aproximadamente, y como mínimo, la mitad de las semillas de M. comosum provienen de fecundación cruzada. Posteriormente, López Alonso (1984) analizando tres poblaciones de esta misma especie, y utilizando un solo marcador isoenzimático ha determinado que la tasa de alogamia en esta especie es muy cercana a uno.

Por otra parte, la acción del hombre ha tenido gran importancia en el proceso de distribución de esta especie. Esta acción se ha podido ejercer en dos sentidos:

- El primero, ejercido de un modo indirecto, ha podido consistir en la acción homogenizadora, de los ambientes en que esta especie se desarrolla. El hombre, mediante las actividades agrícolas, homogeniza los ambientes en los que habitualmente vive esta especie, como ya hemos señalado.

- El segundo tipo de acción, ejercido de un modo directo, consiste en el transporte que el hombre ha podido realizar de las semillas de M. comosum, como acompañante de semillas agrícolas, p. ej., lo que de algún modo ha podido contribuir a la homogenización de las poblaciones.

### Variabilidad genética de *Muscari comosum*

Los primeros intentos por aclarar la variabilidad genética existente en las poblaciones naturales de esta especie, se realizaron solamente desde el punto de vista cromosómico.

En este sentido, han sido numerosos los recuentos cromosómicos realizados en individuos de esta especie; tales recuentos se han efectuado en poblaciones de casi toda su área de distribución (véase Garbari, 1966; 1969; Bentzer, 1972; Ruiz Rejón et al. 1980; Ruiz Rejón y Oliver, 1981).

El número cromosómico normal reseñado en todos estos análisis es el de  $2n = 18$ . Sin embargo, se han encontrado algunas variaciones respecto al número cromosómico mencionado. Así, Bentzer (1972) encuentra dos poblaciones en la Isla de Creta cuyos individuos eran triploides  $2n = 3x = 27$ . Este número fue encontrado por Ruiz Rejón et al., 1980 en un individuo de una población española.

Además de estas variaciones numéricas, *Muscari comosum* presenta dos polimorfismos estructurales estables en la segunda pareja de su cariotipo. Concretamente, Garbari (1966, 1969) detecta, por primera vez, en poblaciones italianas un polimorfismo para la posición del centrómero en los cromosomas de la segunda pareja, describiéndolo como originado por una inversión pericéntrica, pero sin realizar un análisis citogenético que confirme esta hipótesis.

Este mismo polimorfismo fue encontrado en poblaciones griegas por Bentzer (1972) y Bentzer y Ellmer (1975), y en poblaciones españolas por Ruiz Rejón et al. (1980); Ruiz Rejón y Oliver (1981) y García (1981).

El segundo de los polimorfismos fue descrito por Bentzer y Ellmer (1975) y consiste en una heterocigosis estructural para el tamaño cromosómico de la segunda pareja, atribuido a una duplicación cromosómica.

Asimismo, este polimorfismo ha sido observado en poblaciones

españolas por García (1981); Ruiz Rejón et al., (1980) y Ruiz Rejón y Oliver, (1981).

Estos últimos autores llegan a las siguientes conclusiones, en relación con estos dos polimorfismos:

-1º Al estar tan extendidos, es posible pensar que el origen de los mismos sea muy antiguo, y que puedan tener un valor adaptativo para la especie.

- 2º Existen diferencias significativas en las frecuencias cromosómicas para las reordenaciones entre las poblaciones griegas y españolas, que quizás se deban a factores históricos y/o adaptativos.

- 3º Las diferencias en las frecuencias cromosómicas de algunas poblaciones griegas se explican por la acción de la deriva genética.

- 4º En cambio, las frecuencias cromosómicas de algunas poblaciones españolas únicamente se explican si están mantenidas mediante selección a favor de algunos citotipos.

Por su parte, García (1981), estudiando seis poblaciones de Sierra Nevada (Granada), encuentra que, aunque las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, éstas se diferencian entre sí. Asimismo, no encuentra que exista correlación entre la altitud y las frecuencias de inversión.

Por otra parte, en esta especie se han realizado análisis de la variabilidad génica en varios sistemas enzimáticos.

Así, Pérez (1982), estudiando diferentes sistemas enzimáticos (seis loci) en seis poblaciones de Sierra Nevada, encuentra que M. comosum presenta gran variabilidad en todas las poblaciones analizadas.

El número medio de alelos por locus es de  $(A) = 2.22 \pm .14$  y la heterocigosis media  $(H) = .22 \pm .06$ .

Igualmente dicha autora no encuentra que exista correlación alguna entre la altitud y la variabilidad genética que presenta esta especie. El mecanismo propuesto para mantener dicha variabilidad es la heterosis, al menos en algunos casos.

Posteriormente, Pascual (1983), estudiando once poblaciones de M. comosum de la Península Ibérica, analiza el control génico de varios sistemas enzimáticos (Alcohol deshidrogenasa, Glutamato oxalo-acetato transaminasa y Esterasas). Este estudio se llevó a cabo, para analizar, a nivel bioquímico, las diferencias existentes entre M.comosum y una nueva especie, denominada Muscari matritensis (Ruiz Rejón et al., 1984).

Pascual(1983)encuentra que M. comosum presenta en dichas poblaciones niveles de variabilidad genética similares a los que presenta en las poblaciones de Sierra Nevada.

A partir de las frecuencias génicas observadas en cuatro loci encuentra que, entre las poblaciones hispanas de M. comosum, existe una identidad genética media de  $I = .992 \pm .004$  y una distancia genética media de  $D = .0079$  (I y D de Nei, 1972).

OBJETIVOS

## Objetivos

Con este trabajo se ha pretendido analizar la naturaleza, distribución y significado evolutivo de los mecanismos de variabilidad cromosómica y génica existentes en las poblaciones de M.comosum L., una especie de amplia distribución en el Mediterráneo.

Concretamente los objetivos propuestos son:

1º Analizar la naturaleza de los fenómenos citogenéticos que originan la variabilidad cromosómica previamente detectada en la segunda pareja del cariotipo de esta especie.

2º Una vez aclarada su naturaleza, hemos intentado determinar los efectos que tales reordenaciones cromosómicas ejercen, a varios niveles:

- a) A nivel de formación de quiasmas en la propia segunda pareja.
- b) A nivel de formación de quiasmas en el resto del cariotipo.
- c) Analizar la posible creación de supergenes por medio de tales reordenaciones y, con ello, su posible asociación a marcadores bioquímicos.

3º El tercer objetivo que hemos pretendido con este trabajo ha sido el de analizar la posible diferenciación geográfica que presentan los polimorfismos cromosómicos de la segunda pareja del cariotipo. Para ello se han cuantificado dichos polimorfismos en 22 poblaciones, que van desde Grecia hasta las Islas Canarias, pasando por Italia continental, Sicilia, Francia, Islas Baleares y Península Ibérica.

4º Asimismo, se ha analizado la posible diferenciación geográfica existente entre 18 de estas poblaciones para seis loci génicos.

5º Cuantificada la variabilidad cromosómica y génica existente en las poblaciones naturales de M.comosum, y la posible relación entre una y otra, nos hemos interesado en averiguar las posibles causas del mantenimiento y distribución de la variabilidad. En este sentido hemos intentado averiguar, sobre todo, el significado adaptativo de la variabilidad genética que presenta M. comosum.

MATERIAL

Y

METODOS



#### 4 MATERIAL Y METODOS

##### 4.1 MATERIAL

En la realización de este trabajo hemos analizado 23 poblaciones de Muscari comosum (Tabla 1 y Fig.1). Estas poblaciones se extienden desde Grecia hasta las Islas Canarias, a lo largo de países del área del Mar Mediterráneo y Océano Atlántico.

En este análisis se incluyen, concretamente, muestras de Grecia continental, Italia continental, Sicilia, Francia, Islas Baleares, Península Ibérica y Canarias. Se analiza un conjunto de poblaciones que se pueden considerar como una muestra representativa de Muscari comosum en el área mencionada (Fig. 1).

La recogida de material ha sido realizada personalmente, o bien por diversas asociaciones botánicas internacionales, o personas particulares (Véase agradecimientos). Estas recolecciones se han llevado a cabo durante los años 1980, 1981 y 1982.

En nuestro estudio, que ha comprendido los puntos de vista génico y citogenético, hemos usado distintos materiales. Así el análisis citogenético, tanto de mitosis como bandeo cromosómico, lo hemos realizado en meristemas apicales de raíces, que se han obtenido por medio de cultivo de los bulbos en bandejas con agua que se renovaba, para impedir su empobrecimiento en nutrientes. El análisis meiótico lo hemos realizado en yemas florales fijadas directamente en el campo, y que eran mantenidas a baja temperatura (4° C) hasta su estudio. En este caso, las yemas florales proceden de una población española, Silleta (Sierra Nevada).

En la tabla 2 se muestran las poblaciones analizadas citogenéticamente, así como el número de individuos estudiados por población.

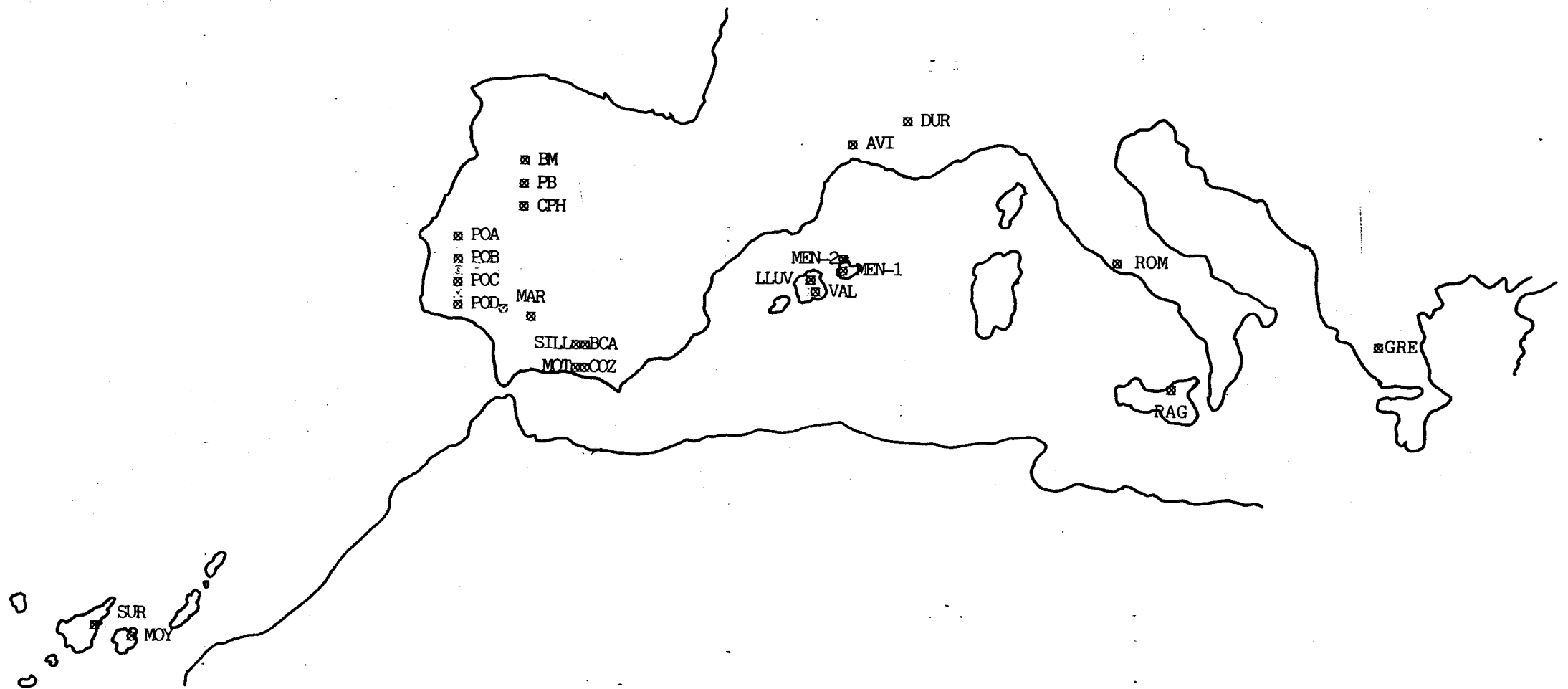


Fig. 1: Localización geográfica de las distintas poblaciones analizadas

Tabla 1: Poblaciones naturales de *Muscari comosum* analizadas.

<u>Población</u>	<u>País</u>	<u>Clave</u>
Gargalioni	Grecia (continental)	GRE
Ragusa (Sicilia)	Italia	RAG
Roma	Italia	ROM
Avignon	Francia	AVI
Durance	Francia	DUR
Mahón (Menorca)	España	MEN-1
Menorca (Menorca)	España	MEN-2
Lluví (Mallorca)	España	LLUV
Valldemosa (Mallorca)	España	VAL
Balcón de Canales (Granada)	España	BCA
Cozvíjar (Granada)	España	COZ
Motrilejo (Granada)	España	MOT
Silleta (Granada)	España	SILL
Marines (Huelva)	España	MAR
Puerto de Béjar (Salamanca)	España	PB
Cruce de Piedrahita (Salamanca)	España	CPH
Baños de Montemayor (Salamanca)	España	BM
Portugal	Portugal	POA
Portugal (Sin localización)	Portugal	POB
Portugal (específica)	Portugal	POC
Portugal	Portugal	POD
Moya (Gran Canaria)	España	MOY
Santa Ursula (Tenerife)	España	SUR

Tabla 2: Número de individuos de Muscari comosum analizados

<u>Población</u>	<u>Nº de indiv. analizados citogenéticamente</u>	<u>Nº de indiv. analizados electroforéticamente</u>
GRE	75	86
RAG	40	39
RÓM	35	47
AVI	33	36
DUR	39	50
MEN-1	17	19
MEN-2	13	13
LLUV	49	58
VAL	23	25
BCA	32	26
COZ	50	58
MOT	51	59
SILL	32	-
MAR	24	-
PB	80	-
CPH	50	-
BM	35	-
POA	37	41
POB	44	44
POC	39	45
POD	36	47
MOY	30	33
SUR	20	23
Total	884	749

El análisis isoenzimático se realizó en raíces y semillas. Las raíces se obtuvieron, como anteriormente se ha descrito, mediante cultivo hidropónico. Las semillas proceden de fecundación en poblaciones naturales. Las poblaciones, y los individuos analizados electroforéticamente por población, se recogen en la tabla 2.

## 4.2 METODOS

### 4.2.1 Técnicas citogenéticas

#### 4.2.1.1 Estudio de la mitosis

Las raíces obtenidas a partir de los bulbos, se cortan con una longitud de 10-20 mms. y se someten al siguiente tratamiento:

- Pretratamiento con 8-hidroxiquinoleína 2mM, aproximadamente durante tres horas.
- Fijación; se realiza en alcohol: acético 3:1, y en este fijador permanecen hasta el momento de su análisis, en frigorífico a 4° C.
- Hidrólisis; se realiza durante 4-5 minutos. Las raíces son mantenidas en CLH 1N a 60° C.
- Coloración mediante orceína acética al 2% durante 30-60 minutos, aproximadamente.
- Aplastamiento (squash): una vez coloreada la raíz, ésta se deposita en un porta-objetos, separando el meristemo del resto del tejido. El meristemo es aplastado en orceína acética fresca.
- Observación; realizada en un microscopio CARL ZEISS. Las fotografías se realizaron con película Kodak Imagecapture, AHU 5460.

#### 4.2.1.2 Estudio de la meiosis

Las yemas florales, fijadas en el campo en alcohol:acético 3:1, se someten para su estudio al siguiente tratamiento:

- Pretratamiento: las yemas florales eran mantenidas durante 15-20 días en mordiente (disolución saturada de acetato férrico en acético glacial- alcohol absoluto, 1:1).

- Disección de las flores individuales en una lupa para la obtención de las anteras.

- Las anteras se pasan a un porta-objetos sobre una gota de carmín acético, donde son aplastadas directamente.

- Observación al microscopio.

#### 4.2.1.3 Técnica de bandas C

Las raíces eran sometidas a pretratamiento con 8- hidroxiquinoleína 2mM, aproximadamente durante 3 horas . Estas raíces se fijan en alcohol: acético 3:1, que era cambiado cuatro o cinco veces, en el transcurso de las 24 horas siguientes al tratamiento con 8- hidroxiquinoleína, a fin de facilitar una fijación perfecta.

El proceso de bandeo C seguido es el siguiente:

- Las raíces se someten a la acción de una disolución de celulasa-pectinasa al 1% en tampón citrato a pH 4.7 durante una hora a 37° C.

- Aplastamiento: la preparación se realiza por aplastamiento del meristemo apical en acético al 45%.

- Separación del cubre- objetos por medio de nieve carbónica.

- Las preparaciones son mantenidas en CLH 0.2 N a 20° C durante 30 minutos.

- Las preparaciones se introducen en una disolución saturada de hidróxido bórico ( $Ba(OH)_2$ ) a 60° C durante 12 minutos.

- Se lavan enérgicamente en agua de grifo.
- Se introducen las preparaciones en 2 X SSC a 60° C durante una hora y 30 minutos.
- Se lavan nuevamente en agua de grifo.
- Se tiñe con Giemsa al 2% durante 5 minutos.

Las preparaciones se hicieron permanentes montándolas en Depex.

#### 4.2.2 Técnicas de electroforesis

Este apartado ha comprendido el análisis electroforético de las enzimas: Alcohol deshidrogenasa (ADH, E.C. 1.1.1.1); Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, E.C. 2.6.1.1); Glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.4.1.3) e Isocitrato deshidrogenasa (IDH, E.C. 1.1.4.2).

##### 4.2.2.1 Preparación de las muestras

La extracción enzimática era realizada por aplastamiento directo de raíces y semillas sobre rectángulos de papel Watman nº 3 de dimensiones de 9 x 3 mm., procurando que quedaran bien empapados con el extracto.

Estos papeles eran introducidos en una ranura practicada a lo largo del gel a unos cuatro cm. del extremo catodal.

##### 4.2.2.2 Preparación del gel

El almidón de patata utilizado era hidrolizado por nosotros, siguiendo las técnicas de Moretti et al., (1957), a partir de fécula de patata comercial.

Los geles eran preparados un día antes de su uso, dejándolos enfriar a temperatura ambiente. Siempre se hicieron a una concentración

que variaba entre el 10 y el 12 %. Los geles, una vez enfriados, se recubrían con un trozo de plexiglás.

Los geles incluidos en un molde de 19 x 21 x 1 cm. permiten obtener hasta cuatro láminas, pudiéndose estudiar en cada una de ellas un sistema enzimático diferente.

#### 4.2.2.3 Electroforesis

Hemos usado las técnicas de electroforesis en gel horizontal de almidón desarrolladas por Smithies (1955), y aplicadas posteriormente al análisis de isoenzimas por Hunter y Markert (1957).

La electroforesis se llevó a cabo según el método discontinuo descrito por Selander et al., (1971). Como puentes se utilizaron esponjas de 4 mm. grosor, colocando ambos extremos del gel distando entre si unos 9 cm.. La electroforesis se realizó a 200 V y 50 mA. Como indicador de la migración utilizamos azul de bromofenol.

El gel es mantenido refrigerado; para ello se coloca encima de él una bandeja con hielo y, además, durante todo el proceso el equipo de electroforesis se mantiene dentro de un frigorífico a 4° C.

#### 4.2.2.4 Soluciones tampón

Para todos los sistemas enzimáticos hemos utilizado el mismo método discontinuo de Selander et al., (1971), que utiliza como tampón de gel Tris - citrato 0.05 M pH 8.3 y como tampón de electrodos LiOH-borato 0.02 M pH 8.1.

##### Composición de los tampones

Tampón electrodos: Solución A pH 8.1

Tampón gel: 1:9 Solución A y B pH 8.3



## Solución A pH 8.1

0.03 M LiOH	1.2 gr
0.19 M Ac. Bórico	11.89 gr
Agua desionizada	1000 cc

## Solución B pH 8.4

0.05 M TRIS	6.2 gr
0.008 M Ac. Cítrico	1.6 gr
Agua desionizada	1000 cc

4.2.2.5 Sistemas de incubación y coloración

Una vez terminado el recorrido electroforético, el gel se corta en láminas de 2mm de espesor. Estas láminas se colocan en las bandejas de incubación, donde ponemos los diferentes tampones de coloración para los distintos enzimas que se han analizado.

En el presente trabajo hemos analizado cuatro sistemas enzimáticos mediante las técnicas de tinción que se describen a continuación, todas ellas facilitadas por Wendell(1980).

## 1.- Alcohol deshidrogenasa (ADH, E.C. 1.1.1.1)

3 ml etanol

15 mg NAD

15 mg NBT

1 mg PMS

50 ml tampón TRIS-ClH 0.2 M pH 8.0

## Composición del tampón TRIS-ClH

TRIS 0.2 M 24.2 gr

Agua desionizada 1000 ml

## 2.- Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, E.C. 2.6.1.1)

25 ml de solución substrato

25 ml Agua desionizada

50 mg Fast Blue BB

50 mg Fast Blue BB

Composición de la solución substrato

532 mg L-aspártico

2 gr PVP-40

146 mg alfa-cetoglutárico

200 mg EDTA

5.68 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

200 ml Agua desionizada

Se ajusta a pH 7.4 con ClH 1 N o NaOH

3.- Isocitrato deshidrogenasa (IDH, E.C. 1.1.4.2)

100 mg Isocitrato

10 mg NBT

1 mg PMS

50 mg  $\text{MgCl}_2$

50 ml tampón TRIS-ClH 0.2 M pH 8.0

4.- Glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.4.1.3)

3 ml 1 M L-glutámico

15 mg NAD

15 mg NBT

1 mg PMS

50 ml tampón TRIS-ClH 0.2 M pH 8.0

Estos cuatro sistemas enzimáticos, una vez añadida la solución substrato, se coloreaban incubándolos en la estufa a 37° C, durante un tiempo que variaba entre 15 y 30 minutos.

4.2.2.6 Fijación y conservación

Una vez terminados de colorear, los geles son lavados en agua del grifo, y fijados en una solución de agua, metanol y ácido acético (5:5:1).

Los geles, después de fijados, fueron fotografiados y conservados en el frigorífico envueltos en plexiglás.

### 4.3 Métodos estadísticos

Para estimar el grado de significación de algunos de los caracteres que han sido cuantificados se han aplicado las siguientes pruebas estadísticas:

- Ji-cuadrado (simple y de contingencia).
- Contraste de medias (T de Student).
- T de Student con transformación angular de los datos ( $T_s$  para frecuencias normalizadas (Sokal y Rohlf, 1961)).

#### 4.3.1 Cálculo de las frecuencias cromosómicas y génicas

Para la estimación de las frecuencias cromosómicas y génicas se ha utilizado el método de máxima verosimilitud de Fisher (1921).

Este método es aplicable cuando se quieren estimar variables (frecuencias cromosómicas y génicas en nuestro caso) que hagan máxima la función de verosimilitud construida a partir de los valores que hemos observado (frecuencias genotípicas). El valor puede ser determinado matemáticamente, utilizando el cálculo diferencial o bien mediante iteración.

El resultado así obtenido será el más parecido (más verosímil) a las frecuencias génicas o cromosómicas existentes en la población, de todos los que se pueden estimar a partir de la muestra analizada.

Estos cálculos se han realizado por iteración, utilizando el programa MAXLIK de estimación general por máxima verosimilitud escrito en Fortran IV de Reed y Schull (1968).

#### 4.3.2 Medidas de la variabilidad genética

Las técnicas electroforéticas nos aportan información sobre la va-

riabilidad genética de una población. Dicha variabilidad puede ser cuantificada mediante varios estadísticos:

La medida más informativa sobre la variabilidad genética de organismos con reproducción sexual es la heterocigosis ( $H_i$ ) que es la proporción de individuos heterocigotos por locus. El grado de heterocigosis por población (H) se estima promediando para todos los loci la proporción de individuos heterocigotos observados en cada locus.

También hemos calculado el número medio de alelos por locus (A) y la proporción de loci polimórficos (P), según los criterios del 0.95 y del 0.99 (un locus se considera polimórfico si la frecuencia del alelo más frecuente no es superior a 0.95 ó 0.99, respectivamente).

#### 4.3.3 Análisis de la estructura de poblaciones

Hemos analizado la estructura genética de las poblaciones mediante los estadísticos F de Wright (1965); tres son los estadísticos utilizados y cada uno de ellos describe tres aspectos :

1)  $F_{IS}$  representa la desviación respecto de las proporciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. Un valor positivo de  $F_{IS}$  se asocia con deficiencias de heterocigotos y sugiere autofecundación. Este estadístico puede tomar valores desde -1 a +1.

El cálculo de  $F_{IS}$  se realiza a partir de los valores de los índices  $F_i$  de cada población .

$$F_i = 1 - H_i / 2p_i q_i N_i$$

Donde  $H_i$  es el número de heterocigotos existentes en la población i,  $p_i$  y  $q_i$  son las frecuencias alélicas o cromosómicas en dicha población. A partir de estos valores de  $F_i$  calculamos  $F_{IS}$

$$F_{IS} = \sum_{i=1}^r N_i / N F_i$$

Donde  $N$  es la suma de individuos analizados en el total de las poblaciones,  $N_i$  es el número de individuos de cada población y  $F_i$  el valor del estadístico  $F_i$  de cada población.

No se ha realizado ninguna corrección, ya que siempre el número de individuos en cada población es mayor de diez.

Este estadístico se utiliza generalmente para un locus con dos alelos; en aquellos casos en que el locus es multialélico, como es el caso de la ADH, se toma un alelo común y otro que represente todos los demás. Con este procedimiento se pierde cierta información, pero es un requerimiento del modelo.

2)  $F_{ST}$  representa el grado de diferenciación entre subpoblaciones. Su formulación es:

$$F_{ST} = \sigma^2 / \hat{p} \hat{q}$$

Donde  $\sigma^2$  representa la media ponderada de las desviaciones típicas de las frecuencias génicas o cromosómicas de una población individual respecto de las frecuencias medias del total de poblaciones, y su cálculo es:

$$\sigma_p^2 = \sum_{i=1}^K (\hat{p} - p_i)^2 / K$$

$\hat{p}$  es la frecuencia media del alelo u ordenación en la población total ( $\hat{p} = 1 - \hat{q}$ );  $p_i$  es la frecuencia del alelo u ordenación cromosómica calculada en la población individual;  $K$  es el número de poblaciones analizadas.

El valor de  $F_{ST}$  puede variar entre 0 y 1.

3)  $F_{IT}$  nos da una estimación de la desviación respecto de las proporciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, para el total de las poblaciones. Su cálculo lo hemos realizado por el método directo cuya formulación es:

$$F_{IT} = 1 - H_t / H_e$$

Donde  $H_t$  es el número total de heterocigotos observados para un locus dado, en el conjunto de todas las poblaciones, y  $H_e$  es el número de heterocigotos esperado, basado en las frecuencias alélicas medias en el total de las poblaciones.  $F_{IT}$  puede tomar valores entre -1 y +1.

Este análisis ha sido realizado mediante un programa preparado expresamente por los licenciados Eugenio Martín y María González, realizado en Basic y ejecutado en un ordenador CBM-4032 en el Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias de Granada

#### 4.3.4 Cálculo de la distancia genética

La distancia genética es una medida de la divergencia genética total a nivel de frecuencias génicas o cromosómicas entre dos poblaciones, grupos o especies.

Para la medida de la diferenciación genética entre las poblaciones de M. comosum se han utilizado los índices de distancia de Prevosti (1974), para los datos cromosómicos y génicos, y el índice de distancia genética no sesgada de Nei (1978) para el cálculo de distancias con frecuencias génicas, solamente.

El índice de distancia genética de Prevosti es un índice general de diferenciación que tiene la siguiente formulación:

$$D = 1/2 r \sum_{j=1}^r \sum_{k=1}^{s_j} (p_{1jk} - p_{2jk})$$

Donde  $r$  es el número de cromosomas o de loci considerados,  $p_{1jk}$  y  $p_{2jk}$  las frecuencias de la reordenación o alelo  $j$  en las poblaciones 1 y 2, respectivamente, y  $s_j$  es el número de las diferentes reordenaciones o alelos considerados.

EL valor de  $D$  puede variar entre 0 y 1, y expresa directamente la diferenciación genética entre dos poblaciones, sin hacer conclusiones previas sobre el origen de dicha diferenciación, siendo un buen punto de partida para poder establecer comparaciones con los resultados obtenidos por otros métodos en los que se trata de valorar los efectos que ejercen determinados factores en la diferenciación genética (Prevosti et al., 1975).

El índice de distancia genética no sesgada de Nei  $\hat{D}$  (1978) es una modificación del índice desarrollado por este mismo autor  $D$  (Nei, 1972) para estimar el número de sustituciones alélicas acumuladas por locus que se han dado en la evolución separada de dos poblaciones, existiendo una sustitución alélica cuando un alelo es reemplazado por otro diferente o cuando un grupo de alelos es reemplazado por otro grupo diferente.

La distancia genética media vendrá dada por:

$$D = -\ln I_{xy}$$

Siendo  $I_{xy}$  el índice de identidad genética media entre las poblaciones  $x$  e  $y$  que viene dada por la fórmula:

$$I_{xy} = J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}$$

Donde  $J_{xy}$  es la media aritmética sobre el total de los loci de  $\sum x_i y_i$ ,  $J_x$  es la media aritmética sobre todos los loci de  $\sum x_i^2$ , y  $J_y$  es la media aritmética sobre todos los loci de  $\sum y_i^2$ , siendo  $x_i$  e  $y_i$  las frecuencias del alelo  $i$  en las poblaciones  $x$  e  $y$ , respectivamente.

El índice de distancia genética no sesgada de Nei  $\hat{D}$  (1978) permite obtener valores de distancia genética no sesgados, cuando se utilizan muestras pequeñas, su formulación es:

$$\hat{D} = -\ln \left( \hat{G}_{xy} / \hat{G}_x \hat{G}_y \right)$$

Siendo  $\hat{G}_x$  la media aritmética para el total de los loci de  $(2nxjx-1)/(2nx-1)$ ,  $\hat{G}_y$  la media aritmética para el total de los loci de  $(2nyjy-1)/(2ny-1)$  y  $\hat{G}_{xy} = J_{xy}$ .

La distancia genética  $D$ , puede variar desde el valor cero (no se ha producido ningún cambio alélico) hasta infinito;  $D$  puede ser mayor de 1 debido a que cada locus puede experimentar sustituciones alélicas completas más de una vez a medida que prosigue la evolución durante largos periodos de tiempo.

La distancia genética de Prevosti y la distancia no sesgada de Nei se calcularon mediante el programa BIOSYS-1 (Sowfford y Selander, 1981). Con los resultados de las matrices de distancias genéticas obtenidas mediante ambos índices, se construyeron sendos dendrogramas mediante el método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) (Sneath y Sokal, 1973).

#### 4.3.5 Análisis factoriales: Análisis de componentes principales y análisis de correspondencias

El análisis de correspondencias y el de componentes principales pertenecen al campo de la estadística descriptiva multidimensional.

Este tipo de análisis se utiliza cuando disponemos de datos estadísticos que solo se pueden representar en un espacio multidimensional, esto es un número importante de variables y observaciones, y por



tanto, resulta difícil la asimilación rápida de la información contenida en dicho conjunto de valores.

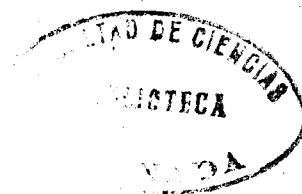
El análisis de componentes principales pretende explicar, en pocos factores o componentes, la mayor parte de la información que contienen las variables a analizar, sin fijar previamente ningún modelo de reducción. De esta forma, la información contenida en el espacio multidimensional se reduce a un espacio de dimensión menor, sin que la pérdida de información sea notable.

Los componentes principales se obtienen por rotación del sistema de ejes del espacio multidimensional, de forma que dichos componentes extraigan la máxima información posible en lo que se refiere a las relaciones entre las observaciones y midan la cantidad de varianza explicada por cada eje factorial, y la relación entre estos ejes y las variables de origen.

De esta forma, con los dos primeros componentes (I y II) se puede construir el plano de mayor varianza que representa, lo mejor posible, las distancias relativas entre las observaciones en el espacio multidimensional. Es de destacar, como característica principal de este análisis factorial, el que sus ejes factoriales se corresponden a direcciones independientes en el espacio las unas de las otras.

Para llevar a cabo este análisis hemos utilizado el programa BMDP-4M (Biochemical Computer Programs P-serie) (Dixon y Brown, 1979).

El análisis factorial de correspondencias (Hill, 1974; Benzecri, 1976; Mordia et al., 1979) es un método de ordenación que permite no solo la descripción de las diferentes poblaciones, sino que también incluye cada una de las variables analizadas en un mismo plano, lo que facilita la interpretación de los resultados.



El análisis factorial de correspondencias posee las siguientes propiedades, que justifican su utilización en nuestro análisis:

- Posee un buen poder de descripción de las tablas de números positivos .
- Cada variable interviene con un peso, que es el número total de individuos presentes en todas las observaciones.
- Utiliza una distancia ponderada entre dos puntos cualquiera del espacio multidimensional, es decir si dos puntos A y B se confunden en el espacio multidimensional, y se les considera un solo punto C, afectado de la suma de las masas de A y B, las distancias entre los demás puntos del espacio y C no cambian.

Para llevar a cabo los cálculos correspondientes nos hemos valido del programa ANACOR escrito en Fortran IV-H extended por Lebart y Fenelon (1975), que proporciona hasta tres factores.

El objetivo que hemos tratado de conseguir mediante el uso de estos dos métodos de análisis ha sido el de obtener representaciones alternativas de la diferenciación entre las distintas poblaciones a las que proporcionan los dendrogramas, basados en las medidas de distancia genética.

Los programas Maxlik, Biosys-1, Anacort y BMDP-4M, todos ellos escritos en lenguaje Fortran-IV, se ejecutaron en un ordenador DEC-VAX 11/780 del centro de Cálculo de la Universidad Autónoma de Madrid, con la ayuda del Dr. J. L. Oliver.

RESULTADOS

## 5. Resultados

### 5.1 Complemento cromosómico de *Muscari comosum*

El análisis mitótico que hemos llevado a cabo demuestra que los bulbos de *M. comosum* analizados en las poblaciones que se indican en la tabla 2, normalmente, presentan una dotación cromosómica de  $2n = 18$  cromosomas.

El cariotipo de *M. comosum* es claramente bimodal (Fig.2), comprendiendo dos grupos cromosómicos. El primer grupo está formado por las dos parejas mas largas, (L): la primera, de mayor tamaño que el resto de las parejas, es telocéntrica y la segunda pareja, de tamaño intermedio, presenta variabilidad respecto a su longitud y a la posición del centrómero. Dichos cambios producen variaciones en la morfología de la segunda pareja que puede ir desde metacéntrica a subtelocéntrica. Es frecuente la aparición en esta segunda pareja de una constricción secundaria localizada en el brazo de mayor longitud (Fig.2).

El segundo de los grupos cromosómicos comprende las siete parejas restantes; tres de tamaño intermedio (M), de morfología metacéntrica, y cuatro de menor tamaño (S) de morfología igualmente metacéntrica. Una de las parejas más pequeña presenta un satélite que debe de tener actividad de organizador nucleolar, tal como se deduce de su asociación al nucleolo durante la profase de meiosis (Fig.21). Para la denominación de los cromosomas hemos seguido el criterio de Levan et al., (1964).

Tan solo hemos encontrado cuatro individuos con variaciones respecto al número cromosómico normal de *M. comosum*,  $2n = 18$ . Así, en la población POA hemos detectado la existencia de un individuo que presentaba una trisomía ( $2n = 19$ ) para la primera pareja (Fig.3); en la población

Fig. 2.- Cariotipo de Muscari comosum, correspondiente a un individuo homocigoto para la inversión.

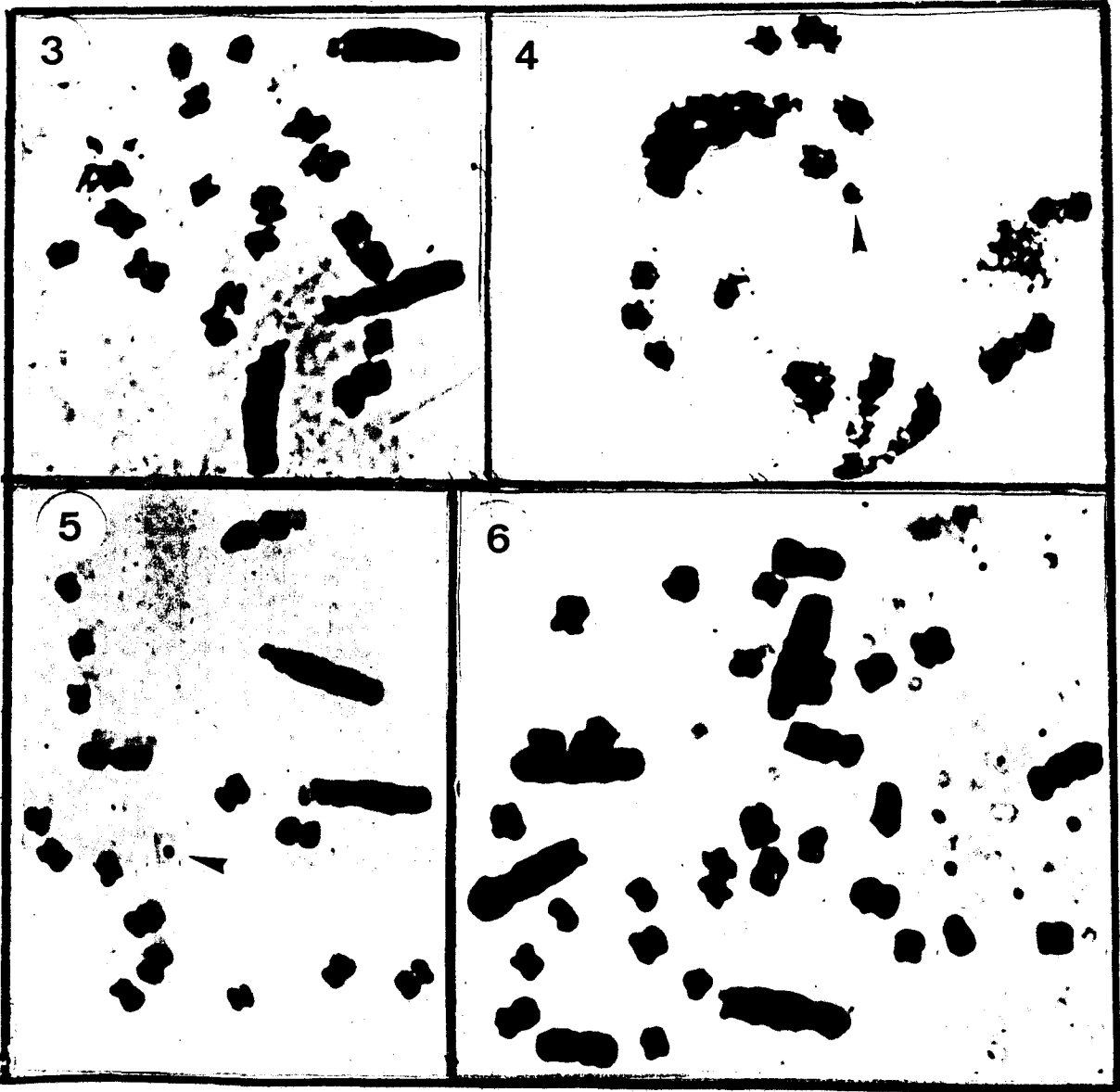
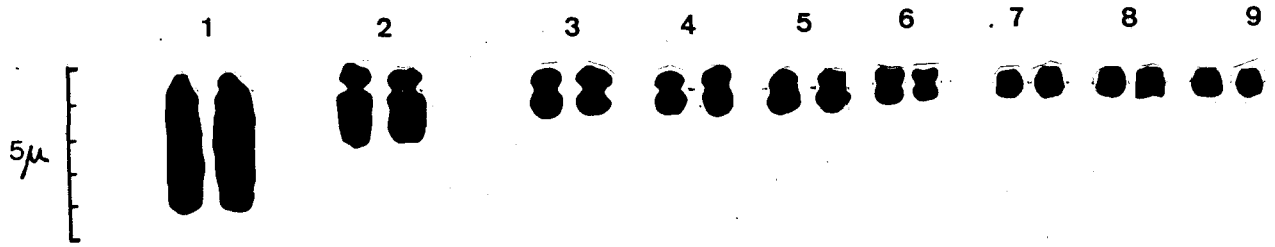
Fig. 3.- Metafase mitótica del individuo detectado en la población Portugal A (POA) con una trisomía para la primera pareja ( $2n=19$ ).

Fig. 4.- Diacinesis del individuo detectado en la población de Silleta (SIL) portador de un cromosoma accesorio ( $2n=19+1B$ ) (flecha).

Fig. 5.- Metafase mitótica del individuo detectado en la población de Gargalioni (GRE), portador de un cromosoma accesorio ( $2n=18+1B'$ ) (flecha).

Fig. 6.- Metafase mitótica del individuo tetraploide ( $2n=36$ ) detectado en la población de Portugal D (POD).

2



SILL existe un individuo con un pequeño cromosoma accesorio supernumerario ( $2n = 18 + 1B$ ) (Fig.4); en la población GRE existe otro individuo con un cromosoma accesorio, de menor tamaño aún que el anterior ( $2n = 18 + 1B^1$ ) (Fig.5); por último, en la población POD existe un individuo tetraploide ( $2n = 36$ ) (Fig.6).

## 5.2 Polimorfismos cromosómicos existentes en la segunda pareja del cariotipo de *Muscari comosum*

Teniendo en cuenta la existencia de gran variabilidad cromosómica en la segunda pareja del cariotipo de *M. comosum*, hemos llevado a cabo un análisis mitótico y meiótico detallado de la misma.

### 5.2.1 Tipos cromosómicos de la segunda pareja

El análisis mitótico efectuado pone de manifiesto que la segunda pareja está representada en las poblaciones analizadas por cuatro tipos cromosómicos, caracterizados y diferenciados por su longitud relativa (c) y por su índice centromérico (r). Estos cuatro tipos cromosómicos son los siguientes:

I) Tipo +, con una longitud relativa (c) del 17.86% del genoma haploide y un índice centromérico (r) de 1.28, de morfología metacéntrica.

II) Tipo i, con una longitud relativa del 18.90% y un índice centromérico de 2,89, de morfología subtelocéntrica.

III) Tipo +1, con una longitud relativa del 22.10% y un índice centromérico de 2.05, de morfología submetacéntrica.

IV) Tipo il, con una longitud relativa de 23.62% y un índice centromérico de 4.29 (Véase Fig. 7), de morfología subtelocéntrica.

Estos tipos cromosómicos, que coinciden con los señalados por Garbari (1966, 1969) ; Bentzer (1972) Bentzer y Ellmer (1975) y García (1981), se encuentran presentes en todas las poblaciones estudiadas por

nosotros, formando casi todas las combinaciones (citotipos) posibles.

En la tabla 9 se recogen las frecuencias absolutas de las diferentes combinaciones cromosómicas en las poblaciones analizadas. Tal como se puede observar en dicha tabla las combinaciones genotípicas más frecuentes son aquéllas en las que aparecen los tipos + e i, y las menos frecuentes son las que incluyen los tipos +l e il. En ninguna de las poblaciones hemos observado individuos que fueran homocigotos +l/+l ni il/il, ni tampoco individuos heterocigotos para el genotipo +l/il.

Para tratar de comprender la naturaleza y los efectos citogenéticos de las reordenaciones que originan estos tipos cromosómicos hemos llevado a cabo un análisis meiótico detallado de esta segunda pareja y de sus efectos en el resto del cariotipo, así como un intento de caracterización de la misma por técnicas de bandeo-C.

#### 5.2.2 Comportamiento meiótico de la segunda pareja

Hemos realizado el análisis meiótico en una muestra de individuos pertenecientes a una población, concretamente la de Silleta (SILL) (Granada) (Véase Tabla 2). En la tabla 3 se recogen los individuos estudiados en dicha población, agrupados por citotipos para la segunda pareja.

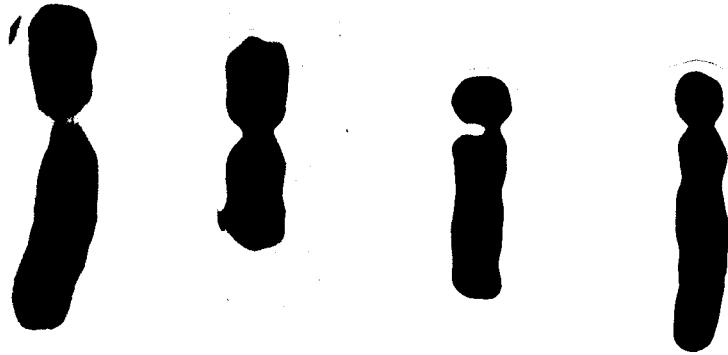
Tabla 3: Individuos de M. comosum analizados meióticamente

<u>Población</u>	<u>Citotipos</u>							Total
	+/+	+/i	i/i	+/+l	+/il	i/+l	i/il	
Silleta	6	8	8	4	3	1	2	32

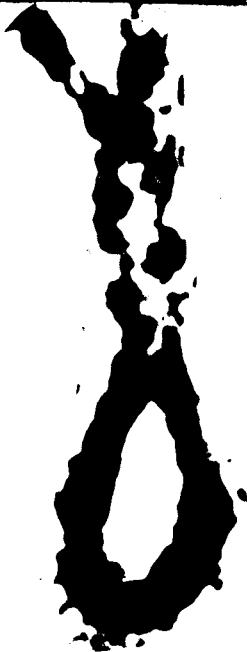


- Fig. 7.- Tipos cromosómicos de la segunda pareja de M. comosum. De izquierda a derecha aparecen: el tipo +1, el tipo +, el tipo i y el tipo il.
- Fig. 8.- Bivalente de la segunda pareja del cariotipo de un individuo homocigoto estandar (+/+). Obsérvese la formación de tres quiasmas.
- Fig. 9.- Bivalente de la segunda pareja del cariotipo de un individuo homocigoto para el tipo cromosómico invertido (i/i). Obsérvese la formación de cuatro quiasmas.
- Fig.10a.- Bivalente de la segunda pareja de un individuo heterocigoto para la inversión (+/i) mostrando asinapsis en la zona que comprende la inversión.
- Fig.10b.- Zigotene de un individuo heterocigoto para la inversión(+/i). Señalada por una flecha se observa la zona de asinapsis producida en la segunda pareja como consecuencia de la presencia de la inversión.
- Fig. 11.- Bivalente de la segunda pareja de un individuo heterocigoto para la inversión (+/i) con dos quiasmas. Uno terminal en el brazo corto y otro distal en el brazo largo.

7



8



9



10a



11



10b



El primer aspecto que hemos intentado aclarar es la forma en que se produce el apareamiento en la segunda pareja y el número de quiasmas que se forman en la misma, en los diferentes citotipos.

Así, en los individuos  $+/+$  el apareamiento de la segunda pareja transcurre de forma normal en las fases más tempranas de la meiosis (leptotene y paquitene). El número de quiasmas que se forman en la segunda pareja varía entre uno y tres: tales quiasmas pueden ser terminales, proximales o intersticiales (Fig. 8).

En los individuos  $i/i$  el apareamiento de la segunda pareja se produce también de forma normal. El número de quiasmas en la segunda pareja varía en estos individuos entre uno y cuatro, siendo éste el citotipo en el que se forman mayor número de quiasmas en la segunda pareja. Tales quiasmas pueden ser terminales, proximales o intersticiales (Fig. 9).

En los individuos  $+/i$  nunca hemos observado la formación de bucles de inversión en la segunda pareja; sí es posible observar en paquitene la existencia de una zona de asinapsis en la zona del bivalente próxima al centrómero, pero el apareamiento es completo en el resto del bivalente (Fig.10). El número de quiasmas que se pueden formar en dicha pareja varía entre uno y tres, aunque lo más frecuente es uno o dos, en posición terminal (Fig.11).

En los individuos heterocigotos para la presencia de un cromosoma  $+1$  o  $i1$  el apareamiento en la segunda pareja puede ser de dos tipos: en uno de los casos el apareamiento de los cromosomas es terminal quedando, por tanto, un bucle de asinapsis en el cromosoma más largo ( $+1$  o  $i1$ ) (Fig.12); o el apareamiento puede ser recto quedando una zona final no sinapsada en el cromosoma más largo (Fig.13).

En el primer caso se formaría un quiasma terminal, observándose por lo tanto el bivalente en fases posteriores (diplotene, diacinesis) sinapsado en dicha zona (Fig.14). En el segundo caso el quiasma no se forma, observándose, entonces, el bivalente en diplotene sin sinapsar en dicha zona (Fig.15).

Esta última observación está confirmada: por el hecho de que en estos individuos no se ha observado nunca bivalentes metafásicos de la segunda pareja en los que exista un quiasma entre el segmento y el resto del bivalente, y además nunca se han observado en metafase II cromosomas con cromátidas desiguales, que se producirían como consecuencia de dichos quiasmas.

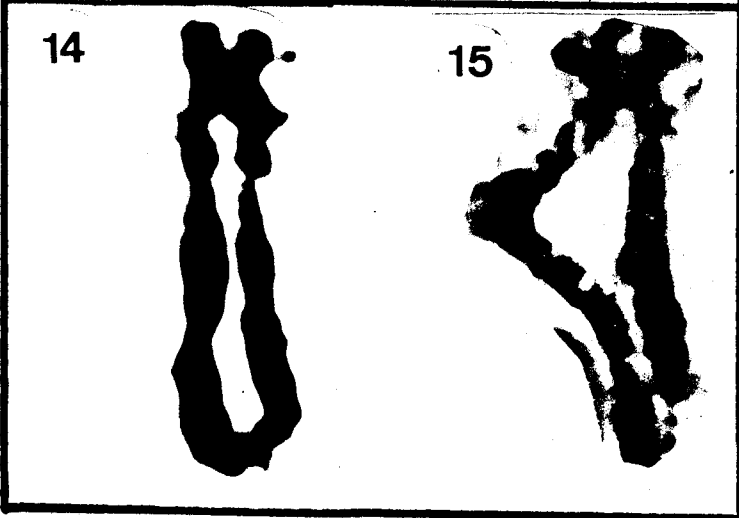
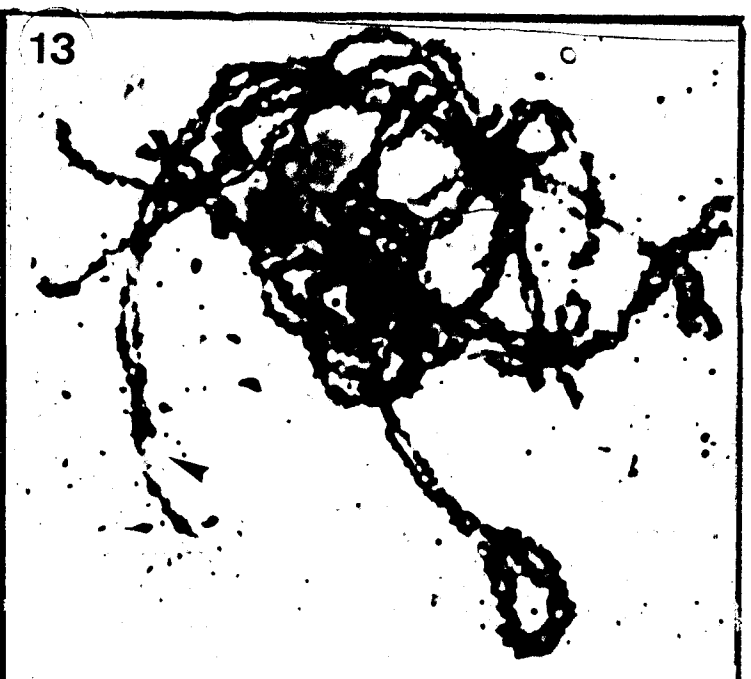
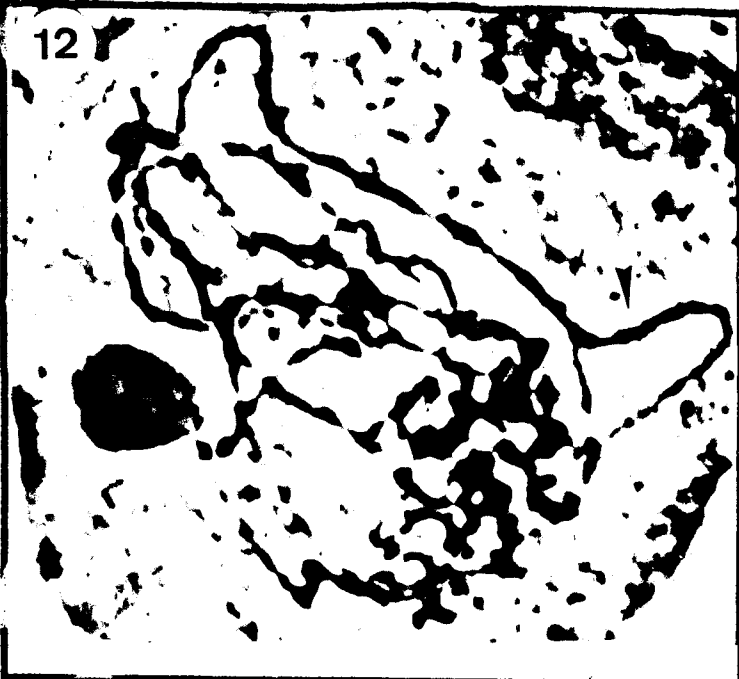
En los individuos de citotipo  $+/il$ ,  $i/+1$  e  $i/il$  el número de quiasmas es de uno o dos en posición terminal, solamente (Fig.16); en los individuos de citotipo  $+/+1$  el número total de quiasmas puede llegar a ser de tres, y la posición en que se producen puede ser terminal, generalmente, y proximal (Fig.17).

En diplotene y diacinesis la segunda pareja tiene una contracción diferencial, independientemente de cual sea su morfología, presentando una o varias zonas, en posición proximal, de menor contracción que el resto del bivalente.

El comportamiento de la segunda pareja en Metafase I, sea cual sea su morfología, es uniforme; el número de quiasmas es de uno o dos, generalmente en posición terminal (Fig.18). Nunca hemos observado segregación precoz de dicha pareja.

En anafase I, la segregación de la segunda pareja ocurre de forma normal en todos los citotipos, aunque muy esporádicamente es posible observar la formación de puentes sin fragmento (Fig.19).

- Fig. 12 .- Zigotene de un individuo heterocigoto para el segmento donde se observa la segunda pareja sinapsada terminalmente, formando en la zona próxima un bucle de asinapsis (flecha).
- Fig.13 .- Zigotene de un individuo heterocigoto para el segmento. Obsérvese señalada por una flecha, como la segunda pareja se sinapsa de forma recta sin formación de quiasma.
- Fig.14 .- Bivalente de la segunda pareja de un individuo heterocigoto para el segmento (+/+1) con un quiasma terminal en el brazo portador del segmento.
- Fig.15 .- Bivalente de la segunda pareja de un individuo heterocigoto para el segmento (i/i1), donde no se produce la formación de quiasma terminal en el brazo portador del segmento
- Fig.16 .- Bivalente de la segunda pareja de un individuo heterocigoto para el segmento (i/i1) con dos quiasmas.
- Fig.17.- Bivalente de la segunda pareja de un individuo heterocigoto para el segmento (+/+1) con tres quiasmas: dos terminales y uno intersticial.



Faint, illegible text or a stamp located in the bottom right corner of the page.

Los individuos en los que se han observado dichos puentes, son tanto de los citotipos homocigotos (+/+ e i/i) como heterocigotos (+/i) y portadores de cromosomas +1 e il.

Finalmente, hay que mencionar que en Metafase II nunca se han observado cromosomas segundos con cromátidas desiguales, ni en los heterocigotos para cromosomas +1 e il, ni en heterocigotos +/i.

Igualmente, hemos efectuado un estudio sobre los posibles efectos que los polimorfismos cromosómicos de la segunda pareja pueden tener sobre la formación de quiasmas. Dos son los aspectos que hemos analizado; el primero de ellos es en qué forma pueden afectar los polimorfismos cromosómicos en la formación de quiasmas en la propia segunda pareja; el segundo, ha sido averiguar el posible efecto que podrían tener los polimorfismos cromosómicos en la formación de quiasmas en los otros bivalentes del complemento.

#### 5.2.2.1 Efectos intracromosómicos de los polimorfismos cromosómicos de la segunda pareja sobre la formación de quiasmas

Para el análisis de este aspecto hemos efectuado un recuento de veinte diplotenes por individuo, en los treinta y dos individuos analizados meióticamente, calculando la media total de quiasmas de la segunda pareja para cada citotipo. Para hacer más preciso el análisis, hemos dividido esta pareja en varias zonas y hemos calculado la media de quiasmas en cada una de estas posiciones.

Los resultados obtenidos son los que se recogen en la tabla 4.

En relación con dicha tabla lo primero a mencionar es que los individuos +/+ e i/i presentan una media de quiasmas mayor que los individuos +/i. Esto puede ser debido a que, tal como se observa en la tabla 4, en los individuos +/+ e i/i se producen quiasmas en las

Tabla 4: Frecuencias de quiasmas por posiciones y frecuencia total en la segunda pareja del cariotipo de M. comosum

	Citotipos					Frecuencia de quiasmas					
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	Total
+/+						.91	.09	.53	.09	.83	2.45
+/i						.89	.00	.00	.13	.83	1.85
i/i						.89	.20	.60	.18	.84	2.71
+/+1						.81	.15	.39	.00	.69	2.04
+1/i						.95	.00	.00	.00	.80	1.75
+/il						.87	.00	.00	.00	.85	1.72
i/il						.80	.00	.00	.00	.93	1.73



zonas b y c, mientras que no ocurren tales quiasmas en los individuos  $+/i$ .

Los individuos portadores de un cromosoma  $+l$  o  $il$ , en general, presentan una media de quiasmas menor que los individuos sin tales cromosomas (es decir los individuos  $+/+$ ,  $+/i$  e  $i/i$ ). Concretamente, tal como se puede observar en la tabla 4, los individuos  $+/+l$  presentan una media de quiasmas menor que los individuos  $+/+$ . Este descenso puede ser debido, en parte, a que en los individuos  $+/+l$  no se forman quiasmas en la zona d.

Asimismo en los individuos  $+/il$  y  $+l/i$  la frecuencia de quiasmas es menor que en los individuos  $+/i$ . Este descenso puede ser debido, a que, en ambos citotipos con los cromosomas  $+l$  e  $il$ , se produce un descenso en la frecuencia de quiasmas intersticiales con respecto a los individuos  $+/i$ .

Por último, se observa que en los individuos  $i/il$  se produce un fuerte descenso de quiasmas con respecto a los individuos  $i/i$ . Este descenso se puede explicar por la ausencia de quiasmas intersticiales en los individuos  $i/il$ , que son muy frecuentes en los individuos  $i/i$ .

Para ver si existen diferencias significativas entre las medias de quiasmas en la segunda pareja de los distintos citotipos hemos realizado un análisis estadístico, mediante una T de Student para medias. En la tabla 5 se recogen los resultados obtenidos.

En dicha tabla se observa, en primer lugar, que, entre las medias de los individuos  $+/+$  e  $i/i$ , no existen diferencias significativas pero cuando se comparan ambas medias con la de los individuos  $+/i$  sí existen diferencias significativas en ambos casos.

Asimismo, hay que señalar que las medias de quiasmas de los individuos  $i/i$  e  $i/il$  se diferencian significativamente entre sí, mientras que no ocurre lo mismo con las medias de los individuos  $+/+$  y  $+/+l$  entre sí. No existen tampoco diferencias significativas entre las medias de quias-

los individuos +/i y los individuos +l/i y +/il.

Tabla 5: Valores de la T de Student para las medias de quiasmas de la segunda pareja en la población de Silleta

Citotipos	+/+	+/i	i/i	+/+l	+/il	+l/i	i/il
+/+		2.36 *	1.01	1.59	2.90 **	2.71 **	2.64 **
+/i			9.4E ***	2.15 *	1.48	1.09	.95
i/i				6.76 ***	6.73 ***	9.41 ***	7.31 ***
+/+l					2.90 **	2.61 **	2.34 *
+/il						.64	.60
+l/i							.16

(\*)  $0.05 > p > 0.01$  ; (\*\*)  $0.01 > p > 0.001$  ; (\*\*\*)  $0.0001 > p$

5.2.2.2 Efectos de las reordenaciones cromosómicas de la segunda pareja de M. comosum sobre la formación de quiasmas en el resto del complemento

El segundo de los aspectos analizados ha sido averiguar el efecto que tienen las reordenaciones cromosómicas existentes en la segunda pareja; sobre la formación de quiasmas en los otros bivalentes del complemento.

Para efectuar este análisis se han utilizado los mismos individuos y células (veinte células por individuo) que los utilizados en el apartado anterior (véase tabla 3).

En este caso, sin embargo, se han contado los quiasmas de la primera pareja y del total del complemento. A partir de estos datos se han obtenido las medias de cada individuo para ambos parámetros y, posteriormente, agrupando los individuos según su citotipo para la segunda pareja, se han obtenido las medias de quiasmas para la primera pareja por

citotipo y la media de quiasmas, para el total del complemento, por citotipo.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6 .

Tabla 6: Medias de quiasmas de la primera pareja y del total del complemento en la población de Silleta

Medias	Citotipos						
	<u>+/+</u>	<u>+/i</u>	<u>i/i</u>	<u>+/+1</u>	<u>+/il</u>	<u>+1/i</u>	<u>i/il</u>
$\bar{X}_{1\pm}$	2.32	2.19	2.46	2.22	2.20	2.22	2.05
$\sigma_{n-1}$	.59	.74	.72	.83	.76	.72	.97
$\bar{X}_{t.c.}$	13.63	13.41	13.82	12.95	12.45	12.78	12.96
$\sigma_{n-1}$	1.15	1.25	1.34	1.51	1.65	1.72	1.53

$\bar{X}_{1\pm}$  y  $\bar{X}_{t.c.}$  son las medias de quiasmas de la primera pareja y del total del cariotipo, y  $\sigma_{n-1}$  y  $\sigma_{n-1}$  son sus cuasi-desviaciones típicas respectivas.

Un primer aspecto a señalar en relación con dicha tabla, y refiriéndonos a la primera pareja, es que los individuos  $+/+$  e  $i/i$  presentan una media de quiasmas mayor que los individuos  $+/i$ .

Igualmente hay que señalar que los individuos portadores de un cromosoma  $+1$  o  $il$  presentan, por lo general, una media de quiasmas para la primera pareja menor o muy parecida a la de los individuos sin tales cromosomas. Así los individuos  $+/+1$  presentan una media de quiasmas, para la primera pareja del cariotipo, menor que los individuos  $+/+$ . También los individuos  $i/il$  presentan una media de quiasmas menor que los individuos  $i/i$ . Sin embargo en los individuos  $+/il$  y  $+1/i$  la frecuencia de quias-

mas para la primera pareja es ligeramente superior a la de los individuos  $+/i$ .

Por lo que respecta a las medias de quiasmas del total del complemento, hay que señalar que, al igual que ocurría para la primera y segunda pareja del cariotipo, los individuos  $+/+$  e  $i/i$  presentan una media de quiasmas mayor que la de los individuos  $+/i$ . Esta diferencia estaría ocasionada, precisamente, por las diferencias existentes entre las medias de quiasmas para la primera y segunda pareja de estas tres clases de individuos.

Igualmente, los individuos portadores de un cromosoma  $+l$  o  $il$  presentan una frecuencia de quiasmas para el total del complemento menor que la de los individuos sin tales cromosomas. Así los individuos  $+/+l$  presentan una media de quiasmas menor que la de los individuos  $+/+$ . En los individuos  $+/il$  y  $+l/i$  la frecuencia de quiasmas es menor que en los individuos  $+/i$ . Por último los individuos  $i/il$  presentan una media de quiasmas claramente inferior que los individuos  $i/i$ .

Asimismo, estas diferencias estarían producidas por las diferencias existentes entre las medias de quiasmas para la primera y segunda pareja de los individuos portadores de un cromosoma  $+l$  o  $il$ , y los no portadores de dichos cromosomas.

En la tabla 7 se presentan los valores de T de Student para las medias de quiasmas de la primera pareja. En esta tabla se observa, por lo que respecta a los individuos  $+/+$   $+/i$  e  $i/i$ , que solamente existen diferencias significativas entre las medias de quiasmas de los individuos  $+/i$  e  $i/i$ . Por otra parte, las diferencias entre las medias de quiasmas para la primera pareja entre los individuos portadores de un cromosoma  $+l$  o  $il$  y los no portadores, solamente son estadísticamente significativas en el caso de los individuos  $+/+l$ ,  $+/il$  e  $i/il$  respecto a los indi-

Tabla 7: Valores de la T de Student para las medias de quiasmas de la primera pareja en la población de Silleta

Citotipos	+/+	+/i	i/i	+/+1	+/il	+1/i	i/il
+/+		.38	1.73	.93	.17	.12	1.05
+/i			3.31 **	.27	.26	.18	.86
i/i				2.21 *	2.29 *	1.41	2.51 *
+/+1					.15	-	.95
+/il						.11	.82
+1/i							.76

(\*)  $0.05 > p > 0.02$  ; (\*\*)  $0.01 > p > 0.001$

Tabla 8: Valores de la T de Student para las medias de quiasmas para el total del complemento en la población de Silleta

Citotipos	+/+	+/i	i/i	+/+1	+/il	+1/i	i/il
+/+		.83	1.94	3.42 **	4.87 ***	2.13 *	2.46
+/i			2.83 *	3.84 **	4.51 ***	2.14 *	1.49
i/i				4.87 ***	6.18 ***	2.86 **	2.62 **
+/+1					1.83	.41	.08
+/il						.75	1.32
+1/i							.32

(\*)  $0.05 > p > 0.01$  ; (\*\*)  $0.01 > p > 0.001$ ; (\*\*\*)  $0.001 > p$

viduos i/i.

En la tabla 8 se presentan los valores de T de Student para las medias de quiasmas para el total del complemento. El primer aspecto a señalar en dicha tabla es el hecho de que los individuos +/+, +/i

e  $i/i$  presentan una media de quiasmas mayor que la de los individuos portadores de un cromosoma  $+l$  o  $il$ , y que las diferencias son estadísticamente significativas. Solamente en el caso de los individuos  $+/i$  e  $i/il$  no se produce esta diferencia. Las medias de los individuos portadores de un cromosoma  $+l$  o  $il$  no presentan diferencias significativas entre sí.

Finalmente señalaremos que, entre las medias de quiasmas para el total del cariotipo de los individuos  $+/+$ ,  $+/i$  e  $i/i$ , no existen diferencias significativas entre sí, excepto en el caso de los individuos  $+/i$  e  $i/i$ .

### 5.2.3 Caracterización de la segunda pareja de Muscari comosum mediante bandeo-C

La aplicación de técnicas de bandeo-C en M. comosum, pone de manifiesto, de acuerdo con Bentzer y Landstrom (1975), que esta especie presenta tres o cuatro zonas heterocrómicas intensas en el brazo largo de la primera pareja (Fig. 20).

El resto de las parejas, incluida la segunda, presentan pequeñas bandas de heterocromatina centromérica. De esta forma, al no existir zonas heterocromáticas intersticiales en el cromosoma segundo, no es posible profundizar sobre la naturaleza de las reordenaciones que originan los dos tipos cromosómicos + e i.

Sí se observa, sin embargo, que en los cromosomas i e il la zona de la heterocromatina centromérica cambia de posición con respecto a los cromosomas + y +1.

Asimismo, hay que mencionar que las zonas terminales del brazo largo de los cromosomas +1 e il presentan un aspecto eucromático tanto en mitosis como en meiosis (Fig.21), no habiéndose detectado en dichas zonas bandas heterocromáticas por las técnicas de bandeo-C (Fig.22).

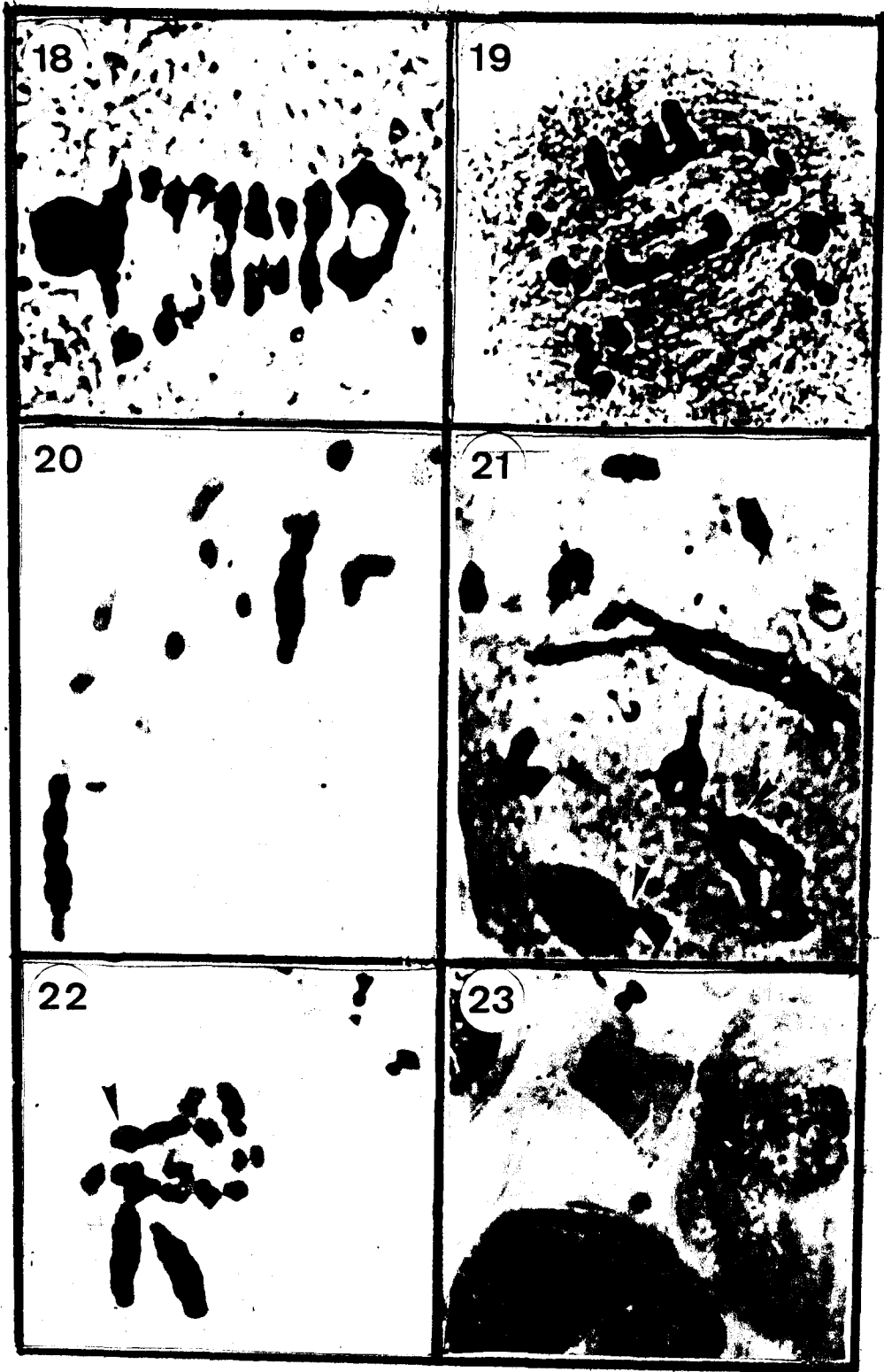
Otro dato que apunta sobre la naturaleza eucromática de los brazos largos de los cromosomas +1 e il, es el hecho de que en los núcleos interfásicos (mitóticos y meióticos, tanto en técnicas normales como de bandeo) no aumenta el número de cromocentros heterocromáticos, respecto de los individuos que no llevan tales tipos cromosómicos.

Para finalizar con las técnicas de bandeo-C, hay que mencionar que en las células interfásicas de M. comosum, tanto meióticas y mitóticas, existen varios bloques heteropíenéticos positivos muy intensos. Estos bloques que aparecen en células no sometidas a bandeo-C permanecen

en células que han sido sometidas a técnicas de bandeo-C. Por su número (tres o cuatro) y disposición (generalmente alineados) podrían corresponder a las zonas heterocromáticas positivas que presenta la primera pareja (Fig. 23).



- Fig.18.- Metafase meiótica donde se observa la segunda pareja con dos quiasmas terminales.
- Fig.19.- Anafase-I donde se observa un puente en la segunda pareja, además, de otro en la primera.
- Fig:20.- Patrón de bandas-C en M.comosum. Solamente aparecen bandas heterocromáticas en la primera pareja del cariotipo. En el resto de los cromosomas solo se observa la banda centromérica.
- Fig.21.- Diplotene de un individuo heterocigoto para el segmento. Las flechas señalan a la pareja portadora del organizador nucleolar y a la segunda pareja.
- Fig.22.- Bandas-C en un individuo portador del segmento (+/+1). La flecha señala la zona del cromosoma +1 donde se localiza el segmento, en el cual no se observan bandas.
- Fig.23.- Interfase mitótica con tres cromocentros.



#### 5.2.4 Variabilidad geográfica de los polimorfismos cromosómicos de M. comosum

Aunque posteriormente se discutirá mas extensamente la naturaleza de las reordenaciones y fenómenos cromosómicos que originan los cuatro tipos de cromosomas que presenta la segunda pareja de M. comosum, para facilitar el análisis de los resultados que se exponen a continuación adelantaremos que, probablemente, el cambio en la posición del centrómero entre los cromosomas metacéntricos (+) y submetacéntricos (+1) y los subtelocéntricos (i,il) es debido a una inversión pericéntrica y que la diferencia en el tamaño existente entre los cromosomas +, i y +1, il se debe a un segmento supernumerario eucromático.

Por lo tanto, a partir de ahora nos referiremos al tipo cromosómico + (el más frecuente) como cromosoma estándar, al tipo cromosómico i como tipo invertido, al tipo cromosómico +1 como cromosoma estándar con un segmento supernumerario y al tipo cromosómico il como invertido con segmento supernumerario.

En la tabla 9 se recogen las frecuencias observadas de los distintos citotipos en las 22 poblaciones analizadas mitóticamente. En dicha tabla se puede observar que, en general, en todas las poblaciones se encuentran presentes los distintos citotipos resultantes de la combinación de los cromosomas + e i. En cambio, son mucho menos frecuentes los citotipos en los que aparecen los cromosomas +1 y/o il. De hecho, tal como se observa en dicha tabla, en ninguna población se han observado individuos homocigotos para +1 o il, o el heterocigoto +1/il.

En las diferentes poblaciones se encuentran representados normal-



Fig. 24.- Placa metafásica de un individuo homocigoto +/+.

Fig. 25.- Placa metafásica de un individuo heterocigoto +/i.

Fig. 26.- Placa metafásica de un individuo homocigoto i/i.



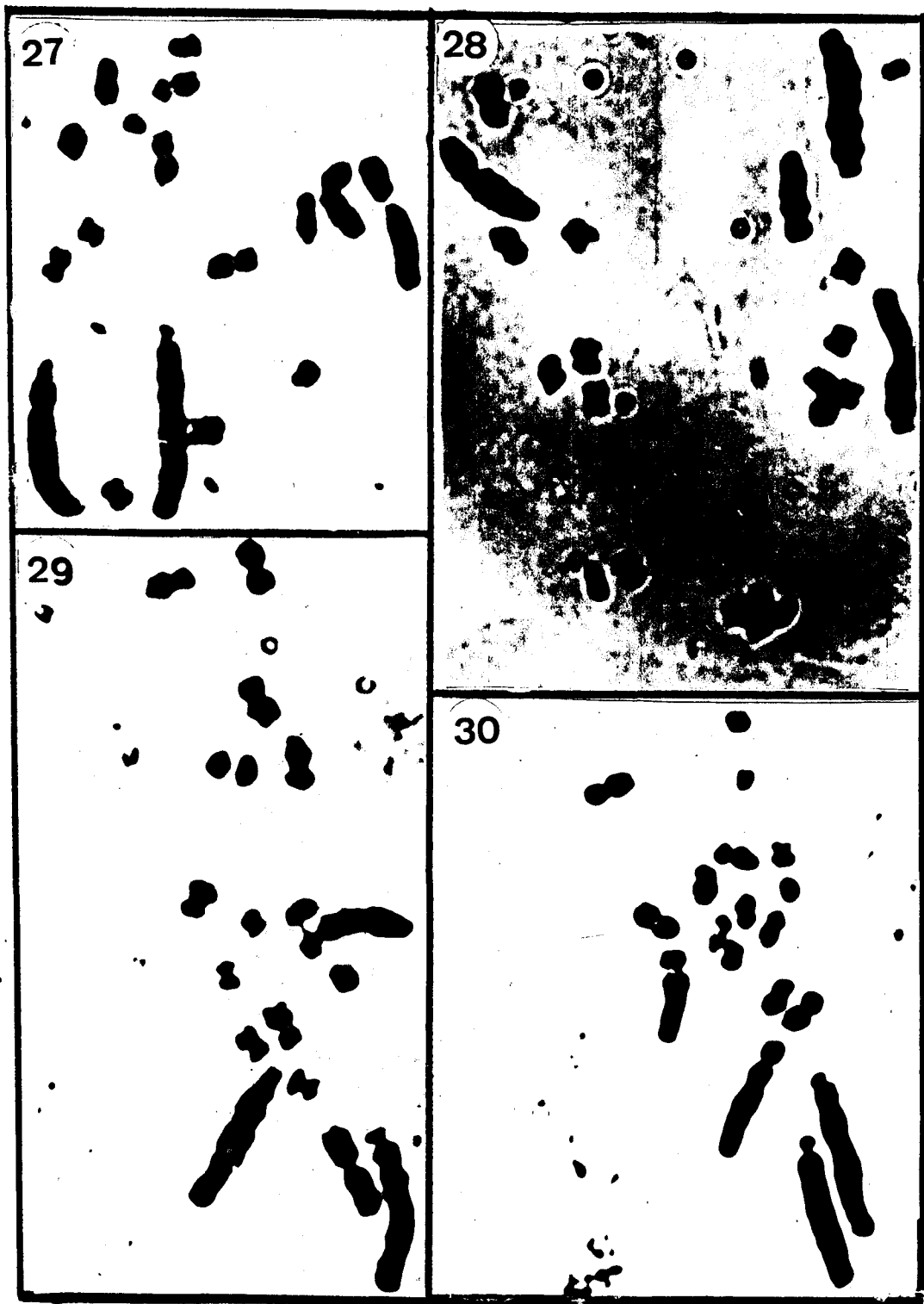


Fig. 27.- Placa metafásica de un individuo heterocigoto  $+/+l$ .

Fig. 28.- Placa metafásica de un individuo heterocigoto  $+l/i$ .

Fig. 29.- Placa metafásica de un individuo heterocigoto  $+/il$ .

Fig. 30.- Placa metafásica de un individuo heterocigoto  $i/il$ .





mente los citotipos homocigotos para el cromosoma estándar, (Véase Fig. 24). Asimismo, se encuentran presentes los citotipos heterocigotos para el cromosoma estándar e invertido  $+/i$  (Fig. 25) y, normalmente, en muchas poblaciones se encuentra el citotipo homocigótico para el cromosoma invertido  $i/i$  (Fig. 26). En cambio, son muchos menos frecuentes los genotipos con un cromosoma estándar y un cromosoma con segmento,  $+/+l$  (Fig. 27) y  $+/il$  (Fig. 29) y los genotipos con un cromosoma invertido y un cromosoma con segmento  $i/+l$  (Fig. 28) e  $i/il$  (Fig. 30).

#### 5.2.4.1 Frecuencias cromosómicas de la segunda pareja de M.comosum

A partir de los datos de la tabla 9 se obtienen las frecuencias de los cuatro tipos cromosómicos que presenta la segunda pareja en las poblaciones analizadas. Los resultados se muestran en la tabla 10. Como se puede observar en dicha tabla el tipo  $+$  es el más frecuente, pero el tipo  $i$  está presente, asimismo, en una proporción importante en casi todas las poblaciones. (Véase tabla 10).

Por el contrario, los tipos cromosómicos  $+l$  e  $il$  son menos frecuentes, estando ausentes ambos en algunas poblaciones, o falta alguno de ellos en ciertas poblaciones.

De la tabla 10 se puede obtener la frecuencia de ordenaciones cromosómicas, es decir la frecuencia de inversión y la frecuencia del segmento. En la tabla 11 se reúnen dichos valores.

Así, podemos ver que en las poblaciones analizadas la ordenación más frecuente es la ordenación estándar, en la mayoría de las poblaciones, siendo solo superada por la ordenación invertida en cuatro poblaciones (AVI, MEN-1, VAL y POC).

La frecuencia de la ordenación invertida va desde 0.59 en las po-

Tabla 10 : Frecuencias cromosómicas de la segunda pareja de M. comosum

<u>Población</u>	<u>Tipos cromosómicos</u>			
	<u>+</u>	<u>i</u>	<u>+1</u>	<u>il</u>
GRE	.55	.42	-	.03
RAG	.88	.13	-	-
ROM	.66	.34	-	-
AVI	.39	.59	.02	-
DUR	.72	.24	-	.04
MEN-1	.41	.59	-	-
MEN-2	.50	.50	-	-
LLUV	.47	.30	.08	.14
VAL	.41	.39	.07	.13
BCA	.70	.28	-	.02
COZ	.90	.10	-	-
MOT	.97	.03	-	-
MAR	.50	.44	-	.06
PB	.54	.39	.03	.04
CPH	.66	.29	-	.05
BM	.63	.33	.01	.03
POA	.91	.09	-	-
POB	.58	.36	.06	-
POC	.41	.54	-	.05
POD	.75	.24	-	.01
MOY	.62	.36	-	.02
SUR	.88	.07	-	.05

Tabla 11: Frecuencias de inversión y del segmento en la segunda pareja de M. comosum

<u>Población:</u>	<u>Inversión</u>		<u>Segmento</u>	
	<u>invertido</u>	<u>estandar</u>	<u>con segmento</u>	<u>sin segmento</u>
GRE	.45	.55	.03	.97
RAG	.12	.88	.00	1.00
ROM	.34	.67	.00	1.00
AVI	.59	.41	.02	.98
DUR	.28	.72	.04	.96
MEN-1	.59	.41	.00	1.00
MEN-2	.50	.50	.00	1.00
LLUV	.43	.57	.22	.78
VAL	.52	.48	.20	.80
BCA	.30	.70	.02	.98
COZ	.10	.90	.00	1.00
MOT	.03	.97	.00	1.00
MAR	.50	.50	.06	.94
PB	.43	.57	.07	.93
CPH	.39	.61	.05	.95
BM	.39	.61	.04	.96
POA	.09	.91	.00	1.00
POB	.36	.64	.06	.94
POC	.59	.41	.05	.95
POD	.25	.75	.01	.99
MOY	.38	.62	.02	.98
SUR	.12	.88	.05	.95

ciones MEN-1 y POC a 0.03. en la población de MOT.

Por otra parte, la frecuencia del segmento, en las poblaciones en las que ha sido encontrado, varía entre 0.01 y 0.22; en siete poblaciones el segmento no ha sido observado.

#### 5.2.4.2 Medidas de la variabilidad cromosómica

En la tabla 12 se presentan los valores de la heterocigosidad media ( $H_i$ ) observados en cada población, para cada ordenación (inversión y segmento), así como la heterocigosidad poblacional ( $H$ ).

Por lo que respecta a la inversión es de destacar que la heterocigosidad observada en la mayoría de las poblaciones alcanza valores altos, destacando la población de MEN-1 con un valor de 0.71. Solamente cinco poblaciones (RAG, COZ, MOT, POA y SUR) presentan una heterocigosidad baja, destacando la población de MOT con un valor de 0.06.

La heterocigosidad observada para el segmento, en la mayoría de las poblaciones alcanza valores muy bajos, excepto en las poblaciones de la isla de Mallorca (LLUV y VAL) con valores de 0.45 y 0.39, respectivamente.

Estas mismas poblaciones son también las que presentan mayor heterocigosidad poblacional, LLUV = 0.51 y VAL = 0.46, debido precisamente a los altos valores de heterocigosidad que ambas poblaciones presentan para el segmento.

#### 5.2.4.3 Estructura genética de las poblaciones analizadas

Los dos polimorfismos cromosómicos de M. comosum presentan gran heterogeneidad geográfica (Fig. 31 y Fig. 32).

En la tabla 13 se recogen los índices de fijación ( $F_i$ ) para cada ordenación y para cada una de las poblaciones. Dichos índices de fijación toman valores negativos en casi todas las poblaciones para la in-

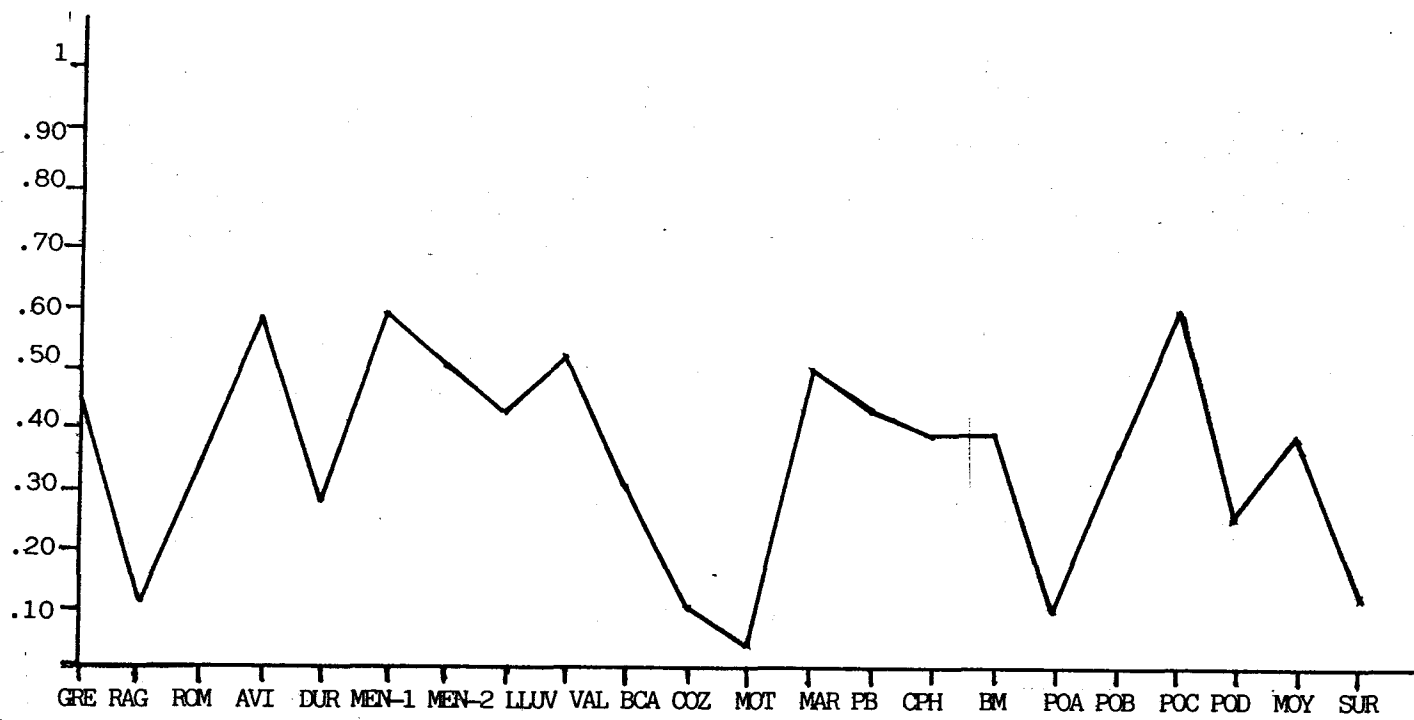


Fig. 31: Representación gráfica de las frecuencias de inversión en las poblaciones analizadas

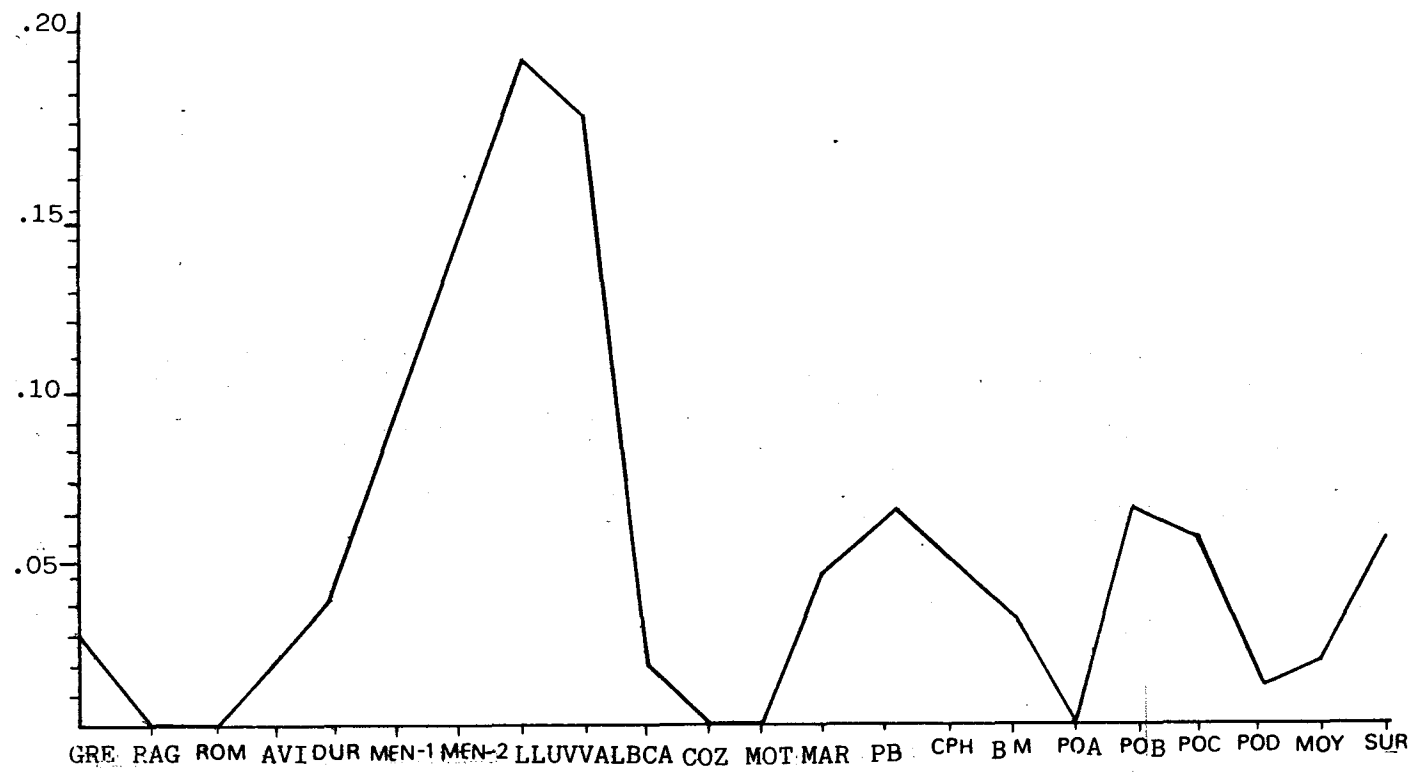


Fig. 32: Representación gráfica de las frecuencias del segmento en las poblaciones analizadas

Tabla 12 : Heterocigosidad cromosómica observada ( $H_i$  y  $H$ ) en *M. comosum*

<u>Población</u>	<u><math>H_i</math> para la inversión</u>	<u><math>H_i</math> para el segmento</u>	<u>H</u>
GRE	.56	.004	.30
RAG	.15	-	.075
ROM	.46	-	.230
AVI	.52	.03	.275
DUR	.46	.08	.270
MEN-1	.71	-	.355
MEN-2	.54	-	.270
LLUV	.57	.45	.510
VAL	.52	.39	.455
BCA	.56	.03	.295
COZ	.20	-	.100
MOT	.06	-	.030
MAR	.50	.13	.315
PB	.54	.15	.345
CPH	.54	.10	.320
BM	.40	.09	.245
POA	.19	-	.095
POB	.55	.11	.330
POC	.39	.10	.245
POD	.50	.03	.265
MOY	.43	.03	.230
SUR	.15	.10	.125
Media	.43	.08	.258
ES	.04	.02	.05

Tabla 13: Valores de  $F_i$  para cada ordenación (inversión y segmento)

<u>Población</u>	<u>Ordenaciones</u>	
	<u>inversión</u>	<u>segmento</u>
GRE	-.1313	+ .3127
RAG	+ .2897	+1.0000
ROM	-.0185	+1.0000
AVI	-.0648	+ .2269
DUR	-.1446	- .0016
MEN-1	-.4590	+1.0000
MEN-2	-.0769	+1.0000
LLUV	-.1657	- .3082
VAL	-.0451	- .3866
BCA	-.3148	+ .2028
COZ	-.1111	+1.0000
MOT	-.0117	+1.0000
MAR	.0000	- .1081
PB	-.0901	- .0560
CPH	-.1349	-.0526
BM	+ .1593	- .1160
POA	-.1550	+1.0000
POB	-.1837	- .0074
POC	+ .2530	- .0796
POD	-.3333	- .4029
MOY	+ .0803	+ .1496
SUR	+ .2897	- .0526



versión, lo que indica que existe un exceso de heterocigotos. Los valores extremos son de +.2887 en las poblaciones de SUR y RAG y -.4590 en la población de MEN-1.

Por otra parte, los índices de fijación para el segmento toman valores negativos en las poblaciones en las que existe, oscilando desde +.3127 en la población de GRE hasta -.3886 en la población de VAL.

Aunque parece existir en algunas poblaciones un exceso o un defecto de individuos heterocigotos, tanto para la inversión como para el segmento, todas las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg por lo que respecta a la inversión, no existiendo ninguna que presente un valor de Ji-cuadrado estadísticamente significativo para las frecuencias esperadas (tabla 14). Este análisis lo hemos realizado en cuatro poblaciones mediante una  $T_s$  de Student para frecuencias normalizadas (véase tabla 14).

Por lo que respecta a las poblaciones que presentan el segmento, el análisis efectuado para comprobar si están en equilibrio de Hardy-Weinberg ha sido llevado a cabo por medio de una  $T_s$  de Student para frecuencias normalizadas. En la tabla 14 se recogen los valores de dicha  $T_s$  de Student solamente para la combinación 1/1, es decir homocigota para el segmento. Como se puede observar en dicha tabla, solamente la población de LLUV presenta un valor estadísticamente significativo, lo que nos indica que en dicha población existe un defecto significativo de individuos homocigotos para el citotipo 1/1. En ninguna población la  $T_s$  toma valores significativos para las otras dos combinaciones nl/nl, homocigótica para cromosomas sin segmento, y nl/nl, heterocigótica para el segmento.

En la tabla 15 se presentan los valores de los índices de fijación ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$ ) y Ji-cuadrado de contingencia, para cada ordenación, en el conjunto de las poblaciones.

$F_{IS}$  toma un valor negativo para ambas ordenaciones, lo que indica un exceso de individuos heterocigotos en el total de las poblaciones. El valor de  $F_{IS}$  para los cromosomas con segmento se ha calculado solamente en las poblaciones en que dicho segmento está presente.

Los valores de  $F_{ST}$ , estadístico que mide el grado de diferenciación entre poblaciones, nos indican que existe cierto grado de diferenciación entre las poblaciones de M. comosum para ambas ordenaciones, siendo mayor la diferenciación para la inversión que para el segmento.

En este mismo sentido podemos señalar que, cuando se realiza un análisis de Ji-cuadrado para medir el grado de heterogeneidad entre poblaciones, éste presenta un valor que es estadísticamente significativo para ambas ordenaciones.

Por otra parte, el estadístico  $F_{IT}$  toma valores negativos para ambas ordenaciones, lo que indicaría que en el total de individuos de todas las poblaciones existe un ligero exceso de individuos heterocigotos, tanto para la inversión como para el segmento.

Tabla 15 : Valores de los estadísticos F de Wright y Ji-cuadrado de contingencia, para cada ordenación, en el total de poblaciones.

<u>Ordenación</u>	<u><math>F_{IS}</math></u>	<u><math>F_{ST}</math></u>	<u><math>\chi^2</math></u>	<u><math>F_{IT}</math></u>
inversión	-.0706	.1245	201.03	-.0111
segmento	-.0244	.0550	68.73	-.1045

#### 5.2.4.4 Diferenciación cromosómica entre las poblaciones de *M. comosum*

Para ver hasta qué punto están diferenciadas entre sí desde el punto de vista cromosómico las poblaciones de *M. comosum*, hemos obtenido las distancias genéticas entre poblaciones, utilizando el índice de Prevosti (1974), a partir de las frecuencias de la inversión y el segmento.

La matriz de distancias obtenidas se recoge en la tabla 16. El rango de variación de dicho índice va desde valores de .312 entre las poblaciones de LLUV (Mallorca) y MOT (Granada), a .009 que es la distancia existente entre las poblaciones de PB (Salamanca) y MAR (Huelva).

A partir de los datos de la matriz de distancia genética hemos construido el dendrograma o árbol filogenético que se presenta en la Fig.33 .

Este árbol se realizó optimizando con respecto a la matriz original, intentando hacer mínimo el valor de la F de Prager y Wilson. La optimización se realizó mediante el programa BIOSYS-1 .

Los valores obtenidos para los distintos estadísticos de bondad de ajuste fueron los siguientes:

- F (Farris, 1972) = 2.049.
- F (Prager y Wilson ,1976) = 7.121.
- Porcentaje de desviación estandar (Fitch y Margoliash, 1967) = 17.060.
- Coeficiente de correlación cofenética = 0.987.
- Longitud total del árbol o.527.

En dicho árbol filogenético podemos observar cómo dentro de los agrupamientos que se producen existen poblaciones de diferentes regiones geográficas, siendo el agrupamiento formado por las poblaciones de COZ (Granada) MOT (Granada) POA (Portugal) RAG (Sicilia) y SUR (Ca-

POPULATION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1 Canales.Granada	0.000																						
2 Luzejar.Granada	0.106	0.000																					
3 Motrilejo.Granad	0.142	0.035	0.000																				
4 Portugal A	0.109	0.003	0.033	0.000																			
5 Portugal B	0.104	0.150	0.196	0.163	0.000																		
6 Portugal C	0.164	0.271	0.306	0.273	0.116	0.000																	
7 Portugal D	0.244	0.103	0.138	0.105	0.078	0.191	0.000																
8 Moya.G.Canaria	0.044	0.150	0.185	0.153	0.030	0.121	0.087	0.000															
9 S.Urs.Tenerife	0.103	0.037	0.073	0.040	0.123	0.232	0.083	0.146	0.000														
10 Durance.France	0.010	0.110	0.146	0.113	0.050	0.150	0.037	0.062	0.034	0.000													
11 Ragusa.Italy	0.094	0.012	0.048	0.015	0.148	0.258	0.090	0.137	0.025	0.092	0.000												
12 Roma.Italy	0.031	0.121	0.157	0.124	0.039	0.149	0.074	0.029	0.134	0.050	0.109	0.000											
13 Avignons.France	0.147	0.253	0.288	0.256	0.134	0.019	0.191	0.105	0.250	0.166	0.241	0.132	0.000										
14 Lluvia.Mallorca	0.170	0.277	0.312	0.279	0.116	0.167	0.174	0.127	0.235	0.166	0.264	0.155	0.186	0.000									
15 Valdem.Mallorca	0.164	0.271	0.306	0.273	0.110	0.122	0.168	0.121	0.233	0.160	0.258	0.149	0.141	0.052	0.000								
16 Mirnes. HUELVA	0.094	0.200	0.235	0.203	0.040	0.082	0.115	0.050	0.162	0.090	0.188	0.079	0.100	0.085	0.083	0.000							
17 PUERTO DE BEJAR	0.031	0.197	0.232	0.200	0.037	0.091	0.108	0.047	0.159	0.087	0.184	0.075	0.110	0.080	0.080	0.009	0.000						
18 CRUCE PIEDRAH.	0.039	0.145	0.170	0.148	0.015	0.126	0.066	0.038	0.107	0.035	0.132	0.026	0.145	0.132	0.126	0.055	0.052	0.000					
19 SANOS MONTEA.	0.033	0.133	0.175	0.142	0.021	0.131	0.064	0.037	0.109	0.029	0.127	0.025	0.141	0.137	0.131	0.061	0.058	0.007	0.000				
20 GRECIA	0.034	0.190	0.228	0.192	0.057	0.091	0.123	0.040	0.173	0.082	0.170	0.069	0.078	0.108	0.101	0.023	0.032	0.065	0.064	0.000			
21 MENORCA-1	0.153	0.244	0.279	0.247	0.141	0.026	0.197	0.111	0.257	0.172	0.232	0.123	0.009	0.192	0.147	0.107	0.116	0.149	0.148	0.084	0.000		
22 MENORCA-2	0.109	0.200	0.239	0.203	0.057	0.071	0.153	0.067	0.213	0.128	0.188	0.079	0.053	0.148	0.114	0.063	0.072	0.105	0.104	0.040	0.044	0.000	

Tabla 16: Distancia genética de Prevosti (1974) entre las poblaciones analizadas, calculada a partir de las frecuencias cromosómicas solamente.



Tabla 17 : Factores de las observaciones y de las variables de la matriz constituida por las frecuencias de las diferentes ordenaciones cromosómicas de M. comosum

<u>Observaciones</u>	<u>Distancia</u>	<u>Coordenadas</u>	
	<u>al origen</u>	<u>Factor 1</u>	<u>Factor 2</u>
GRE	0.0320	0.1423	-0.1083
RAG	0.1174	-0.3421	0.0185
ROM	0.0201	-0.0514	-0.1322
AVI	0.1551	0.3135	-0.2384
DUR	0.0063	-0.0676	0.0419
MEN-1	0.1673	0.2760	-0.3019
MEN-2	0.0830	0.1582	-0.2408
LLUV	0.4677	0.4369	0.5257
VAL	0.2986	0.4043	0.8660
BCA	0.0070	-0.0740	-0.0372
COZ	0.1422	-0.3755	0.0358
MOT	0.2269	-0.4688	0.0842
POA	0.1480	-0.3827	0.0395
POB	0.0080	0.0729	0.0518
POC	0.1513	0.3629	-0.1398
POD	0.0263	-0.1584	-0.0353
MOY	0.0096	0.0320	-0.0926
SUR	0.0993	-0.2575	0.1817

<u>Variabes</u>	<u>Distancia</u>	<u>Coordenadas</u>	
	<u>al origen</u>	<u>Factor 1</u>	<u>Factor 2</u>
Ord. estandar	0.0726	-0.2549	0.0869
Ord. invertida	0.2850	0.4990	-0.1895
Ord. con segmento	2.4392	0.9229	1.2599
Ord. sin segmento	0.0032	-0.0327	-0.0449

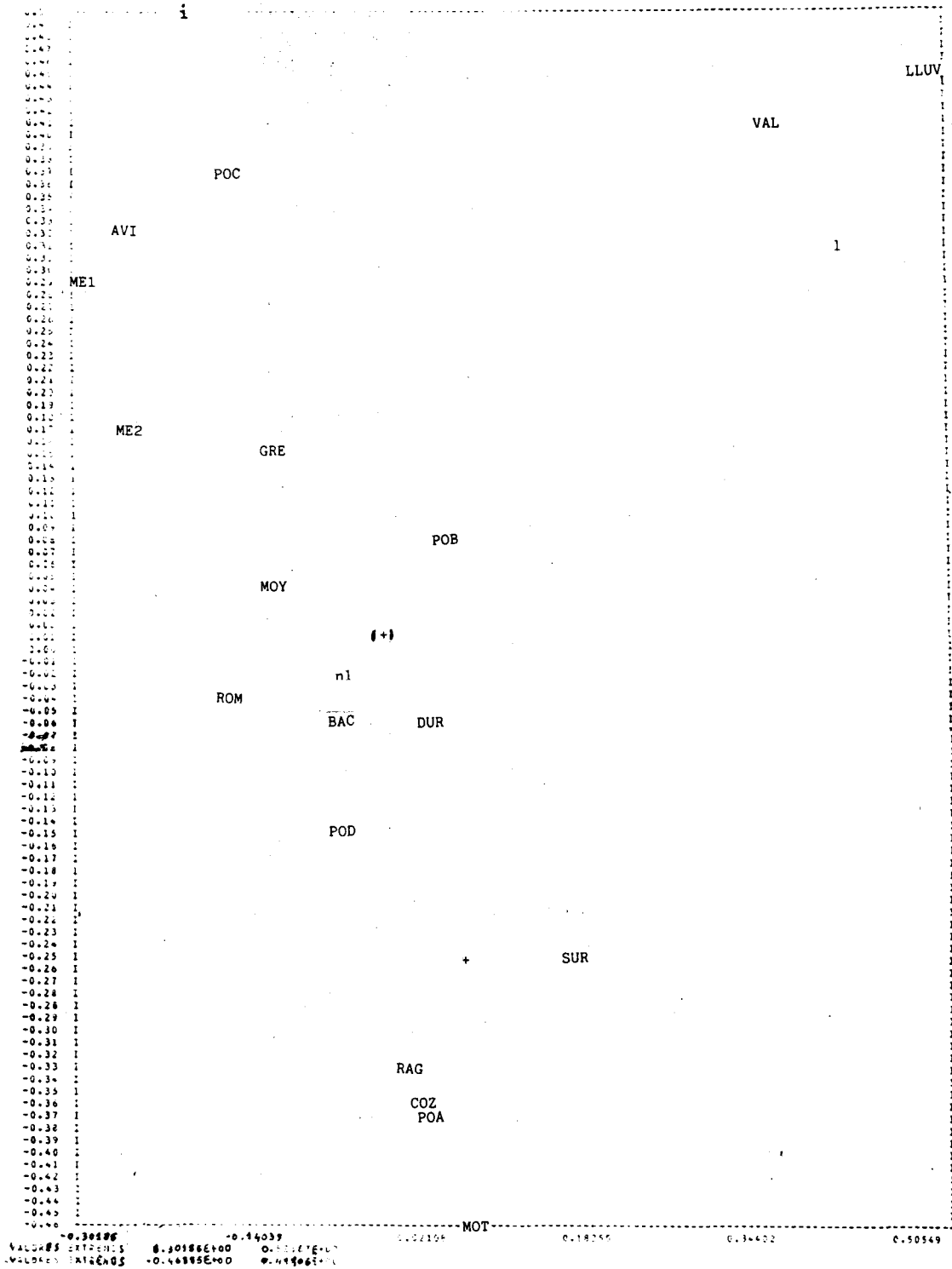


Fig. 34: Gráfico factorial obtenido mediante el análisis de correspondencias, cuando se tienen en cuenta las frecuencias cromosómicas de las 22 poblaciones analizadas.

narias) el primero en separarse del resto de poblaciones al nivel de .1857. Las siguientes en separarse son las poblaciones de Mallorca (LLUV y VAL) que forman un solo agrupamiento que se separa a nivel de .1353.

A la vista de dicho árbol podemos concluir que no existe un modelo de diferenciación geográfica por la distancia entre las poblaciones de M. comosum, al menos con los resultados obtenidos mediante análisis citogenético.

Este dendrograma puede compararse con los gráficos bidimensionales que se obtienen cuando se someten los datos a un análisis factorial. Dos tipos de análisis factoriales, el de correspondencias y el de componentes principales, hemos utilizado en el tratamiento de nuestros datos, aunque en este apartado solamente comentaremos el primero de ellos, ya que en ambos casos los resultados son muy parecidos entre sí.

Nosotros hemos utilizado el análisis factorial de correspondencias (Benzecri, 1973) como método objetivo para poner de manifiesto cuáles son los factores principales de variabilidad que originan la diferenciación genética de las poblaciones de M. comosum. Para ello hemos obtenido una representación simultánea de las variables y de las observaciones en un mismo gráfico bidimensional, mediante el programa ANACOR de Lebart y Fenelon (1975) y utilizando como matriz de datos la constituida por las frecuencias cromosómicas en las distintas poblaciones.

Los valores de los dos primeros factores, junto con las distancias de los diferentes puntos al origen de coordenadas, se muestran en la tabla 17. En la figura 34 se muestra el gráfico obtenido por la representación simultánea de las poblaciones y de las frecuencias cromosómicas, cuando se toman como ejes de coordenadas dichos factores.

Como puede observarse en la tabla 17 el factor I está determinado



por las frecuencias del segmento, por la frecuencia de la inversión, y por la frecuencia de la ordenación estándar, correspondiendo positivamente con la frecuencia de los dos primeros y negativamente con la frecuencia de la ordenación estándar. El factor II, está determinado por las frecuencias del segmento y de la inversión, correspondiendo positivamente con la frecuencia del segmento y negativamente para la frecuencia de la inversión.

De esta forma podemos observar (véase figura 34) cómo las poblaciones VAL y LLUV se diferencian claramente del resto de poblaciones por la alta frecuencia del segmento que ambas poblaciones presentan y que, como antes hemos dicho, al contribuir positivamente tanto al factor I como al factor II se sitúan ambas poblaciones en la parte superior derecha del gráfico.

Un segundo punto de diferenciación lo constituye la frecuencia de inversión, que diferencia claramente un grupo de poblaciones formado por POC, AVI, MEN-1 y MEN-2, y que al contribuir positivamente al factor I y negativamente al factor II hace que dicho grupo de poblaciones se sitúe en la parte superior izquierda del gráfico.

El tercer punto de diferenciación lo proporciona la frecuencia del tipo cromosómico estándar que diferencia un grupo de poblaciones formado por MOT, POA, COZ, RAG y TEN, y que al contribuir negativamente al factor I, dicho grupo de poblaciones, queda situado en la parte inferior derecha del gráfico.

Por último, las poblaciones con una frecuencia intermedia de inversión y una frecuencia baja para el segmento quedan situadas en la zona central del gráfico.

También hemos intentado comprobar si existen diferencias entre las frecuencias cromosómicas de las 22 poblaciones analizadas por nosotros y

las frecuencias cromosómicas que presentan poblaciones del centro del área de distribución de la especie, analizadas cromosómicamente por otros autores. Concretamente, hemos efectuado una comparación de la variabilidad cromosómica que presentan las 22 poblaciones de M. comosum estudiadas por nosotros, con las seis poblaciones griegas analizadas por Bentzer y Ellmer (1975): cuatro pertenecientes a la isla de Kithnos (K) y dos a las isla de Rodas (R), ambas islas del Mar Egeo

Tabla 18: Frecuencias de inversión y del segmento en la segunda pareja de M. comosum, en las seis poblaciones griegas

<u>Población</u>	<u>Inversión</u>		<u>Segmento</u>	
	<u>invertido</u>	<u>estandar</u>	<u>con segmento</u>	<u>sin segmento</u>
GRE 2 (600) (K)	.58	.41	.03	.97
GRE 3 (601) (K)	.29	.71	.06	.94
GRE 4 (602) (K)	.39	.61	.14	.86
GRE 5 (603) (R)	.54	.46	.06	.94
GRE 6 (604) (R)	.52	.48	.14	.86
GRE 7 (605) (K)	.30	.70	.08	.92

Como se puede observar en la tabla 18 las poblaciones griegas presentan una alta frecuencia de inversión, similar a la de algunas poblaciones analizadas por nosotros o superior en muchos casos. Por lo que respecta al segmento, estas poblaciones presentan una frecuencia baja, similar a la encontrada por nosotros en nuestras poblaciones, pero es de resaltar que dicha ordenación se presenta en todas las poblaciones.

Mediante el índice de distancia genética de Prevosti (1974), hemos

efectuado un análisis del grado de diferenciación cromosómica de las poblaciones griegas con las analizadas por nosotros, a partir de la matriz de datos constituida por las frecuencias de los cuatro tipos cromosómicos en las 28 poblaciones.

La matriz de distancias genéticas se presenta en la tabla 19. Los valores extremos son los existentes entre las poblaciones de LLUV y MOT, .312, y entre PB y MAR, .009. Estos valores extremos son los mismos que los obtenidos en el análisis de las 22 poblaciones analizadas por nosotros, presentando por tanto las seis poblaciones griegas, respecto al resto de poblaciones, distancias intermedias entre estos dos valores.

A partir de dicha matriz de distancias hemos obtenido el dendrograma que se muestra en la figura 35, por el método UPGMA y optimizando para hacer menor respecto a la matriz original la F de Prager y Wilson. Los valores de bondad de ajuste son:

- F (Farris, 1972) = 4.243
- F (Prager y Wilson, 1976) = 7.121
- Porcentaje de desviación estandar (Fitch y Margoliash, 1967) = 23.144
- Coeficiente de correlación cofenética = 0.970
- Longitud total del árbol = 0.631

En dicho dendrograma podemos observar cómo las seis poblaciones griegas quedan distribuidas dentro del resto de poblaciones, no siguiendo ningún patrón de diferenciación geográfica.

Asimismo, hemos efectuado un análisis factorial de correspondencias de la matriz de datos constituida por las frecuencias cromosómicas en las 28 poblaciones. Los valores de los dos primeros factores, junto con las distancias de los diferentes puntos al origen de coordenadas, se muestran en la tabla 20.

Tabla 19: Distancia genética de Prevosti(1974)entre las poblaciones analizada por nosotros.y las poblaciones griegas.

POPULATION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 Caniles.Granada	0.000															
2 Cozviljar.Granada	0.106	0.000														
3 Motrilejo.Granada	0.142	0.025	0.000													
4 Portugal A	0.107	0.007	0.033	0.000												
5 Portugal B	0.054	0.160	0.194	0.163	0.000											
6 Portugal C	0.154	0.271	0.306	0.273	0.116	0.000										
7 Portugal D	0.044	0.103	0.128	0.105	0.075	0.171	0.000									
8 Hoya de Canales	0.044	0.103	0.128	0.105	0.075	0.171	0.057	0.000								
9 S. Urs. Tenerife	0.107	0.107	0.173	0.040	0.123	0.233	0.088	0.146	0.000							
10 Ourance.Francia	0.017	0.110	0.145	0.113	0.050	0.150	0.027	0.062	0.034	0.000						
11 Ragusa.Italy	0.074	0.012	0.045	0.015	0.145	0.238	0.030	0.137	0.025	0.098	0.000					
12 Roma.Italy	0.031	0.121	0.157	0.124	0.029	0.147	0.074	0.029	0.134	0.050	0.109	0.000				
13 Avignon.Francia	0.147	0.253	0.288	0.254	0.134	0.013	0.191	0.105	0.250	0.164	0.241	0.132	0.000			
14 Lluvi.Mallorca	0.170	0.277	0.312	0.279	0.116	0.167	0.174	0.127	0.239	0.156	0.264	0.155	0.156	0.000		
15 Valdem.Mallorca	0.164	0.271	0.306	0.273	0.110	0.122	0.168	0.121	0.233	0.160	0.256	0.149	0.141	0.052	0.000	
16 Miras. HUELVA	0.074	0.230	0.235	0.203	0.040	0.082	0.115	0.050	0.162	0.030	0.144	0.079	0.100	0.075	0.023	0.000
17 PUERTO DE BEJAR	0.091	0.197	0.232	0.200	0.037	0.091	0.108	0.047	0.159	0.027	0.194	0.075	0.110	0.030	0.020	0.000
18 CRUCE PIEDRAH.	0.039	0.145	0.180	0.148	0.015	0.126	0.066	0.035	0.107	0.035	0.132	0.024	0.147	0.122	0.126	0.035
19 BANOS MONTEA.	0.035	0.139	0.175	0.142	0.021	0.131	0.054	0.027	0.104	0.025	0.127	0.025	0.141	0.137	0.131	0.021
20 GRECIA 1	0.034	0.190	0.225	0.193	0.057	0.041	0.123	0.040	0.173	0.039	0.173	0.269	0.079	0.108	0.101	0.013
21 GRECIA 2	0.149	0.256	0.291	0.258	0.124	0.015	0.185	0.105	0.240	0.154	0.145	0.134	0.010	0.174	0.131	0.090
22 GRECIA 3	0.023	0.124	0.159	0.126	0.037	0.191	0.042	0.065	0.066	0.013	0.111	0.053	0.170	0.153	0.147	0.076
23 GRECIA 4	0.102	0.214	0.249	0.217	0.054	0.147	0.111	0.064	0.177	0.104	0.202	0.192	0.155	0.062	0.057	0.065
24 GRECIA 5	0.141	0.249	0.283	0.250	0.037	0.031	0.164	0.093	0.210	0.137	0.235	0.124	0.050	0.135	0.091	0.051
25 GRECIA 6	0.171	0.277	0.312	0.240	0.117	0.077	0.174	0.127	0.239	0.167	0.264	0.155	0.096	0.090	0.047	0.077
26 GRECIA 7	0.025	0.124	0.174	0.142	0.045	0.161	0.044	0.075	0.102	0.029	0.127	0.063	0.180	0.137	0.131	0.079
27 HENDRAGA-1	0.157	0.244	0.275	0.247	0.141	0.126	0.197	0.111	0.257	0.172	0.237	0.123	0.009	0.192	0.147	0.107
28 HENDRAGA-2	0.109	0.200	0.231	0.202	0.097	0.071	0.152	0.061	0.213	0.122	0.186	0.072	0.051	0.144	0.114	0.063

Tabla 19: (continuación).

POPULATION	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
17 PUERTO DE S. JUAN	0.000											
18 CRUCE PIEDETA.	0.052	0.000										
19 BANDS MONTEM.	0.058	0.007	0.000									
20 GRECIA 1	0.037	0.065	0.064	0.000								
21 GRECIA 2	0.100	0.123	0.131	0.058	0.100							
22 GRECIA 3	0.072	0.027	0.028	0.092	0.160	0.000						
23 GRECIA 4	0.055	0.069	0.075	0.087	0.155	0.091	0.000					
24 GRECIA 5	0.060	0.103	0.108	0.058	0.040	0.124	0.115	0.000				
25 GRECIA 6	0.030	0.132	0.138	0.087	0.085	0.153	0.070	0.048	0.000			
26 GRECIA 7	0.070	0.037	0.038	0.102	0.170	0.016	0.075	0.130	0.138	0.000		
27 MENORCA-1	0.116	0.149	0.148	0.084	0.016	0.176	0.171	0.056	0.102	0.196	0.000	
28 MENORCA-2	0.072	0.105	0.104	0.040	0.056	0.132	0.127	0.048	0.077	0.142	0.044	0.000

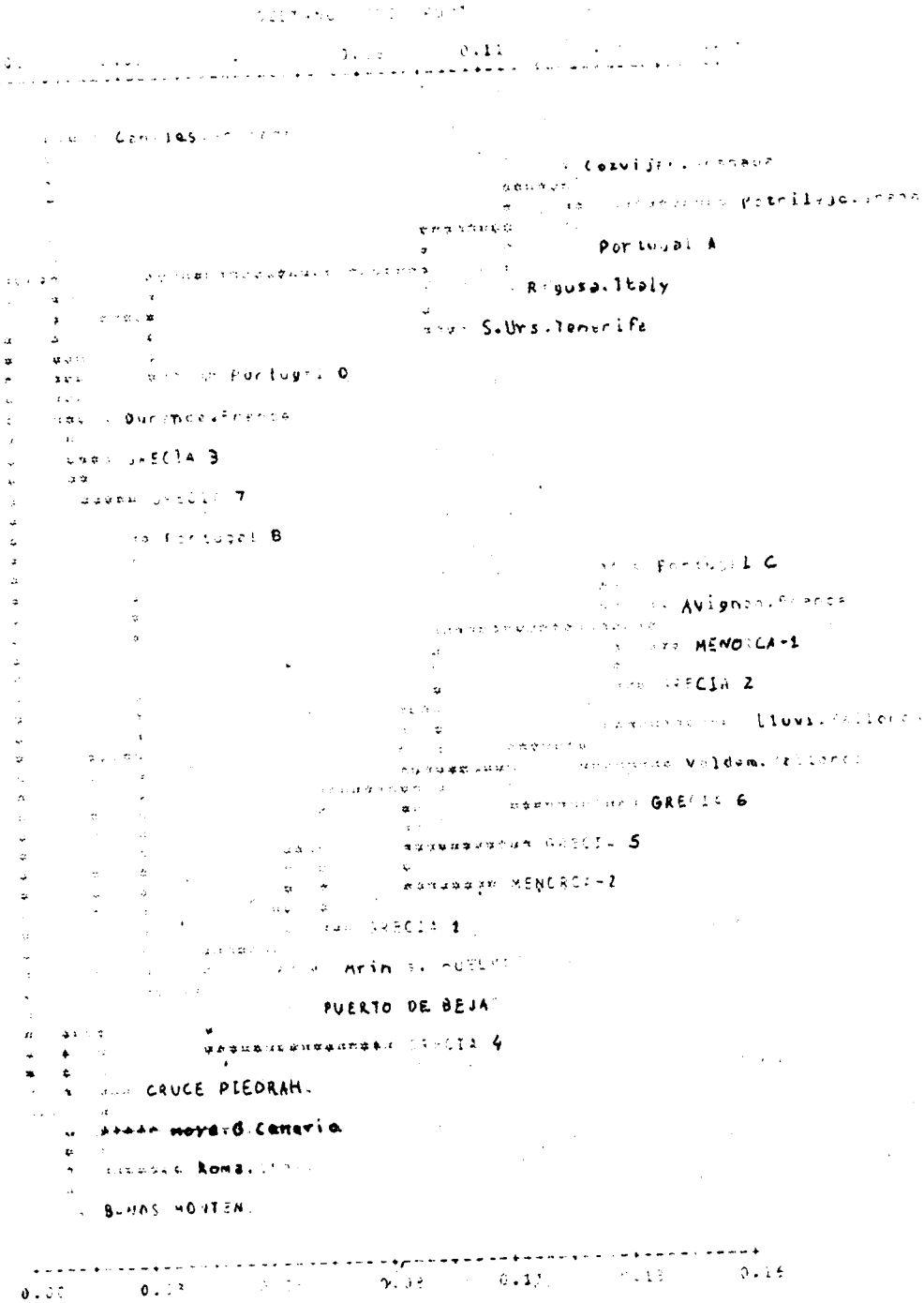


Fig. 35: Representación gráfica de las distancias genéticas existentes entre las poblaciones de *M. comosum* analizadas por nosotros y las poblaciones griegas analizadas por Bentzer y Ellmer (1975). El dendrograma se ha construido a partir de la matriz de distancias genéticas de Prevosti (1974), obtenida con los datos cromosómicos de las 28 poblaciones resultantes.

Tabla 20: Factores de las observaciones y de las variables de la matriz constituida por las frecuencias de las diferentes ordenaciones cromosómicas de *M. comosum* en las poblaciones analizadas por nosotros y en las seis poblaciones griegas analizadas por Bentzer y Ellmer, 1975)

<u>Observaciones</u>	<u>Distancia</u>	<u>Coordenadas</u>	
	<u>al origen</u>	<u>Factor 1</u>	<u>Factor 2</u>
GRE	0.0223	0.0987	-0.1120
RAG	-0.3850	-0.3805	-0.0124
ROM	0.0266	-0.0859	-0.1393
AVI	0.1270	0.2771	-0.2239
DUR	0.0145	-0.1190	0.0169
MEN-1	0.1440	0.2478	-0.2821
MEN-2	0.0696	0.1281	-0.2307
LLUV	0.3178	0.3152	0.4672
VAL	0.1950	0.3017	0.3199
BCA	0.0168	-0.1175	-0.0545
COZ	0.1718	-0.4144	0.0021
MOT	0.2613	-0.5094	0.0429
POA	0.1779	-0.4218	0.0053
POB	0.0011	0.0151	0.0300
POC	0.1166	0.3142	-0.1337
POD	0.0423	-0.1982	-0.0553
MOY	0.0103	-0.0090	-0.1011
SUR	0.1189	-0.3164	0.1369
GRE 2 (600)	0.1146	0.2765	-0.1954
GRE 3 (601)	0.0101	-0.0822	0.0576
GRE 4 (602)	0.0919	0.1568	0.2592
GRE 5 (603)	0.0697	0.2538	-0.0724
GRE 6 (604)	0.1330	0.3269	0.1615
GRE 7 (605)	0.0187	-0.0434	0.1294
<u>Variables</u>	<u>Distancia</u>	<u>Coordenadas</u>	
	<u>al origen</u>	<u>Factor 1</u>	<u>Factor 2</u>
Ord. estandar	0.0717	-0.2584	0.0697
Ord. invertida	0.2259	0.4555	-0.1353
Ord. con segmento	1.4220	0.6436	1.0039
Ord. sin segmento	0.0034	-0.0311	-0.0485





En la figura 36 se presenta el gráfico obtenido por la representación simultánea de las poblaciones y de las frecuencias cromosómicas, cuando se toman como ejes de coordenadas dichos factores.

Como se observa en la tabla 20, los factores I y II están determinados por los mismos componentes y en el mismo sentido que en el análisis de nuestras 22 poblaciones (véase tabla 17). Así, en la figura 36 podemos observar que la frecuencia del segmento diferencia claramente del resto de poblaciones a las de VAL, LLUV, y GRE 6 (604) y GRE 4 (602), que presentan una alta frecuencia del segmento y que, al contribuir dicha frecuencia positivamente tanto para el factor I como al factor II, sitúa dicho grupo de poblaciones en la parte superior derecha del gráfico.

Igualmente la frecuencia de la inversión, que contribuye positivamente al factor I y negativamente al factor II, diferencia claramente al agrupamiento formado por las poblaciones POC, AVI, MEN-1, MEN-2, GRE 2 (600) y GRE 5 (603), que presentan una alta frecuencia de inversión, y que quedan situadas en la parte superior izquierda del gráfico.

El tercer punto de diferenciación, constituido por la frecuencia del tipo estándar, diferencia al grupo de poblaciones constituido por MOT, POA, COZ, RAG y TEN, quedando dicho grupo situado en la parte inferior derecha del gráfico. Finalmente, en el centro del gráfico se puede observar el conjunto de poblaciones que presentan una frecuencia intermedia de inversión y baja del segmento.

#### 5.2.4.5 Asociación entre la inversión y el segmento

Para comprobar si la presencia del segmento supernumerario es independiente o no de la presencia de la ordenación estándar o invertida, hemos realizado un análisis de Ji- cuadrado de contingencia.

En la tabla 21 se recogen las frecuencias absolutas de los cuatro tipos cromosómicos que la segunda pareja de M. comosum puede presentar, agrupados según su morfología.

Tabla 21 : Frecuencias absolutas de los cuatro tipos cromosómicos de la segunda pareja

<u>Segmento</u>		<u>Inversión</u>	
	+	i	Total
Con segmento (1)	21	53	74
Sin segmento (-)	702	179	881
Total	723	232	955

El valor del Ji-cuadrado es de  $\chi^2 = 97.82$ , cuya probabilidad es  $p \gg 0.0001$ .

Podemos ver, por tanto, que aunque el tipo cromosómico estándar es el más frecuente, es el tipo invertido el que presenta mayor frecuencia de segmento supernumerario.

### 5.3 Anomalías en el comportamiento meiótico de la primera pareja de M. comosum

En el análisis meiótico llevado a cabo en la población de Silleta (véase tabla 3), frecuentemente se observa que la primera pareja del cariotipo presenta varios tipos de anomalías. Estas anomalías ocurren en varios de los individuos analizados, independientemente del genotipo que presenten para la segunda pareja.

Un primer tipo de anomalías observado es la formación de univalentes precoces, que se producen en profase I (diplotene y diacinesis) (Fig.37a) y/o Metafase I (Fig.37b). Aunque la frecuencia con que aparecen tales univalentes es muy baja, y no ha permitido efectuar un estudio detallado de los mismos, sí se han podido observar casos en que tales univalentes segregan normalmente (Fig.38), y otros en que experimentan (uno o los dos) prerreducción. Como consecuencia de este último fenómeno, a veces se han observado metafases I con un polo con un cromosoma y una cromátida y en el otro polo una sola cromátida (Fig.39), y metafases II correspondientes a este tipo de segregación (Fig. 40).

Otro tipo de anomalías, frecuentemente observadas en el comportamiento meiótico de la primera pareja, es la formación de puentes cromosómicos en el momento de su segregación anafásica. Estos puentes pueden ir acompañados de fragmentos cromosómicos ( Figs. 41, 42 y 43) o sin fragmento (Fig. 44). Los puentes con fragmento sólo se observan en anafase I de meiosis, mientras que los puentes sin fragmento se observan tanto en anafase I como en anafase II.

Ocasionalmente los puentes formados en anafase I no se dividen y es posible observarlos en fases posteriores como telofase I (Fig.45), diadas (Fig. 46) o segunda división (Fig.47).

Fig. 37a.- Diplotene donde se observa que la primera pareja forma univalentes precoces (flechas).

Fig. 37b.- Metafase-I donde se observa que la primera pareja forma univalentes precoces.

Fig. 38 .- Anafase-I en la que la primera pareja segrega normalmente.

Fig. 39 .- Metafase-Anafase-I donde se observa que un univalente de la primera pareja ha sufrido prerreducción (flecha).

Fig. 40 .- Metafase-II. En una de las células se observan, señalados por flechas, un cromosoma de la primera pareja junto con una cromátida. La otra célula presenta una sola cromátida de la primera pareja (flecha).



Fig.41 .- Anafase-I donde se observa un fragmento de tamaño intermedio

Fig.42 .- Anafase-I donde se observa la formación de un puente con un fragmento de tamaño intermedio en la primera pareja.

Fig.43 .- Anafase-I donde se observa la formación de un puente con un fragmento de tamaño grande en la primera pareja

Fig.44 .-Anafase donde se observa la formación de un puente sin fragmento en la primera pareja

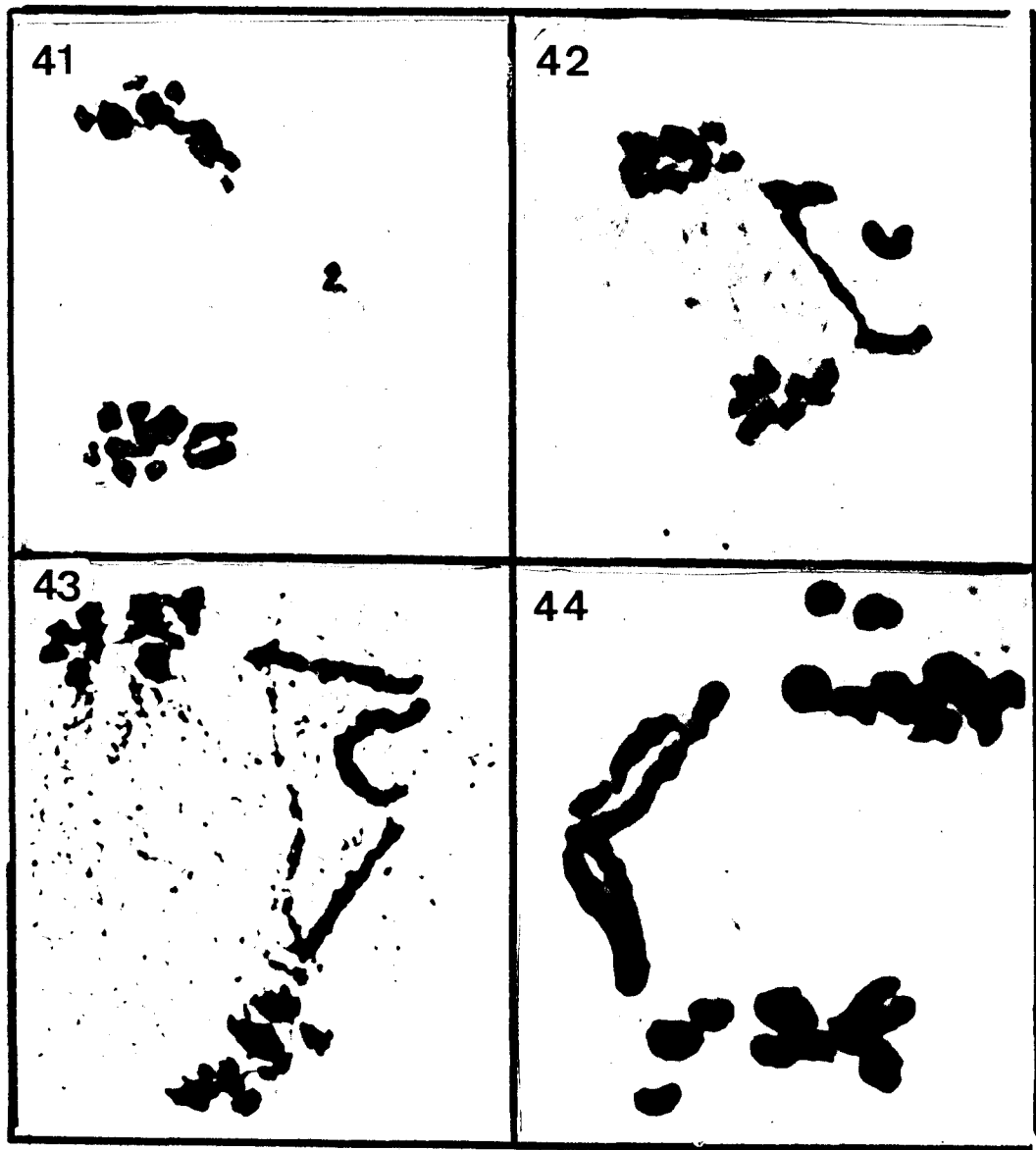
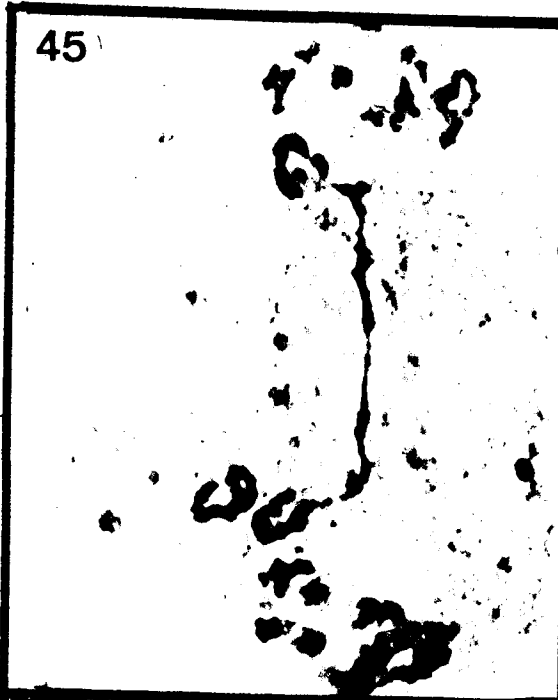


Fig. 45 .- Telofase-I en la que todavía persiste el puente anafásico producido en la primera pareja.

Fig. 46 .- Diadas. Aún persiste el puente anafásico producido en la primera pareja. Obsérvese como el fragmento se integra en uno de los polos.

Figs. 47a y b..- Metafases-II en las que se observa como el puente originado en la primera división persiste en la segunda.





Los puentes sin fragmento son de dos tipos, según su morfología:

1) Puentes cuya disposición se asemeja a una E (Fig. 48). Tales tipos de puentes se podrían explicar, de forma similar a la realizada por Bradham en *Aloineae* (1969 a y b), como consecuencia de una inversión doble pericéntrica y paracéntrica y la formación de un quiasma en un lugar próximo al centrómero (véase figura 48) (interpretación sugerida por el Dr. J. R. Lacadena). A favor de esta posible interpretación y de la ocurrencia de un quiasma en la proximidad del centrómero, en el centrómero, está la observación en M. comosum de bivalentes ditácticos (Fig. 49). Este tipo de puentes de tipo E se ha observado en un individuo y con una frecuencia muy baja.

2) El segundo tipo de puentes cromosómicos sin fragmento son aquéllos en los que se observa que el bivalente primero está unido por dos de sus cromátidas de forma intersticial o terminal (Figs. 50 y 51). El origen de tales tipos de puentes estaría, el primero en que serían intercambios que se resuelven sin formación de fragmentos y, el segundo en la dificultad de terminalización de quiasmas en la primera pareja, debido a su gran tamaño.

Por lo que se refiere a los puentes anafásicos con fragmento es de destacar que, en células anafásicas de un mismo individuo en las que ocurre dicha anomalía, el tamaño del fragmento es variable (Figs. 41, 42 y 43). Otra característica de los fragmentos producidos en anafase I es su permanencia incluso hasta anafase II.

La formación de puentes con fragmento en la primera pareja da lugar a la formación de polos anafásicos irregulares ( Fig. 52) que producen, asimismo, anafases II irregulares.

- Fig. 48a .- Configuración anafásica producida en la primera pareja de M. comosum semejante a la observada en los intercambios de tipo-E.
- Fig. 48b .- Interpretación del intercambio producido que ha podido originar la configuración observada.
- Fig. 49 .- Anafase-I donde se observa a la primera pareja formando univalentes ditácticos.
- Fig. 50 .- Anafase-I en la que se observa en la primera pareja la formación de un puente sin fragmento en posición intersticial.
- Fig. 51 .- Anafase-I en la que se observa en la primera pareja la formación de un puente sin fragmento en posición terminal.

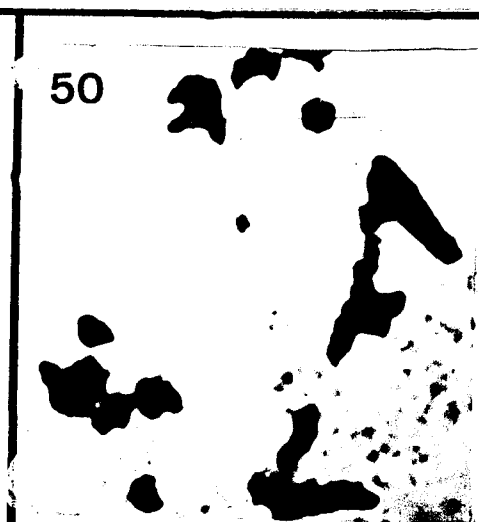
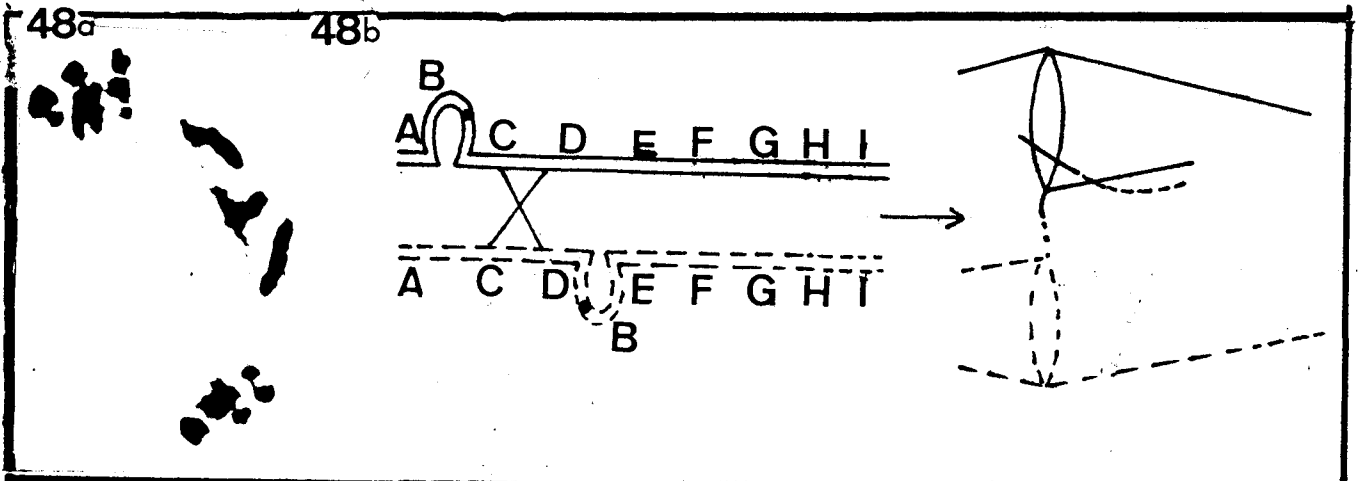


fig. 52: Anafase-I en la que se observa la formación de polos anafásicos irregulares. En el polo de la izquierda se aprecia sólo una cromátida completa de la primera pareja (flecha). En el polo de la derecha se aprecia también una sola cromátida más el fragmento producido en el intercambio (flecha).

Fig. 53: Anafase-II. En la célula superior se observa un polo con un cromosoma primero de longitud normal, y en el otro polo, un cromosoma de tamaño reducido. En la célula inferior se observa un polo anafásico con un cromosoma primero de longitud normal y en el otro un cromosoma de longitud reducida. En esta célula se puede observar el fragmento que es de gran tamaño.

Fig. 54: Metafase-II. El fragmento producido en la primera división persiste aún en la segunda (flecha).

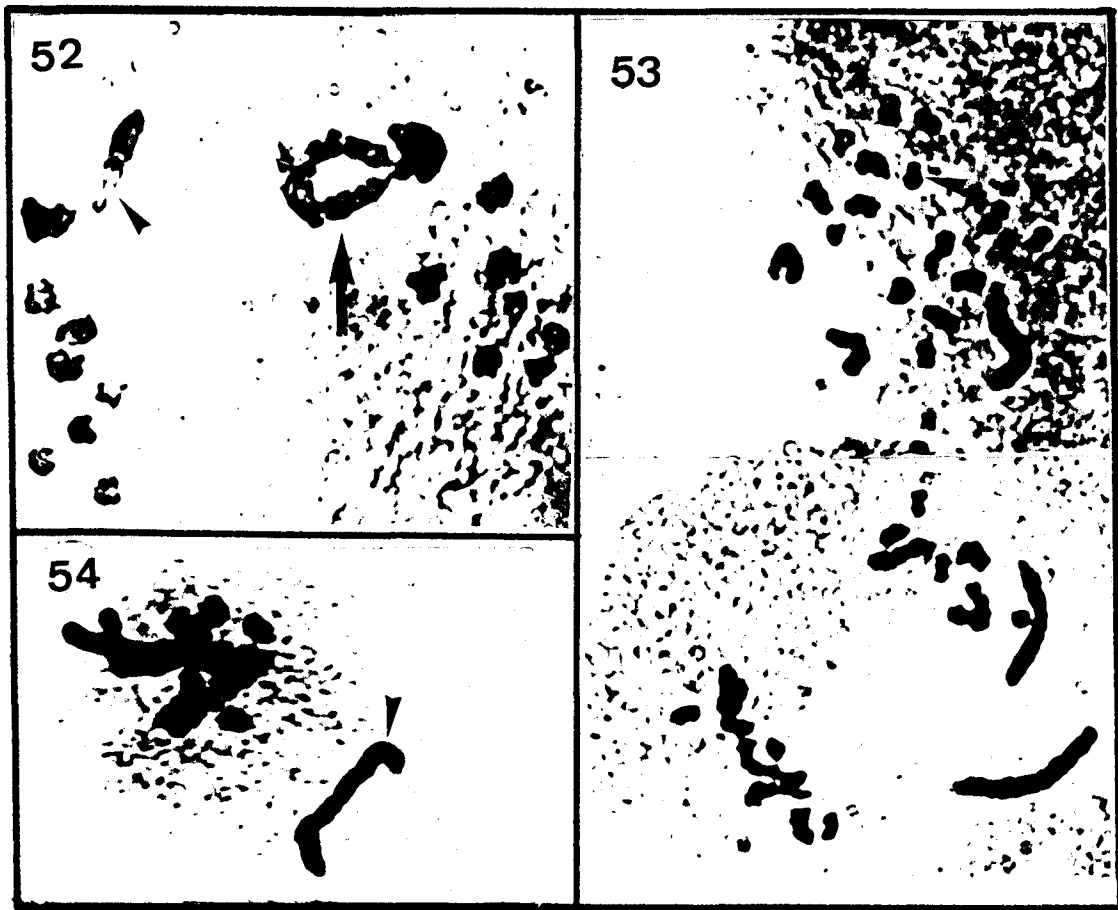


Fig. 55a .- Anafase-I en la que se producido un intercambio de tipo-U entre cromátidas hermanas (flecha).

Fig. 55b .- Anafase-II en la que se observa la formación de un puente anafásico en la primera pareja.

Fig. 56 .- Anafase-I en la que se ha producido un puente con fragmento en una de las parejas de menor tamaño.





Así, por ejemplo, en la figura 53 podemos observar una célula en anafase II que presenta una placa anafásica con un polo con un cromosoma normal y el otro polo con un cromosoma de tamaño reducido. En la placa anafásica complementaria aparece un cromosoma normal en un polo y en el otro se observa un cromosoma de tamaño reducido y el fragmento acéntrico.

De acuerdo con la bibliografía (Lewis y Jhon, 1966; Jones, 1969; Giráldez y Lacadena, 1978) los puentes anafásicos con fragmento se pueden producir fundamentalmente por dos tipos de fenómenos:

a) Por la formación de un quiasma en una inversión paracéntrica, o bien b) por la formación de intercambios erróneos (quiasmas erróneos) a los que, por la configuración anafásica que determinan, se denominan intercambios de tipo-U.

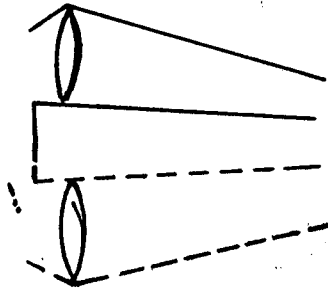
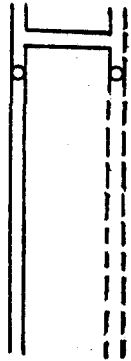
En el caso de M. comosum que nos ocupa, tal como se verá en detalle en la discusión, nosotros atribuimos la formación de puentes con fragmento en la primera pareja del cariotipo a intercambios de tipo U.

Si aceptamos que estas anomalías de M. comosum son resultado de quiasmas erróneos, sería posible correlacionar, por lo tanto, la longitud de los fragmentos producidos con las posiciones donde ocurren los quiasmas.

Así, teniendo en cuenta que en la primera pareja de M. comosum se pueden formar quiasmas en cinco posiciones (Fig. 57) (terminal en el brazo corto, proximal en el brazo largo, intersticial en el brazo largo, distal en el brazo largo y terminal en el brazo largo), la aparición de puentes con fragmentos de tamaño variable en un mismo individuo se puede

- Fig. 57 .- Bivalente de la primera pareja en la que se observan las distintas posiciones (terminal, proximal intersticial y distal) en las que se pueden producir la formación de quiasmas.
- Fig. 58 .- Interpretación gráfica y resultado de la formación de un intercambio de tipo-U en posición terminal en el brazo corto de la primera pareja .
- Fig. 59 .- Interpretación gráfica y resultado de la formación de un intercambio de tipo-U en posición proximal en el brazo largo de la primera pareja.
- Fig. 60 .- Interpretación gráfica y resultado de la formación de un intercambio de tipo-U en posición intersticial en el brazo largo de la primera pareja.
- Fig. 61 .- Interpretación gráfica y resultado de la formación de un intercambio de tipo-U en posición distal en el brazo corto de la primera pareja.

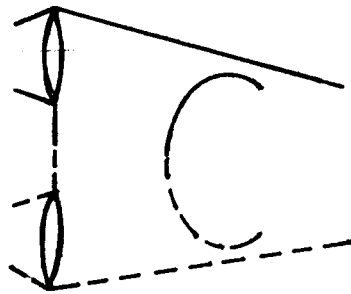
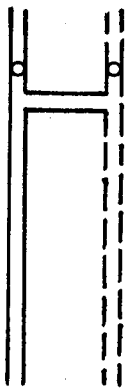
58



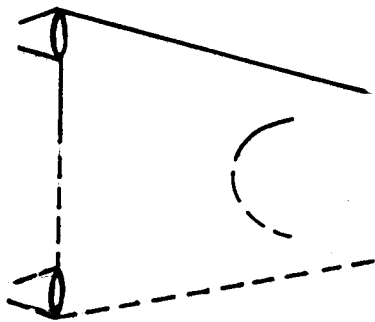
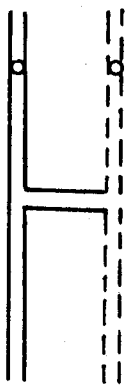
57



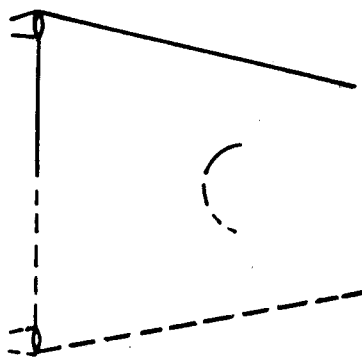
59



60



61



población de Silleta, que presentan una alta frecuencia de puentes con fragmento. Concretamente, hemos intentado averiguar si existe correlación entre las proporciones con que se producen los distintos quiasmas con las proporciones con que se producen los distintos fragmentos.

Para ello hemos cuantificado, en los tres individuos considerados, la frecuencia de formación de quiasmas en las tres zonas del brazo largo de la primera pareja que darían lugar a fragmentos distinguibles, por un lado. Y también hemos cuantificado la frecuencia con la que aparecen los fragmentos, clasificándolos en tres clases, según sea su longitud relativa respecto a la longitud total del brazo largo. Estos tres tipos de fragmentos son: del 10% al 40% de la longitud del brazo largo, tipo S; del 40% al 70%, tipo M; y del 70% al 100% de la longitud del brazo largo, tipo L.

En la tabla 22 presentamos, para cada uno de los individuos analizados, los porcentajes de formación de quiasmas en cada una de las tres posiciones consideradas, las proporciones de las tres clases de fragmentos producidos, según su longitud relativa, así como el tanto por ciento de puentes con fragmento observados en el total de células anafásicas contadas.

En esta tabla podemos observar que los quiasmas más frecuentes son los que se producen en posición distal del brazo largo, mientras que los fragmentos de tamaño intermedio (M) son los que se producen en mayor proporción.

Para ver si las diferencias existentes entre las frecuencias de quiasmas en las tres posiciones y las frecuencias de los tres tipos de fragmentos son significativas, hemos efectuado un análisis de Ji-cuadrado de contingencia. El valor de la Ji-cuadrado  $\chi^2 = 18.41$ , nos indica

que sí existen diferencias entre las distintas frecuencias, no existiendo por tanto una relación directa entre las frecuencias de los distintos quiasmas con las frecuencias de los tres tipos de fragmentos. Debe existir, por tanto, una causa biológica (o ambiental) que determine que los fragmentos de tamaño intermedio aparezcan con mayor frecuencia de la esperada con respecto a la formación de quiasmas intersticiales.

Tabla 22 : Frecuencia de anafases con puentes y fragmentos, junto con los porcentajes de quiasmas por posiciones y porcentaje de fragmentos por tamaño, en los tres individuos analizados.

Individuo	% A-I con		Porcentajes				
	P+F	Prox	L	Int	M	Dist	S
SILL 6	6.42	19.34	20	34.43	60	46.23	20
SILL 22	4.76	24.80	25	28.89	60	46.31	15
SILL 27	11.60	20.40	25	36.32	55	43.28	20
Media	7.60	21.51	23.33	32.21	58.33	45.27	18.33

P+F= anafases con puentes y fragmentos.

Prox= Quiasmas proximales. Int.= Quiasmas intersticiales. Dist.= Quiasmas distales.

L= Fragmento de tamaño grande ; M= Fragmento de tamaño intermedio .

S= Fragmento de tamaño pequeño

#### 5.4 Variabilidad genética en poblaciones naturales de *M. comosum*

Hemos llevado a cabo el estudio de cuatro sistemas enzimáticos en 18 poblaciones naturales de *M. comosum*: Alcohol deshidrogenasa (ADH), Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT), Isocitrato deshidrogenasa (IDH) y Glutamato deshidrogenasa (GDH). Las poblaciones analizadas y sus claves respectivas son las que se indican en la tabla 2.

De los cuatro sistemas enzimáticos analizados, dos de ellos (ADH y GOT) ya han sido analizados previamente en una tesis doctoral realizada en nuestro departamento (Pascual, 1983) y se ha determinado su control genético. Los dos sistemas restantes (IDH y GDH) se analizan aquí por primera vez, simultáneamente con otra tesis realizada por López Alonso (1984).

##### 5.4.1 Control genético de la actividad alcohol deshidrogenasa

El sistema enzimático alcohol deshidrogenasa de *M. comosum* presenta dos zonas de actividad ADH: ADH-1 y ADH-2, con expresión diferencial en los distintos tejidos. La ADH-1 se expresa en raíces, ovarios y semillas; la ADH-2 solamente se expresa en granos de polen. Este último locus génico, solamente lo hemos podido analizar en algunos individuos de muy pocas poblaciones, por lo que no lo hemos incluido en nuestros resultados. Desde ahora sólo nos referiremos a la ADH-1.

Nuestros resultados para el locus ADH-1 coinciden con los previamente presentados por Pascual (1983). Dicho isoenzima presenta un total de cuatro electromorfos que vamos a denominar a, b, c y d, por orden decreciente de movilidad, siendo el electromorfo a el más alejado del origen (Fig. 62). Los distintos fenotipos identificados son diez y son el resultado de todas las combinaciones posibles de los cuatro electromorfos.

Estos fenotipos son: a) fenotipos con una sola banda que coinciden con alguno de los cuatro electromorfos. b) fenotipos con tres bandas. En estos individuos las bandas superior o inferior coinciden con cualquiera de los cuatro electromorfos y la tercera banda con una movilidad intermedia, y generalmente de mayor intensidad, comportamiento típico de los enzimas dimericos (Fig. 62).

Pascual (1983) apuntó que el enzima ADH-1 podría estar codificada por un gen duplicado, basándose en una serie de observaciones tales como: a) La asimetría de algunos individuos heterocigotos en tejidos somáticos y semillas que se podrían deber a efectos de dosis génica. b) La aparición de semillas con más de tres bandas. c) La heterocigocis fijada que se observa al estudiar las semillas de algunos individuos tribandeados.

Del análisis de nuestros resultados, sin embargo, se pueden hacer las siguientes anotaciones 1º Todos los individuos adultos analizados nunca presentan más de tres bandas, aunque en muy raras ocasiones se han observado efectos de dosis génica. 2º la progenie heterocigota de la mayoría de las poblaciones estudiadas presentan asimismo un máximo de tres bandas. Estos resultados indican que aunque es posible que exista duplicación génica, el hecho de que no aparezcan individuos adultos con más de tres bandas sugiere o que la duplicación está restringida a algunas poblaciones o que exista una regulación diferencial para ambos loci de ADH. Esto permitiría la expresión de uno de ellos, sólo, en raíces de individuos adultos. De todas formas para nuestro análisis vamos a considerar un solo locus génico con actividad ADH (pues solo hemos analizado raíces).

#### 5.4.2 Control genético de la actividad glutamato oxaloacetato transaminasa

Al igual que en el caso del locus ADH-1 nuestros resultados coinciden con los encontrados por Pascual (1983). En todos los individuos y tejidos analizados se detectaron tres zonas de actividad que están bien diferenciadas y que, por sus distintas distancias de migración y su

comportamiento independiente, hacen pensar en la existencia de tres isoenzimas diferentes. Estos tres isoenzimas los vamos a denominar GOT-1, GOT-2 y GOT-3, en orden de mayor a menor movilidad desde el origen. Cada uno de los tres isoenzimas GOT está controlado por un isolocus diferente (GOT-1, GOT-2 y GOT-3), de acuerdo con el análisis de herencia efectuado por Pascual (1983).

Estos tres loci son dialélicos siendo el locus génico GOT-1 monomérico, y los loci GOT-2 y GOT-3 diméricos (Fig.64).

#### 5.4.3 Control genético de la actividad isocitrato deshidrogenasa

Todos los individuos y tejidos analizados presentan una sola zona de actividad isocitrato deshidrogenasa, es decir existiría una sola isoenzima IDH.

En raíces y semillas existen tres tipos de comportamientos fenotípicos (Fig.63). Dos de ellos presentan una sola banda (rápida o lenta), y un tercer tipo que presenta tres bandas (una rápida, una lenta y una de movilidad intermedia que presenta una tinción de mayor intensidad (véase Fig. 63)).

En granos de polen, los compartamientos individuales, difieren de los observados en raíces, ya que aunque existen los dos fenotipos con una sola banda y de igual movilidad a la de las raíces, el tercer fenotipo presenta solamente dos bandas una banda rápida y otra lenta (Fig.63), no existiendo la banda intermedia. Este comportamiento de dos bandas en granos de polen corresponde a los individuos con tres bandas en sus raíces. Esto nos indicaría que esta única isoenzima IDH, es de naturaleza dimérica y que estaría controlado por un único gen con dos alelos uno rápido que vamos a denominar a y otro lento b (véase Fig. 63).



Los individuos con una sola banda son o bien homocigóticos para el alelo rápido *a* u homocigóticos para el alelo lento *b*, con lo cual solo formarían un solo tipo de dímero. En los individuos con tres bandas en sus tejidos somáticos, el genotipo para este isoenzima sería *a/b*, por lo que en células diploides se formarían simultáneamente homodímeros rápidos y homodímeros lentos, pero también se formarían heterodímeros rápidos-lentos.

Por otra parte, en los granos de polen (que son células haploides) todos los individuos heterocigóticos *a/b* para el isoenzima IDH, solamente podrán formar dímeros rápidos o dímeros lentos, pero no heterodímeros. Esta es la razón por la que estos individuos presentan solo dos bandas en sus granos de polen.

Esta hipótesis del control genético de la IDH por un solo locus con dos alelos, se comprueba mediante el análisis de la herencia de la tabla 23

Así, cuando se analizan semillas de individuos que presentan una sola banda (rápida o lenta) todas las semillas presentan esa misma banda, pudiendo existir también semillas de fenotipo tribandeado como resultado de fecundación cruzada con un grano de polen portador del alelo distinto al materno. Si el individuo del que se analizan sus semillas es de fenotipo tribandeado, éstas presentan, como mínimo, una de las bandas maternas o bien presentan el mismo fenotipo tribandeado.

#### 5.4.4 Control genético de la actividad glutamato deshidrogenasa

Con el sistema de tampones utilizado, el análisis de la actividad glutamato deshidrogenasa ha revelado la existencia de una sola zona de actividad GDH. Su expresión es constante en todos los órganos analizados y muestra una única movilidad electroforética, en todos los individuos

tabla 23: Análisis de la pro genie de algunos individuos representativos  
para el isoenzima Isocitrato dehidrogenasa

Individuo	<u>Genotipo materno</u>	<u>Progenie</u>
1	LL	7 LL 2 RL -
2	LL	9 LL 3 RL -
3	RL	8 LL 3 RL -
4	LL	3 LL 4 RL
5	RL	- 8 RL 2 RR
6	RL	- 5 RL 2 RR
7	LL	11 LL 4 RL -
8	LL	10 LL - -
9	RR	- 7 RL -
10	LL	10 LL - -

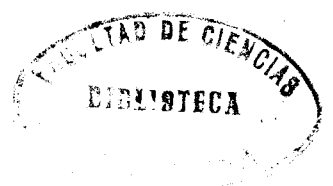


Fig. 62: Distintos fenotipos de ADH-1 en raíces de M. comosum. En la fotografía pueden observarse la mayoría de las combinaciones posibles entre los cuatro electromorfos.

Fig. 63: Expresión de IDH en raíces y polen. Las inserciones de la izquierda corresponden a granos de polen. En ellos se pueden observar, que no se produce la banda heterodimérica. Las inserciones de la derecha, corresponden a raíces. En este tejido sí se produce la formación de la banda heterodimérica.

Fig. 64: Isoenzimas de GOT en raíces de M. comosum. En la fotografía se pueden observar los tres isoenzimas existentes.

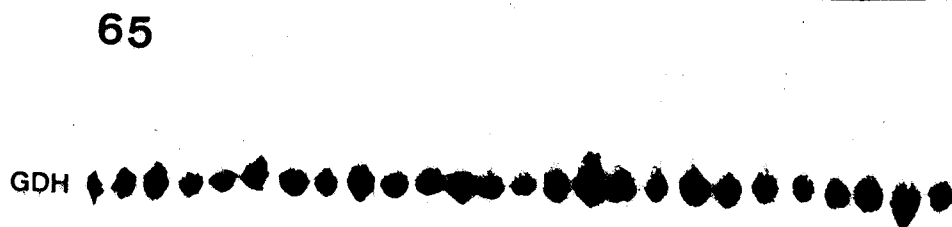
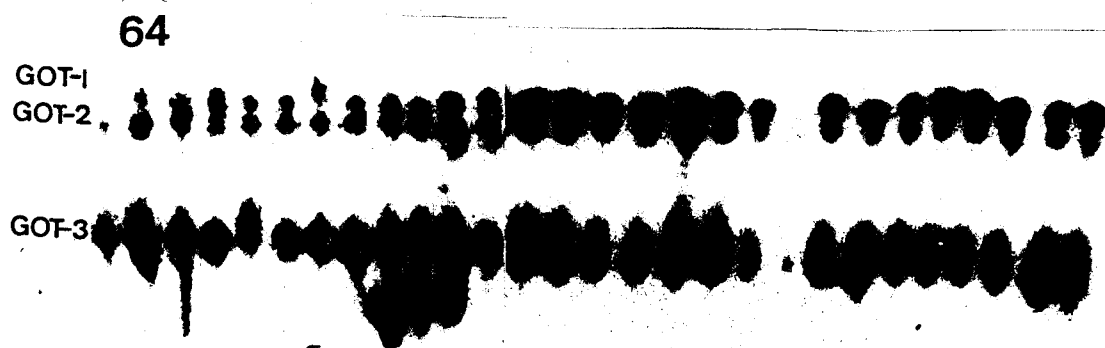
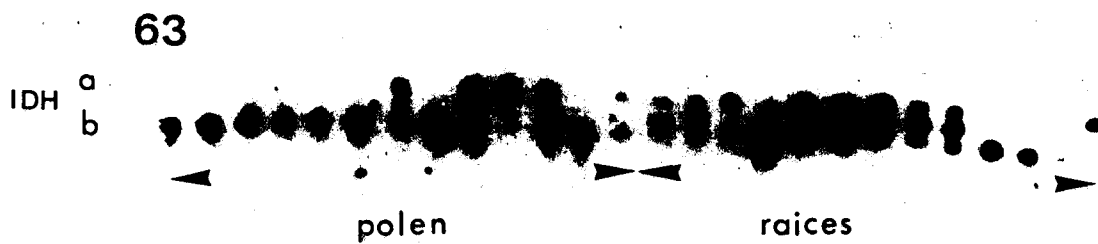
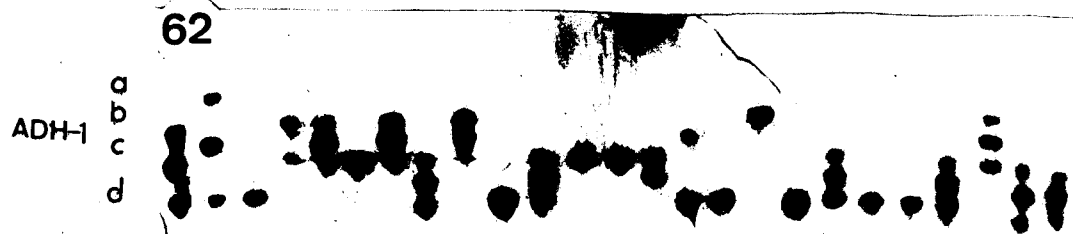
Fig. 65: Actividad GDH en raíces de M. comosum.

Fig. 62: Distintos fenotipos de ADH-1 en raíces de M. comosum. En la fotografía pueden observarse la mayoría de las combinaciones posibles entre los cuatro electromorfos.

Fig. 63: Expresión de IDH en raíces y polen. Las inserciones de la izquierda corresponden a granos de polen. En ellos se pueden observar, que no se produce la banda heterodimérica. Las inserciones de la derecha, corresponden a raíces. En este tejido sí se produce la formación de la banda heterodimérica.

Fig. 64: Isoenzimas de GOT en raíces de M. comosum. En la fotografía se pueden observar los tres isoenzimas existentes.

Fig. 65: Actividad GDH en raíces de M. comosum.



analizados. Además, los resultados obtenidos en el análisis de la herencia realizado muestran que la banda invariable presente en los parentales, aparece siempre en todos los individuos de la descendencia. Por tanto, podemos considerar que el isoenzima GDH está codificado por un gen monomórfico. (Fig. 65).

#### 5.4.5 Frecuencias genotípicas y génicas

Las frecuencias genotípicas, determinadas a partir de las frecuencias fenotípicas observadas en cada una de las poblaciones, se presentan en la tabla 24 para el locus ADH-1, en la tabla 25 para los loci GOT-1, GOT-2 y GOT-3 y en la tabla 26 para el locus IDH. Para el locus GDH, los individuos analizados en cada población han sido los mismos que para el locus IDH.

A partir de dichas frecuencias genotípicas hemos calculado, por el método de máxima verosimilitud, las frecuencias génicas de los distintos loci en cada una de las poblaciones (Tabla 27).

Lo primero a señalar en dicha tabla es que todas las poblaciones presentan, por lo general, los mismos alelos en todos los loci, y con frecuencias similares, habiendo algunas poblaciones donde faltan algunos de ellos. Así, concretamente, por lo que respecta al gen ADH-1 es el alelo c el más frecuente en la mayoría de las poblaciones, siendo tan solo superado en cuatro de las poblaciones (MEN-1, LLUV, POD y MOY) por el alelo d y por el alelo b en una (VAL). El alelo d es el segundo en frecuencia, seguido por el alelo b. El alelo b no ha sido observado en una sola población (POD) y el alelo a, que es el que presenta menor frecuencia, no ha sido observado en dos (GRE y POD).

El gen GOT-1 es el más variable del sistema GOT, siendo el alelo lento (b) el que presenta mayor frecuencia en todas las poblaciones,

Tabla 24: Frecuencias genotípicas para el locus ADH-1 en M. comosum

Población	Genotipos										Total
	a/a	a/b	a/c	a/d	b/b	b/c	b/d	c/c	c/d	d/d	
GRE	-	-	-	-	5	20	2	21	28	10	86
RAG	-	1	1	3	4	3	4	8	8	6	38
ROM	-	4	1	3	-	9	3	8	12	6	46
AVI	1	3	2	1	1	11	4	5	8	-	36
DUR	-	1	4	2	-	8	4	9	14	3	45
MEN-1	-	-	-	1	1	2	2	1	5	6	18
MEN-2	1	1	-	-	1	2	2	4	2	-	13
LLUV	1	3	3	6	3	8	12	3	9	10	58
VAL	-	1	1	8	3	5	1	-	4	2	25
BCA	1	-	3	-	-	4	3	6	4	5	26
COZ	2	1	2	2	5	13	8	14	5	6	58
MOT	1	1	4	-	1	11	4	11	16	6	55
POA	-	-	4	3	-	3	-	14	14	3	41
POB	-	-	1	-	-	3	4	11	15	7	41
POC	-	1	3	-	1	7	2	12	15	4	45
POD	-	-	-	-	-	-	-	-	37	10	47
MOY	-	-	2	1	-	3	4	5	7	10	32
SUR	-	-	5	-	-	-	3	7	6	2	23

Tabla 25 : Frecuencias genotípicas para el sistema enzimático GOT

Gen: Población	GOT-1				GOT-2				GOT-3			
	b/b	a/b	a/a	Total	b/b	a/b	a/a	Total	b/b	a/b	a/a	Total
GRE	80	3	-	83	-	-	82	82	86	-	-	86
RAG	34	5	-	39	1	-	38	39	39	-	-	39
ROM	41	6	-	47	-	-	47	47	41	6	-	47
AVI	30	5	-	35	-	-	36	36	34	2	-	36
DUR	38	10	-	48	1	-	49	50	44	6	-	50
MEN-1	18	1	-	19	-	-	19	19	16	3	-	19
MEN-2	12	1	-	13	-	-	13	13	13	-	-	13
LLUV	38	7	5	50	-	-	49	49	46	3	-	49
VAL	14	3	1	18	-	1	17	18	18	-	-	18
BCA	26	-	-	26	-	-	26	26	23	3	-	26
COZ	54	2	1	57	-	2	55	57	56	-	1	57
MOT	58	1	-	59	-	-	59	59	52	7	-	59
POA	40	-	-	40	-	-	40	40	38	2	-	40
POB	35	7	-	42	-	-	44	44	41	-	-	41
POC	43	2	-	45	-	-	45	45	45	-	-	45
POD	39	1	-	40	-	-	40	40	40	-	-	40
MOY	31	2	-	33	-	-	82	82	33	-	-	33
SUR	23	-	-	23	-	-	23	23	22	1	-	23



Tabla 26: Frecuencias genotípicas para el locus IDH

<u>Población</u>	a/a	a/b	b/b	Total
GRE	1	3	78	82
RAG	-	5	28	33
ROM	2	10	35	47
AVI	-	7	29	36
DUR	3	9	33	45
MEN-1	-	4	15	19
MEN-2	-	2	11	13
LLUV	-	1	49	50
VAL	-	-	18	18
BAC	1	10	15	26
COZ	1	11	46	58
MOT	-	2	57	59
POA	-	6	34	40
POB	-	22	22	44
POC	1	5	39	45
POD	-	9	21	30
MOY	-	10	13	23
SUR	-	2	20	22
				690

Tabla 27: Frecuencias génicas para los seis loci analizados

Locus	Poblaciones								
	GRE	RAG	ROM	AVI	DUR	MEN-1	MEN-2	LLUV	VAL
Adh-1									
n	86	38	46	36	45	18	13	58	25
a	.00	.07	.09	.11	.08	.03	.12	.12	.20
b	.19	.21	.17	.28	.14	.17	.27	.25	.26
c	.52	.37	.41	.43	.49	.25	.46	.22	.20
d	.29	.36	.33	.18	.29	.56	.15	.41	.34
GOT-1									
n	83	39	46	36	45	19	13	50	19
a	.02	.06	.06	.07	.10	.03	.04	.17	.14
b	.98	.94	.94	.93	.90	.97	.96	.83	.86
GOT-2									
n	82	39	47	36	50	19	13	49	18
a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
b	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
GOT-3									
n	50	39	47	35	50	19	13	49	18
a	1.00	1.00	.94	.97	.94	.92	1.00	.97	1.00
b	.00	.00	.06	.03	.06	.08	.00	.03	.00
IDH									
n	82	33	47	36	50	19	13	49	18
a	.06	.00	.06	.03	.06	.08	.00	.03	.00
b	1.00	1.00	.94	.97	.94	.92	1.00	.97	1.00
GDH									
n	82	33	47	36	50	19	13	49	18
a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

n= número de individuos analizados para cada locus en cada población

tabla 27 (continuación)

Locus	Poblaciones								
	BCA	COZ	MOT	POA	POB	POC	POD	MOY	SUR
ADH-1									
n	26	58	55	41	41	45	47	32	23
a	.10	.08	.07	.09	.01	.04	.00	.05	.11
b	.13	.28	.17	.04	.09	.13	.00	.11	.07
c	.44	.41	.48	.50	.50	.54	.39	.34	.54
d	.33	.23	.28	.28	.40	.28	.61	.50	.28
GOT-1									
n	26	57	59	40	42	45	40	33	23
a	.00	.04	.01	.00	.08	.02	.01	.03	.00
b	1.00	.96	.99	1.00	.92	.98	.99	.97	1.00
GOT-2									
n	26	57	59	40	44	45	40	33	23
a	1.00	.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
b	.00	.02	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
GOT-3									
n	26	57	59	40	41	45	40	33	23
a	.06	.02	.03	.00	.00	.00	.00	.00	.02
b	.94	.98	.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.98
IDH									
n	26	58	59	40	44	45	30	23	22
a	.23	.11	.02	.08	.25	.08	.15	.22	.05
b	.77	.89	.98	.92	.75	.92	.85	.78	.95
GDH									
n	26	58	59	40	44	45	30	23	22
a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

n= número de individuos analizados para cada locus en cada población

habiendo dos poblaciones en que dicho alelo aparece fijado. Le sigue en variabilidad el gen GOT-3, cuyo alelo más frecuente es el lento (b), estando fijado en ocho poblaciones. El gen que presenta menor variabilidad es el GOT-2, estando la mayoría de las poblaciones fijadas para el alelo (a).

Por lo que respecta al gen IDH, el alelo más frecuente es el alelo b, habiendo poblaciones en que el alelo a también se presenta con cierta frecuencia. Solamente la población de VAL se encuentra fijada para el alelo b.

El gen GDH aparece fijado para un solo alelo en todas las poblaciones, es decir es monomórfico.

#### 5.4.6 Medidas de la variabilidad génica

Son varias los estadísticos que pueden medir la cantidad de variabilidad genética existente en una población, siendo la heterocigosidad, o la frecuencia media de individuos heterocigotos de una población, la más eficiente (H)

En la tabla 28 se presentan la heterocigosidad observada en cada uno de los loci, en todas las poblaciones. Se observa que la heterocigosidad es muy alta en ADH-1, ya que es un locus multialélico, hay una heterocigosidad media en los loci IDH y GOT-1, siendo muy reducida en el locus GOT-3 y casi nula en el locus GOT-2. El locus GDH, al ser monomórfico, presenta una heterocigosidad nula.

La heterocigosidad media para cada población, H, el número de alelos por locus, A, y la proporción de loci polimórficos, P, se recogen en la tabla 29.

Los valores de heterocigosidad observada en todas las poblaciones

Tabla 28 : Heterocigosidad ( $H_i$ ) génica observada en cada uno de los loci por poblaciones

<u>Población</u>	<u>IDH</u>	<u>ADH</u>	<u>GOT-1</u>	<u>GOT-2</u>	<u>GOT-3</u>
GRE	.04	.58	.04	0	0
RAG	.15	.53	.13	0	0
ROM	.21	.70	.13	0	.13
AVI	.19	.80	.14	0	.05
DUR	.20	.73	.21	0	.12
MEN-1	.21	.55	.05	0	.16
MEN-2	.15	.54	.08	0	0
LLUV	.02	.71	.14	0	.06
VAL	0	.76	.17	.05	0
BAC	.38	.54	0	0	.11
COZ	.19	.53	.04	.06	0
MOT	.03	.65	.02	0	.12
POA	.15	.59	0	0	.05
POB	.50	.56	.17	0	0
POC	.11	.62	.04	0	0
POD	.30	.78	.03	0	0
MOY	.43	.53	.06	0	0
SUR	.09	.61	0	0	.04

Tabla 29 : Heterocigosidad (H) génica observada, proporción de loci polimórficos (P) y número de alelos por locus (A), en cada una de las poblaciones analizadas

<u>Población</u>	H	A	P (.95)	P (.99)
GRE	.11	1.50	16.67	33.33
RAG	.13	1.83	50.00	50.00
ROM	.19	2.00	66.67	66.67
AVI	.20	2.00	50.00	66.67
DUR	.20	2.00	66.67	66.67
MEN-1	.16	2.00	50.00	66.67
MEN-2	.13	1.83	33.33	50.00
LLUV	.15	2.00	33.33	66.67
VAL	.16	1.67	33.33	33.33
BAC	.17	1.83	50.00	50.00
COZ	.13	2.17	33.33	83.33
MOT	.13	2.00	16.67	50.00
POA	.13	1.83	33.33	50.00
POB	.20	1.83	50.00	50.00
POC	.13	1.83	33.33	50.00
POD	.18	1.50	33.33	50.00
MOY	.17	1.83	33.33	50.00
SUR	.12	1.83	16.67	50.00
Media	.16	1.86	38.88	54.63
ES	.007	.04	3.56	2.95

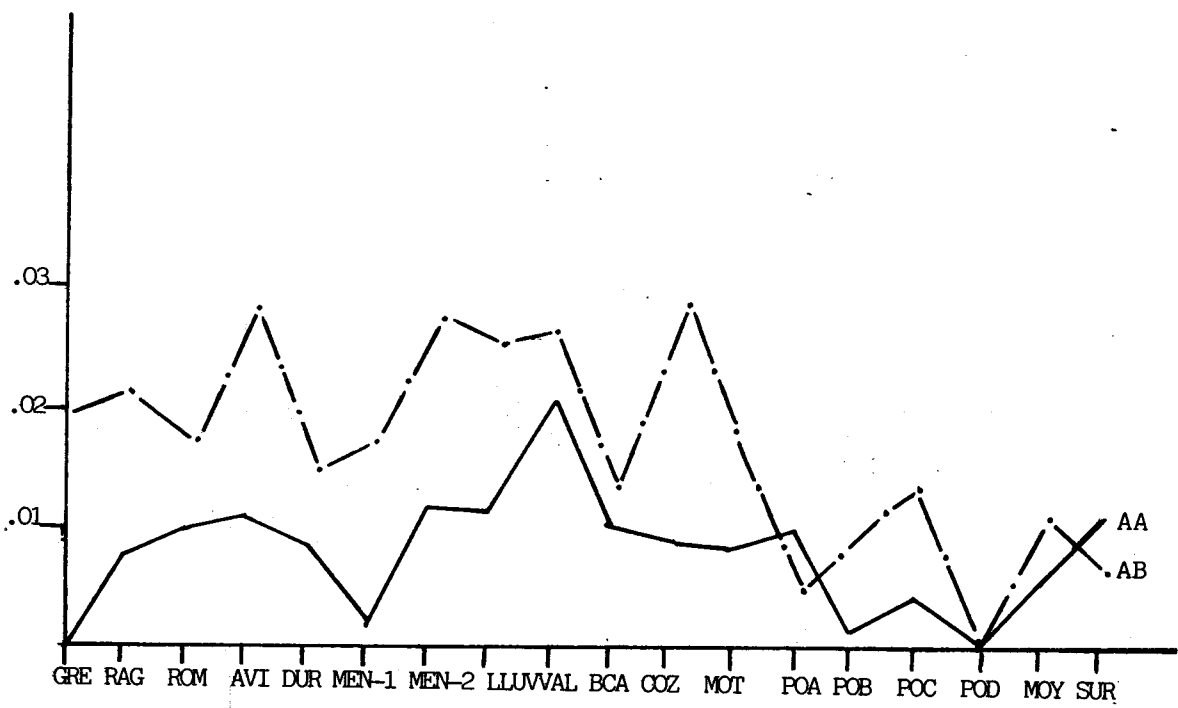


Fig. 66: Representación gráfica de las frecuencias de los alelos a y b de la ADH-1 en las poblaciones analizadas

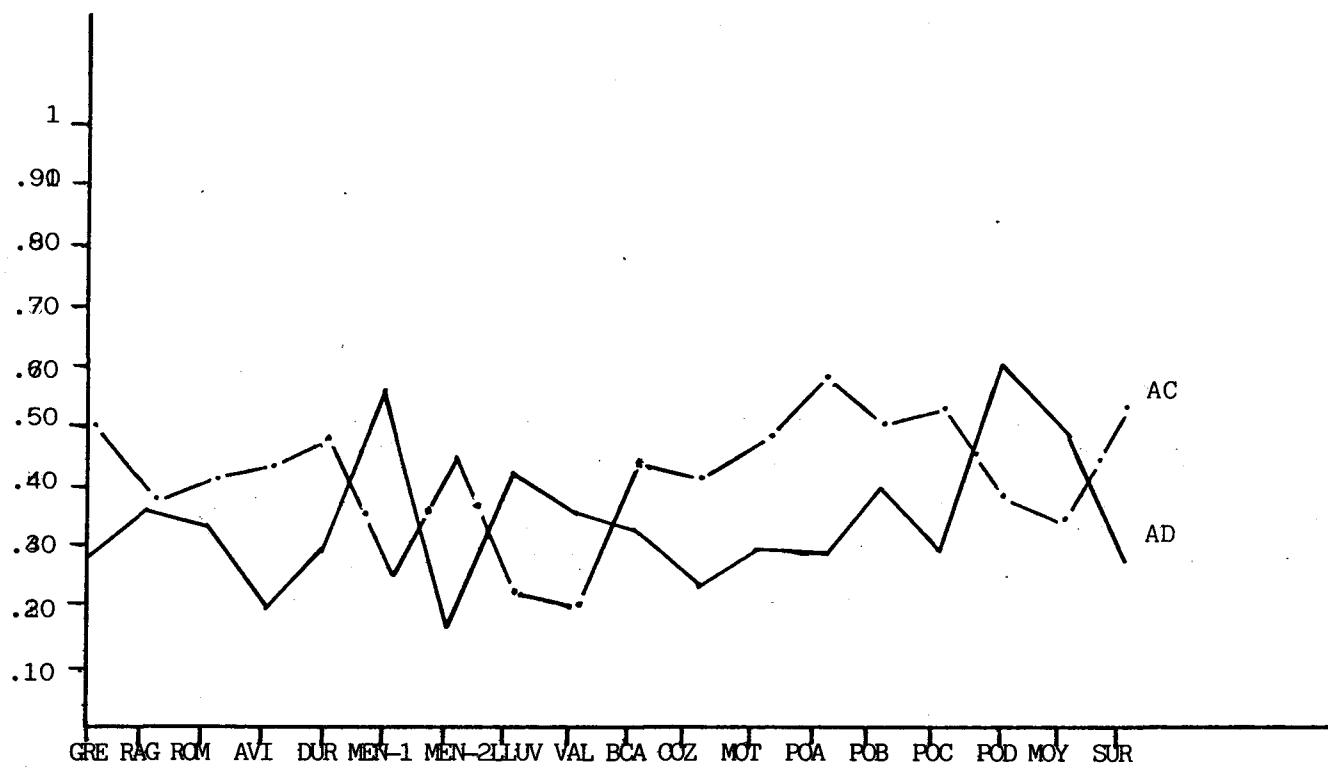


Fig.67 Representación gráfica de las frecuencias de los alelos c y d de la ADH-1 en las poblaciones analizadas



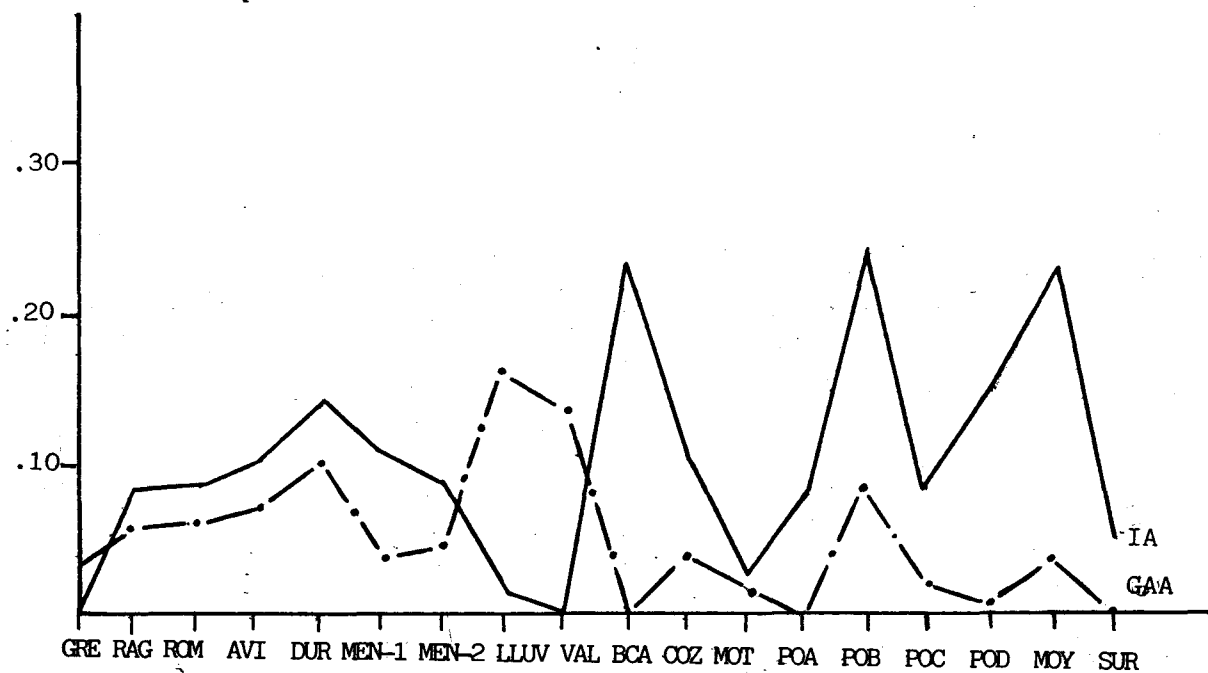


Fig. 68: Representación gráfica de las frecuencias de los alelos a de la IDH y a de la GOT-1 en las poblaciones analizadas

son muy similares y van desde valores de .11 en la población de GRE hasta .20 en las poblaciones de AVI, DUR y POB. El valor medio de la heterociguidad en el conjunto de las poblaciones es de  $.16 \pm .007$

La proporción de loci polimórficos por población, con el criterio del .95, varía desde 16.67 hasta 66.67 con una media de  $38.88 \pm 3.56$ . Con el criterio del .99 varía desde 33.33 hasta 83.33 con una media de  $54.43 \pm 2.95$ .

#### 5.4.7 Estructura genética de las poblaciones

Como se puede observar en las Figs. 66, 67 y 68, los tres loci que presentan mayor variabilidad (ADH-1, IDH y GOT-1) presentan una gran heterogeneidad geográfica.

En la tabla 30 se recogen las estimas de los índices de fijación ( $F_i$ ) para cada población y para cada locus. Para el locus ADH-1, los índices de fijación toman, en la mayoría de las poblaciones, valores negativos, lo que indicaría un exceso de individuos heterocigotos. Los valores extremos para este locus son de +.3806 en la población de MEN-2 y -.6545 en la población POD.

Igualmente, los índices de fijación para los loci IDH y GOT-1 toman valores negativos en gran parte de las poblaciones, siendo para IDH los valores extremos los de +.3773 en la población de GRE y de -.3333 en POB, y para GOT-1 los de +.5431 en la población de COZ y de -.2626 en la población POD.

En las poblaciones en las que se ha observado variabilidad para el locus GOT-3, los valores de  $F_i$  son negativos, variando desde +.0454 en la población de AVI hasta -.2755 en la población POA. Para los loci GOT-2 y GDH, no hemos realizado cálculo de los índices de fijación, al presentar

Tabla 30: Valores de  $F_i$  para cada locus en cada una de las poblaciones

<u>Población</u>	<u>ADH</u>	<u>IDH</u>	<u>GOT-1</u>	<u>GOT-3</u>
GRE	-.1180	.3773	.0779	+1
RAG	.3226	-.0293	-.1365	+1
ROM	.0114	.1656	-.1317	-.1317
AVI	-.1899	.0802	-.0972	.0454
DUR	-.1560	.2912	-.1574	-.0638
MEN-1	-.0370	-.0752	.0956	-.0726
MEN-2	.3806	-.0451	-.0016	+1
LLUV	-.0050	-.0307	.5038	-.0519
VAL	-.2500	+1	.3078	+1
BCA	.1414	-.0858	+1	-.0229
COZ	.2872	.0313	.5431	+1
MOT	-.0013	.1352	.1439	-.0518
POA	-.0670	-.1520	+1	-.2755
POB	-.1182	-.3333	-.1322	+1
POC	-.0731	.0149	-.1337	+1
POD	-.6545	-.1764	-.2626	+1
MOY	.1644	-.2680	-.0413	+1
SUR	.0373	.0430	+1	-.1091

una escasa o nula variabilidad.

Para comprobar si el exceso o defecto de individuos heterocigotos detectado en algunos loci y en algunas poblaciones es estadísticamente significativo, hemos realizado un análisis estadístico mediante los estadísticos Ji-cuadrado y  $T_s$  de Student para frecuencias normalizadas, respecto a las frecuencias de equilibrio.

En la tabla 31 se recogen los valores obtenidos, (los valores con una + en su parte anterior corresponden a valores de  $T_s$ , y el resto son valores de Ji-cuadrado). Pasamos a analizar dichos datos, locus a locus:

Por lo que respecta al locus ADH-1 hemos aplicado un test de Ji-cuadrado simple. En algunas poblaciones, en las que algunas clases genotípicas no están presentes, hemos combinado las distintas clases de tal forma que los valores esperados en las clases nuevas sean mayores de uno. El número de clases resultantes es el que se considera para calcular los grados de libertad. En la población POD, que solamente presenta dos clases genotípicas, el análisis estadístico lo hemos realizado mediante una  $T_s$  para frecuencias normalizadas.

Todas las poblaciones presentan valores de Ji-cuadrado que no son estadísticamente significativos. Sin embargo, la población POD presenta valores de  $T_s$  que son estadísticamente significativos para la frecuencia de la clase genotípica c/c,  $T_s = 3.88$ ,  $p \gg 0.05$  y para el genotipo c-d,  $T_s = -3.55$ ,  $p \gg 0.05$ .

Para el locus IDH, los valores de  $T_s$  que se recogen en la tabla son los referidos al genotipo a/a, el resto de genotipos no presentan valores estadísticamente significativos. Todos los valores son estadísticamente no significativos excepto en el caso de la población POB cuyo valor de,

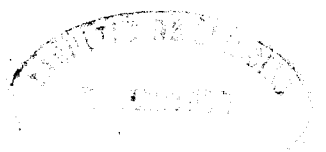


Tabla 31: Valores de Ji-cuadrado y  $T_s$  de Student, resultantes de la comparación de las combinaciones genotípicas observadas para los cinco loci variables, con las esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg, en cada población.

<u>Población</u>	<u>ADH</u>	<u>IDH</u>	<u>GOT-1</u>	<u>GOT-2</u>	<u>GOT-3</u>
GRE	9.16	2.58	+ .29	-	-
RAG	5.30	+ .72	+ .68	+ 1.28	-
ROM	.96	2.20	+ .65	-	+ .68
AVI	1.60	+ .94	+ .75	-	+ .28
DUR	.55	2.12	+1.19	+ 1.36	+ .67
MEN-1	.60	+ .57	+ .20	-	+ .55
MEN-2	1.95	+ .45	+ .23	-	-
LLUV	.64	+ .11	12.69 ***	-	+ .33
VAL	4.34	-	1.65	-	-
BCA	1.16	.92	-	-	+ .48
COZ	7.42	.92	2.45	+ 1.68	+ .16
MOT	1.64	+ .20	+ .12	-	+ .73
POA	.15	+ .80	-	-	+ .25
POB	.50	+ 2.63 **	+ .82	-	-
POC	2.84	.57	+ .23	-	-
POD	+ 3.88 **	+ 1.77	+ .13	-	-
MOY	2.13	+ 1.67	+ .27	-	-
SUR	.95	+ .36	-	-	+ .15

Los valores señalados con +, son valores de  $T_s$  de Student. Solamente se presentan los valores de  $T_s$  para los genotipos a/a del locus IDH, a/a del locus GOT-1, b/b del locus GOT-2 y a/a del locus GOT-3.

$T_s=2.63$ , sí alcanza el nivel de significación. El resto de los valores de Ji-cuadrado no son estadísticamente significativos.

Para el locus GOT-1, solamente la población de LLUV presenta diferencias significativas respecto a las frecuencias de equilibrio. El resto de las poblaciones aparecen en equilibrio de Hardy-Weinberg. Asimismo, los valores presentados son los referidos al genotipo a/a.

Por lo que respecta al locus GOT-3, todas las pruebas realizadas han sido mediante  $T_s$  de Student y los valores que se recogen en la tabla 31 son los que se refieren al genotipo a/a. Los valores obtenidos no son estadísticamente significativos, estando, pues, todas las poblaciones en equilibrio.

En la tabla 32 se presentan los valores de los índices de fijación ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$ ) y Ji-cuadrado, para cada locus en el conjunto de las poblaciones

$F_{IS}$  toma valores negativos para ADH-1 y GOT-3, lo que indica un pequeño exceso de heterocigotos en el conjunto de las poblaciones (los valores de  $F_{IS}$  se han calculado solamente con los valores de  $F_i$  que fueran diferentes de +1.000 en todos los casos, es decir en aquellas poblaciones en que existe variación).

Los valores de  $F_{ST}$  nos indican que existe cierto grado de diferenciación entre las poblaciones. En este mismo sentido, podemos observar que los valores de Ji-cuadrado de contingencia obtenidos entre poblaciones, para cada uno de los locus, presentan valores estadísticamente significativos, lo que nos indicaría que las poblaciones se diferencian entre sí.

Por otra parte, el estadístico  $F_{IT}$  toma valores negativos solamente para el locus ADH-1, lo que indicaría que, en el total de individuos

de todas las poblaciones, existe un exceso de heterocigotos para dicho locus; el resto de los loci presentan valores positivos lo que indicaría que existe un ligero defecto de individuos heterocigotos.

Tabla 32: Valores de los estadísticos F de Wright y Ji-cuadrado de contingencia, para cada uno de los locus, en el total de poblaciones.

Locus	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$\chi^2$	$F_{IT}$
ADH-1	-.0409	.0491	192.304	-.0542
IDH	.0321	.0592	96.03	.0887
GOT-1	.0518	.0477	68.403	.1461
GOT-3	-.0811	.0300	38.370	.0075

#### 5.4.8 Diferenciación genética entre las poblaciones de M. comosum

Como ya se ha señalado en el apartado de métodos estadísticos, son dos los índices de distancia genética que hemos usado en la diferenciación de las poblaciones analizadas electroforéticamente. Uno es el índice de distancia genética no sesgada de Nei  $\hat{D}$  (1978), y otro el índice de distancia genética de Prevosti (1974).

En la tabla 33 se presentan, por encima de la diagonal, las distancias genéticas calculadas mediante el índice de distancia  $\hat{D}$  y, por debajo de la diagonal, se presentan los índices de similaridad I. El rango de variación para  $\hat{D}$  oscila entre .026 entre las poblaciones de VAL y POB y .000 entre las poblaciones de ROM y MOT, presentando en general distancias genéticas muy pequeñas entre poblaciones.

A partir de esta matriz de identidad genética se construyó

Tabla 33: Identidad genética I de Nei (1978) entre las poblaciones de *M. comosum* (por encima de la diagonal) y Distancia genética, no sesgada  $\hat{D}$  de Nei (1978) (por debajo de la diagonal). Ambos índices se calcularon solo con los datos génicos.

POPULATION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 Canales.Granad	1.000	0.997	0.994	0.995	1.000	0.997	0.991	0.999	0.996	1.000	0.996	0.998	0.995	0.980	0.991	0.992	0.995	0.991
2 Cozviyar.Granada	0.003	1.000	0.998	0.992	0.990	0.998	0.980	0.990	0.995	0.998	1.000	0.999	1.000	0.990	0.991	0.988	1.000	0.990
3 Motrilejo.Granad	0.006	0.002	1.000	0.998	0.986	1.000	0.984	0.988	1.000	0.997	0.999	1.000	0.998	0.988	0.989	0.988	1.000	1.000
4 Portugal A	0.005	0.008	0.002	1.000	0.992	1.000	0.986	0.987	1.000	0.997	0.993	0.996	0.992	0.976	0.976	0.982	0.995	0.997
5 Portugal B	0.000	0.010	0.012	0.008	1.000	0.994	0.974	0.999	0.991	0.998	0.993	0.993	0.980	0.977	0.974	0.985	0.988	0.987
6 Portugal C	0.003	0.002	0.000	0.000	0.006	0.000	0.986	0.990	1.000	0.999	0.998	0.999	0.997	0.983	0.983	0.984	1.000	1.000
7 Portugal D	0.009	0.020	0.016	0.014	0.006	0.014	0.008	0.999	0.987	0.987	0.990	0.989	0.975	0.979	0.975	0.981	0.975	0.983
8 Moya.G.Canar	0.001	0.010	0.011	0.013	0.001	0.010	0.001	1.000	0.995	0.994	0.996	0.994	0.990	0.985	0.983	0.999	0.985	0.985
9 S.Urs.Tenerife	0.004	0.006	0.000	0.000	0.009	0.000	0.015	0.011	0.000	0.998	0.996	0.999	0.995	0.982	0.982	0.986	0.998	0.999
10 Durance.France	0.006	0.002	0.000	0.003	0.002	0.001	0.012	0.006	0.002	0.000	0.998	1.000	0.998	0.982	0.980	0.981	0.999	0.995
11 Ragusa.Italy	0.004	0.000	0.001	0.007	0.007	0.002	0.010	0.004	0.004	0.002	0.000	1.000	0.998	0.996	0.996	0.997	0.999	0.997
12 Roma.Italy	0.002	0.001	0.000	0.004	0.007	0.001	0.011	0.006	0.001	0.000	0.000	0.000	1.000	0.994	0.994	0.997	1.000	0.998
13 Avignon.France	0.005	0.000	0.002	0.008	0.012	0.003	0.028	0.015	0.005	0.002	0.002	0.001	0.000	1.000	0.989	0.992	0.984	1.000
14 Lluvi.Mallorca	0.000	0.010	0.017	0.024	0.023	0.017	0.021	0.015	0.015	0.014	0.004	0.004	0.001	0.000	1.000	0.998	0.938	0.985
15 Valdem.Mallorca	0.000	0.009	0.011	0.024	0.026	0.017	0.026	0.017	0.017	0.015	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.990	0.992	0.936
16 MENORCA-1	0.000	0.012	0.011	0.018	0.011	0.014	0.008	0.004	0.014	0.011	0.003	0.003	0.000	0.007	0.010	0.000	0.933	0.984
17 MENORCA-2	0.000	0.009	0.000	0.009	0.012	0.000	0.028	0.015	0.002	0.001	0.001	0.000	0.000	0.012	0.006	0.014	0.000	0.999
18 GRECIA	0.000	0.004	0.000	0.003	0.013	0.000	0.017	0.015	0.001	0.005	0.003	0.001	0.000	0.014	0.015	0.014	0.001	0.000



un dendrograma usando el método UPGMA (Fig.69). Las medidas de bondad de ajuste de dicho árbol son:

- F (Farris, 1972) = .474
- F (Prager y Wilson, 1976) = .312
- Porcentaje de desviación estandar (Fitch y Margoliash,1967)= .444
- Correlación cofenética = .776

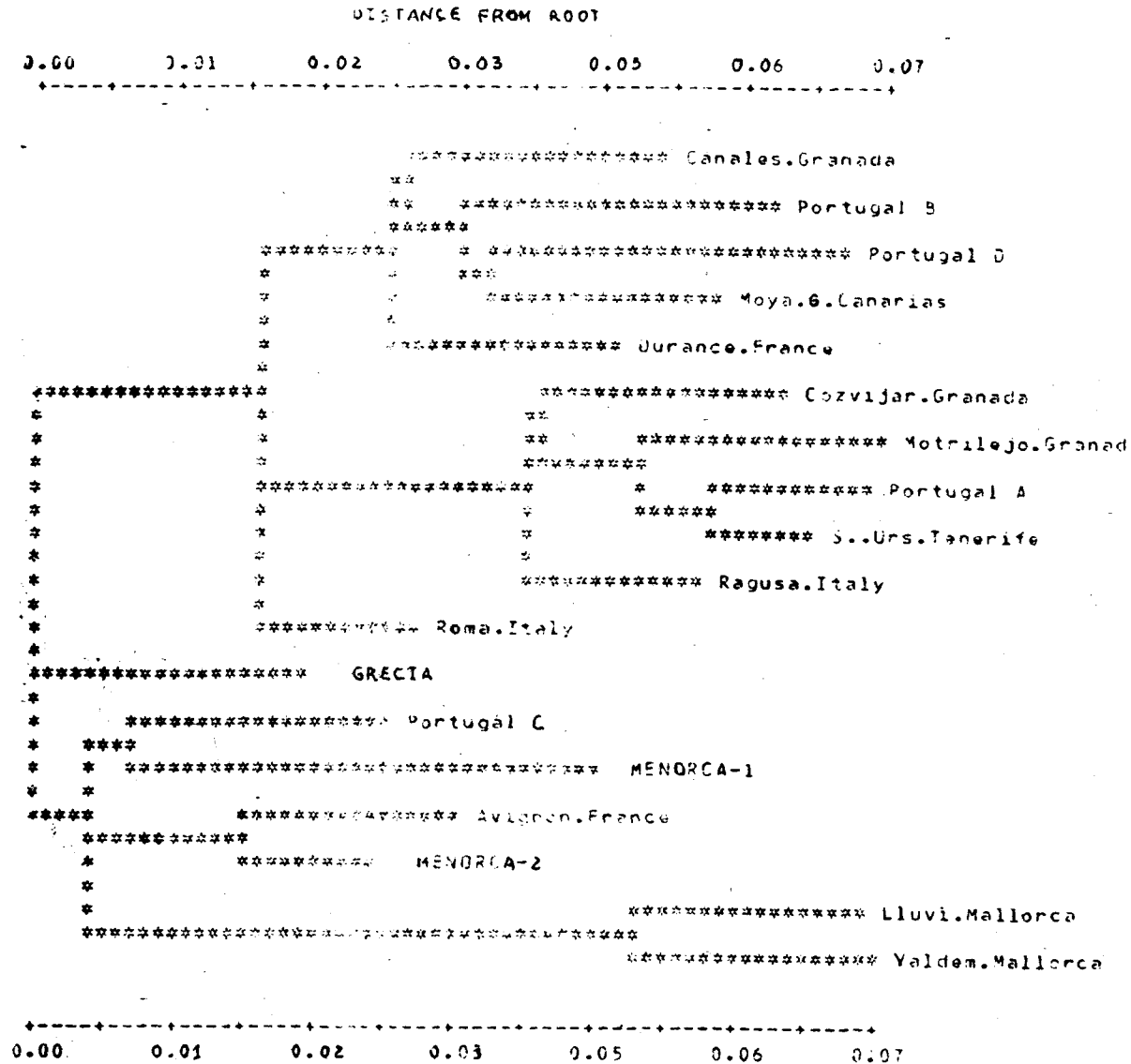
Mediante el índice de distancia genética de Prevosti se obtiene la matriz de distancia genética que se presenta en la tabla 34. Los valores extremos de esta matriz son .014,entre las poblaciones de SUR y POA,y .123,que es la distancia existente entre VAL y POD. También,a partir de los datos de esta matriz de distancia genética hemos construido el dendrograma que se presenta en la Fig. 70, usando asimismo el método UPGMA y optimizando para hacer mínima la F de Prager y Wilson. Los valores de bondad de ajuste de dicho árbol son:

- F (Farris ,1972) .882
- F (Prager y Wilson, 1976 ) = 9.083
- Porcentaje de desviación estandar (Fitch y Margoliash, 1967) = 12.348
- Correlación cofenética = .937
- Longitud del árbol .374

En los gráficos obtenidos por medio de ambos índices se puede observar que no existe relación entre la distancia geográfica y la distancia genética, sino que las agrupaciones que se obtienen en ambos dendrogramas se hacen sin seguir ningún patrón de diferenciación geográfica. Sin embargo,existe una excepción a esta norma que se puede observar en ambos dendrogramas; la constituyen las poblaciones de LLUV y VAL,ambas localizadas en la Isla de Mallorca,y que se separan del resto de las poblaciones.

POPULATION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1 Canales.Granada	0.000																		
2 Cozvijar.Granada	0.000	0.000																	
3 Motrilejo.Granada	0.000	0.000	0.000																
4 Portugal A	0.057	0.058	0.035	0.000															
5 Portugal B	0.049	0.078	0.081	0.076	0.000														
6 Portugal C	0.050	0.044	0.029	0.024	0.050	0.000													
7 Portugal D	0.072	0.080	0.083	0.073	0.062	0.068	0.000												
8 Hoya.G.Canarias	0.046	0.070	0.080	0.082	0.040	0.062	0.040	0.000											
9 S.Uns.Tenerife	0.056	0.057	0.025	0.014	0.075	0.024	0.077	0.081	0.000										
10 Durance.France	0.038	0.051	0.049	0.058	0.048	0.048	0.081	0.066	0.058	0.000									
11 Ragusa.Italy	0.064	0.080	0.044	0.056	0.062	0.037	0.067	0.052	0.056	0.054	0.000								
12 Roma.Italy	0.044	0.037	0.035	0.048	0.070	0.040	0.078	0.069	0.048	0.035	0.022	0.000							
13 Avignon.France	0.058	0.020	0.050	0.061	0.081	0.051	0.094	0.085	0.057	0.050	0.039	0.035	0.000						
14 Iluvi.Mallorca	0.100	0.079	0.071	0.102	0.106	0.094	0.116	0.099	0.089	0.086	0.058	0.066	0.070	0.000					
15 Valdem.Mallorca	0.110	0.079	0.076	0.106	0.111	0.090	0.123	0.105	0.092	0.092	0.056	0.071	0.073	0.027	0.000				
16 MENORCA-1	0.072	0.071	0.072	0.086	0.088	0.070	0.055	0.051	0.086	0.075	0.058	0.052	0.080	0.077	0.094	0.000			
17 MENORCA-2	0.071	0.071	0.045	0.055	0.084	0.037	0.092	0.082	0.050	0.062	0.038	0.044	0.019	0.081	0.075	0.087	0.000		
18 GRECIA	0.072	0.057	0.021	0.046	0.073	0.025	0.079	0.081	0.036	0.065	0.046	0.051	0.064	0.082	0.074	0.081	0.043	0.000	

Tabla 34: Distancia genética de Prevosti (1974) entre las distintas poblaciones analizadas, calculada con las frecuencias génicas solamente.



**Fig 70:** Representación gráfica de las distancias genéticas existentes entre las poblaciones de M. comosum. El dendrograma se ha construido a partir de la matriz de distancias genéticas de Prevosti (1974), obtenida con los datos cromosómicos y génicos conjuntamente.(Tabla 39).

Hemos comparado, al igual que hacíamos con el dendrograma correspondiente a los datos de frecuencias cromosómicas, los dendrogramas obtenidos mediante ambos índices, con los gráficos bidimensionales obtenidos cuando se somete la matriz de datos constituida por las frecuencias génicas en las distintas poblaciones a un análisis factorial.

Hemos utilizado, al igual que para las frecuencias cromosómicas, dos análisis factoriales, el de componentes principales y el de correspondencias, en el tratamiento de nuestros datos. Solamente exponemos el análisis factorial de correspondencias, ya que en ambos casos los resultados son muy parecidos entre sí.

En la tabla 35 se recogen los valores de los dos primeros factores junto con las distancias de los diferentes puntos al origen de coordenadas. Como se observa en dicha tabla, el factor I está determinado positivamente por los valores de las frecuencias del alelo a del locus GOT-1 (GAA); negativamente por las frecuencias del alelo a del locus IDH (IA) y por las frecuencias de los alelos d y c de la ADH-1 (AC y AD).

El factor II está determinado positivamente por la frecuencia del alelo a del locus GOT-1 (GAA), por la del alelo a de la IDH (IA) y por la del alelo d de la ADH-1 (AD). Negativamente el factor II está determinado por las frecuencias del alelo c de la ADH-1 (AC) y del alelo b del locus IDH (IB).

De esta forma, podemos observar en la Fig. 71 cómo las poblaciones quedan distribuidas en el plano bidimensional según las frecuencias que presentan para los distintos alelos. Concretamente, existe un primer agrupamiento en la parte superior derecha del gráfico formado por las poblaciones VAL y LLUV, que se diferencian claramente del resto de poblaciones principalmente debido a las frecuencias del

Tabla 35 : Factores de las observaciones y de las variables de la matriz constituida por las frecuencias de los diferentes electromorfos de M. comosum

<u>Observaciones</u>	<u>Distancia</u>	<u>Coordenadas</u>	
	<u>al origen</u>	<u>Factor 1</u>	<u>Factor 2</u>
GRE	0.0683	0.0188	-0.1808
RAG	0.0155	0.0704	0.0269
ROM	0.0265	0.0373	-0.0051
AVI	0.0433	0.1514	-0.0528
DUR	0.0444	-0.0210	0.0599
MEN-1	0.0911	-0.0922	0.1370
MEN-2	0.0553	0.1371	-0.1272
LLUV	0.1421	0.3049	0.1845
VAL	0.1639	0.3577	0.1340
BCA	0.0735	-0.1875	0.0281
COZ	0.0305	0.0843	-0.0522
MOT	0.0308	0.0238	-0.1542
POA	0.0828	-0.1449	-0.0051
POB	0.0920	-0.1380	0.1549
POC	0.0291	-0.0535	-0.1257
POD	0.1368	-0.2870	0.1276
MOY	0.0794	-0.1934	0.1697
SUR	0.0495	-0.0654	-0.1612

<u>Variables</u>	<u>Distancia</u>	<u>Coordenadas</u>	
	<u>al origen</u>	<u>Factor 1</u>	<u>Factor 2</u>
ADH-1 (AA)	0.3319	0.3639	0.0825
ADH-1 (AB)	0.2512	0.4267	-0.0103
ADH-1 (AC)	0.0662	-0.1196	-0.1952
ADH-1 (AD)	0.1179	-0.1560	0.2461
IDH (IA)	0.5628	-0.5020	0.3325
IDH (IB)	0.0074	0.0568	-0.0387
GOT-1 (GAA)	0.9151	0.6914	0.5478
GOT-1 (GAB)	0.0026	-0.0348	-0.0306
GOT-3 (GCA)	1.2140	-0.1630	-0.0318
GOT-3 (GCB)	0.0009	0.0058	-0.0010

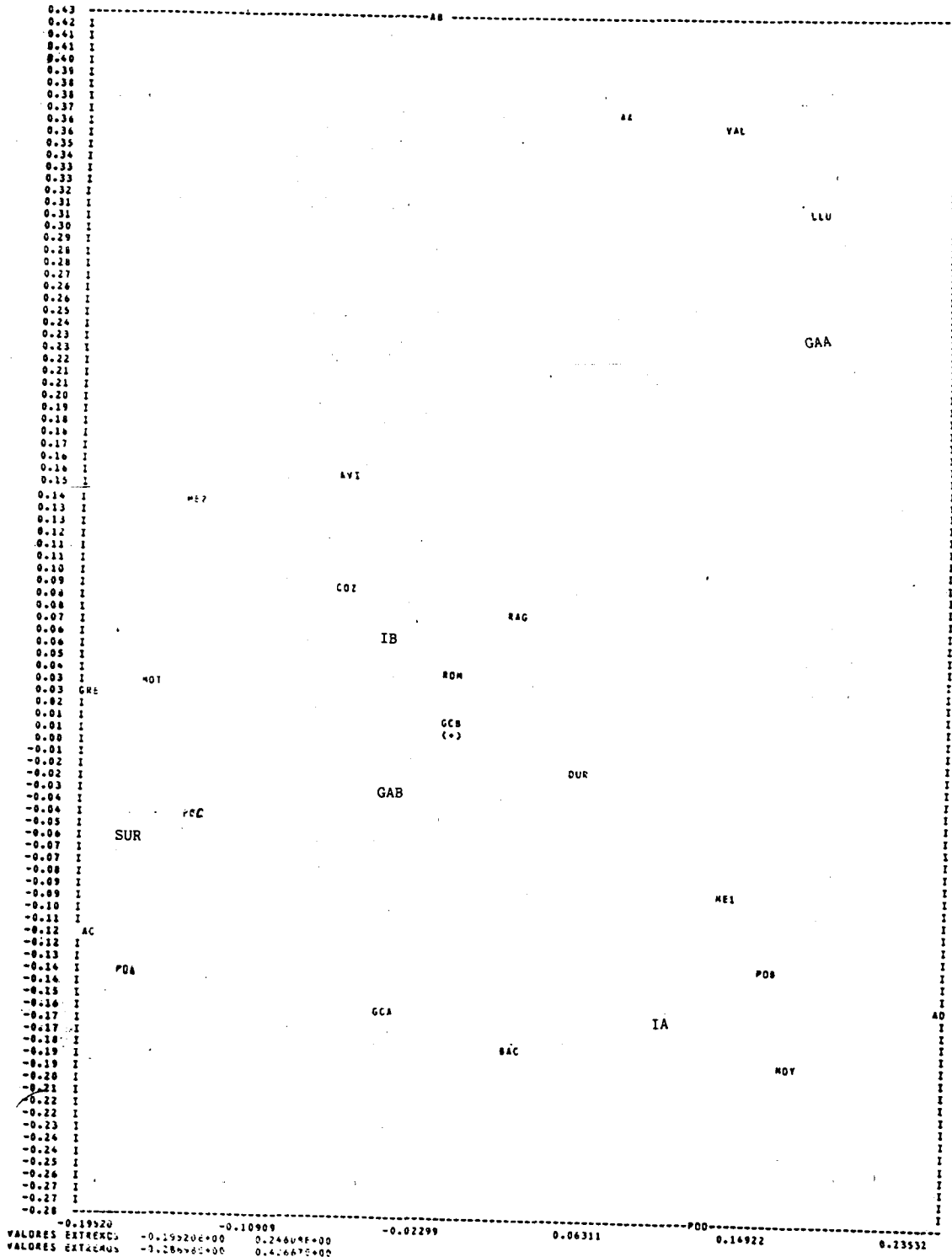


Fig. 71: Gráfico factorial obtenido mediante el análisis de correspondencia cuando se tienen en cuenta las frecuencias de los alelos de los loci GOT-1, GOT-3, ADH-1 e IDH.

los alelos a y b de la ADH-1 y del alelo a de la GOT-1. Un segundo agrupamiento, formado por las poblaciones MEN-1, POB, MOY y BAC, se diferencia debido a las frecuencias que dichas poblaciones presentan de los alelos a de la IDH y del alelo d de la ADH-1. Un tercer grupo de poblaciones, formado por las poblaciones de SUR, POC y POA, se diferencia claramente debido a la frecuencia del alelo c de la ADH-1.

#### 5.4.9 Variabilidad genética total (cromosómica y génica) en el conjunto de poblaciones

Finalmente, hemos intentado averiguar la cantidad de variabilidad genética total existente en las poblaciones de M. comosum analizadas y la diferenciación genética total existente entre ellas.

Para ello hemos analizado conjuntamente los datos cromosómicos y génicos, dándole a las dos ordenaciones cromosómicas (inversión y segmento) el tratamiento de dos loci génicos dialélicos. De esta forma, en la tabla 36 se presenta la heterocigocidad media observada en cada una de las poblaciones, así como la heterocigocidad media de todas las poblaciones. La heterocigocidad individual en cada población varía desde valores de .08 en la población de MOT hasta .32 en la población de LLUV. La heterocigocidad media observada en el conjunto de las poblaciones es de  $.18 \pm .05$ .

El número medio de alelos observados por locus (A) varía entre 1.6 en la población de GRE y POD hasta 2.00 en las poblaciones de COZ, AVI y LLUV con una media de  $1.87 \pm .03$ .

El porcentaje de loci polimorficos (P), según el criterio del .95, varía desde 12.5 en la población de MOT hasta 62.5 en POB y ROM, con una media en el conjunto de poblaciones de  $44.44 \pm 2.98$  y, según el

Tabla 36: Valores de Heterocigosidad genética observada (H), proporción de loci polimórficos (P) y número de alelos por locus (A), en cada una de las poblaciones analizadas. Estos valores se han calculado a partir de los datos cromosómicos y génicos conjuntamente.

<u>Población</u>	H	A	P(.95)	P(.99)
GRE	.21	1.6	25.00	50.00
RAG	.14	1.8	50.00	50.00
ROM	.23	1.9	62.50	62.50
AVI	.24	2.0	50.00	75.00
DUR	.23	2.0	62.50	75.00
MEN-1	.28	1.9	50.00	62.50
MEN-2	.20	1.8	37.50	50.00
LLUV	.33	2.0	50.00	75.00
VAL	.31	1.8	50.00	50.00
BCA	.23	1.9	50.00	62.50
COZ	.12	2.0	37.50	75.00
MOT	.08	1.8	12.50	50.00
POA	.11	1.8	37.50	50.00
POB	.27	1.9	50.00	62.50
POC	.19	1.9	50.00	62.50
POD	.22	1.6	37.50	62.50
MOY	.20	1.9	37.50	62.50
SUR	.12	1.9	37.50	62.50
Media	.21	1.87	44.44	61.11
ES	.02	.03	2.98	2.17



criterio del .99, varía desde el 50% hasta el 75% con una media de  $61.11 \pm 2.17$ .

A partir de la matriz de datos constituida por las frecuencias cromosómicas y génicas, de las 18 poblaciones en las que se han analizado simultáneamente dichos caracteres, hemos calculado la distancia genética mediante el índice de distancia de Prevosti (1974). En la tabla 37 se presenta la matriz de distancia genética obtenida. Los valores extremos obtenidos son los existentes entre las poblaciones de VAL y POA con .155, y de .028 entre las poblaciones de MEN-2 y AVI. La distancia genética media entre las 18 poblaciones analizadas es de .082 y una  $ES = .002$

A partir de la matriz de distancias genéticas obtenida, y mediante el método UPGMA, hemos obtenido el dendrograma que se presenta en la Fig. 72 que ha sido optimizado para hacer menor la F de Prager y Wilson (1976). Los valores de bondad de ajuste son:

- F (Farris, 1972) = 1.144
- F ((Prager y Wilson, 1976) = 9.172
- Porcentaje de desviación estandar (Fitch y Margoliash, 1967) = 12.682
- Correlación cofenética = .938
- Longitud del árbol = .485

En dicho dendrograma, y, al igual que ocurría cuando se analiza por separado la variabilidad cromosómica y la variabilidad génica, la ordenación de las poblaciones se realiza sin seguir ningún patrón geográfico, pero al igual que ocurría anteriormente, las poblaciones de Mallorca, (LLUV y VAL) se diferencian claramente del resto de las poblaciones.

Hemos realizado, asimismo un análisis factorial de correspondencias con la matriz de datos constituida por los datos cromosómicos y génicos de cada una de las poblaciones.

POPULATION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 Canales.Granada	0.000																	
2 Cozviyar.Granada	0.072	0.000																
3 Motrilejo.Granada	0.075	0.043	0.000															
4 Portugal A	0.070	0.044	0.034	0.000														
5 Portugal B	0.050	0.092	0.110	0.097	0.000													
6 Portugal C	0.083	0.101	0.098	0.087	0.074	0.000												
7 Portugal D	0.060	0.080	0.092	0.076	0.066	0.098	0.000											
8 Nova.G.Canarias	0.045	0.090	0.106	0.099	0.038	0.077	0.047	0.000										
9 S. Urs.Tenerife	0.068	0.052	0.037	0.021	0.087	0.076	0.078	0.097	0.000									
10 Durance.France	0.033	0.066	0.073	0.072	0.049	0.076	0.068	0.065	0.065	0.000								
11 Ragusa.Italy	0.071	0.030	0.045	0.046	0.083	0.092	0.068	0.074	0.048	0.065	0.000							
12 Roma.Italy	0.041	0.058	0.065	0.067	0.062	0.067	0.072	0.059	0.070	0.089	0.043	0.000						
13 Avignon.France	0.036	0.079	0.109	0.109	0.094	0.043	0.113	0.090	0.106	0.070	0.039	0.059	0.000					
14 Llovi.Mallorca	0.122	0.128	0.131	0.147	0.108	0.113	0.136	0.106	0.126	0.125	0.109	0.088	0.099	0.000				
15 Valdem.Mallorca	0.132	0.133	0.141	0.155	0.118	0.091	0.146	0.116	0.134	0.126	0.113	0.098	0.084	0.038	0.000			
16 MENORCA-1	0.093	0.114	0.124	0.126	0.102	0.059	0.086	0.066	0.129	0.081	0.101	0.070	0.062	0.106	0.100	0.000		
17 MENORCA-2	0.080	0.070	0.092	0.092	0.087	0.046	0.102	0.079	0.091	0.070	0.075	0.052	0.028	0.098	0.080	0.076	0.000	
18 GRECIA	0.075	0.039	0.071	0.032	0.070	0.040	0.085	0.069	0.071	0.071	0.073	0.054	0.066	0.090	0.084	0.080	0.046	0.000

Tabla 37: Distancia genética de Prevosti (1974) entre las distintas poblaciones analizadas cromosómica y génicamente, simultáneamente.



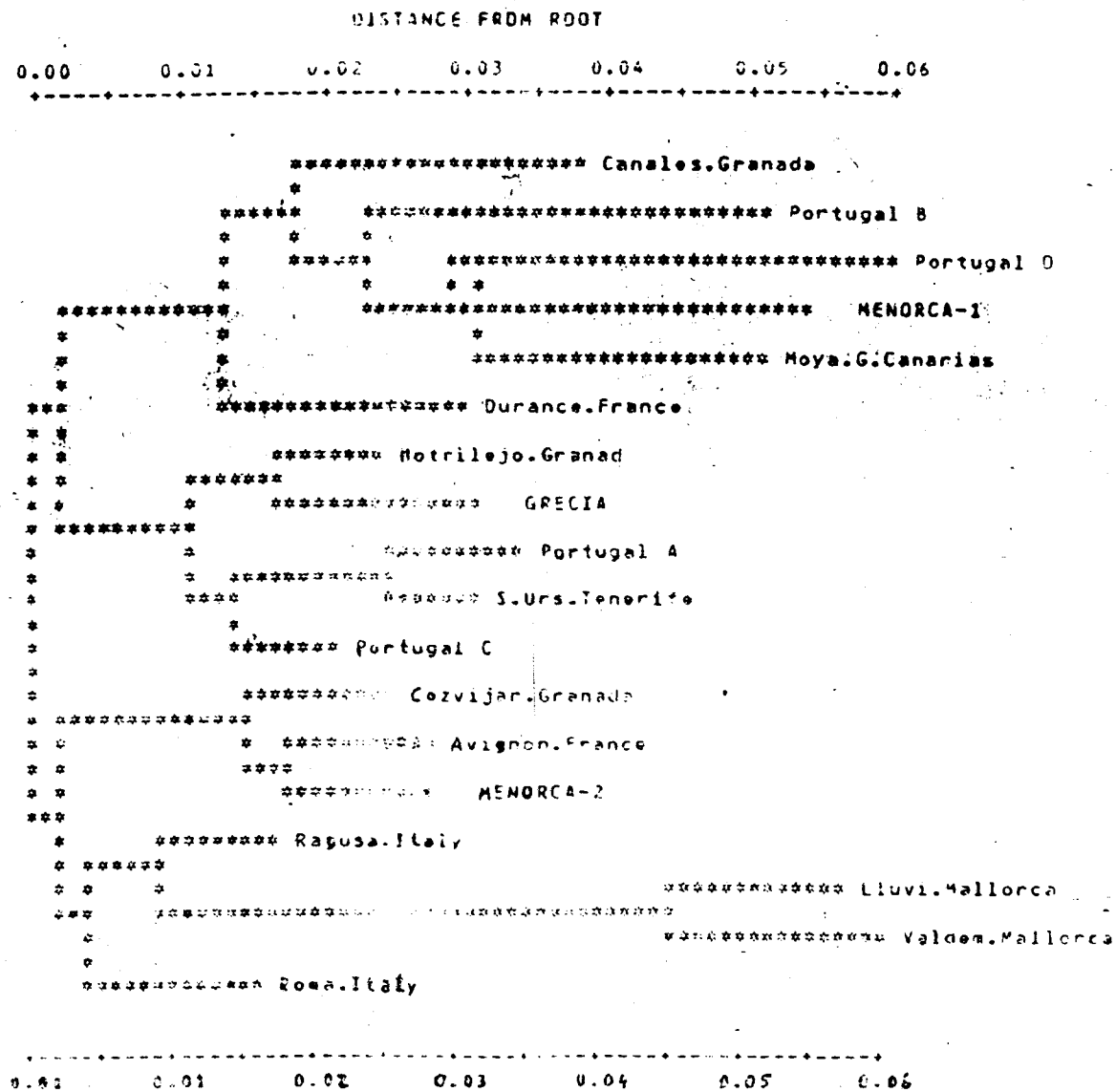


Fig. 72: Representación gráfica de las distancias genéticas existentes entre las poblaciones de *M. comosum*. El dendrograma se ha construido a partir de la matriz de distancias genéticas de Prevosti(1974) presentadas en la tabla 37

En la tabla 38 se recogen los valores de los dos primeros factores, junto con las distancias de los diferentes puntos al origen de coordenadas. Como se observa en dicha tabla, el Factor I está determinado positivamente por las frecuencias del alelo a del locus GOT-1 (GAA), por la frecuencia del segmento y la de los alelos a y b de la ADH-1 (AA y BB). Negativamente, está determinado por las frecuencias del alelo a del locus IDH (IA), del alelo a del locus GOT-3 (GCA) y de la ordenación cromosómica estándar.

El Factor II está determinado positivamente por las frecuencias del alelo a del locus GOT-1, (GAA) del alelo a de la ADH-1 (AA) y, principalmente, por la frecuencia del segmento. Negativamente este factor está determinado por las frecuencias del alelo a de la IDH (IA) y de la inversión.

En la Fig. 73, donde se presenta el gráfico bidimensional obtenido podemos observar como las poblaciones LLUV y VAL quedan situadas en la parte superior del gráfico, diferenciándose claramente del resto de las poblaciones debido a las altas frecuencias del segmento que dichas poblaciones presentan, así como las frecuencias de los alelos a y b del locus ADH-1 y del alelo a del locus GOT-1.

Un segundo grupo de poblaciones (RAG, MOT, POA, COZ y SUR) se forma en torno a las frecuencias de la ordenación cromosómica estándar. Otro grupo de poblaciones (BAC y POD) se diferencia del resto de las poblaciones, gracias a las frecuencias de los alelos c de la ADH-1 y del alelo b de la GOT-3.

El factor II diferencia un cuarto grupo de poblaciones formado por las poblaciones de AVI, POC y MEN-1, gracias a la frecuencia de la inversión pero, en general, y, excepto las poblaciones de VAL y LLUV el resto de poblaciones se diferencian poco por los componentes de este factor.

Tabla 38: Factores de las observaciones y de las variables de la matriz constituida por las frecuencias de las diferentes ordenaciones cromosómicas y electromorfos de M. comosum

<u>Observaciones</u>	<u>Distancia al origen</u>	<u>Coordenadas</u>	
		<u>Factor 1</u>	<u>Factor 2</u>
GRE	0.0561	0.0297	-0.0668
RAG	0.0496	-0.1158	0.1216
ROM	0.0244	-0.0281	-0.0185
AVI	0.0807	0.1662	-0.1309
DUR	0.0317	-0.0259	0.0231
MEN-1	0.1166	0.0735	-0.2520
MEN-2	0.0646	0.0766	-0.0881
LLUV	0.2509	0.4301	0.2065
VAL	0.2065	0.4047	0.1836
BCA	0.0513	-0.1193	-0.0821
COZ	0.0678	-0.1433	0.1349
MOT	0.0964	-0.2233	0.1890
POA	0.1046	-0.0281	-0.0185
POB	0.0650	0.0109	-0.0635
POC	0.0699	0.1048	-0.1685
POD	0.0999	-0.1685	-0.0875
MOY	0.0561	-0.0446	-0.1477
SUR	0.0662	-0.1539	0.1518

<u>Variables</u>	<u>Distancia al origen</u>	<u>Coordenadas</u>	
		<u>Factor 1</u>	<u>Factor 2</u>
ADH-1 (AA)	0.3369	0.2797	0.2847
ADH-1 (AB)	0.2519	0.2929	0.0959
ADH-1 (AC)	0.0656	-0.1623	-0.0198
ADH-1 (AD)	0.1179	0.0013	-0.0934
IDH (IA)	0.5637	-0.2413	-0.3774
IDH (IB)	0.0075	0.0287	0.0434
GOT-1 (GAA)	0.9211	0.7614	0.3397
GOT-1 (GAB)	0.0024	-0.0377	-0.0160
GOT-3 (GCA)	1.2108	-0.2246	-0.0433
GOT-3 (GCB)	0.0009	0.0081	0.0029
Ord. estandar	0.0737	-0.2154	0.1717
Ord. invertida	0.2843	0.3812	-0.3615
Ord. con segmento	2.4077	1.2463	0.6626
Ord. sin segmento	0.0036	-0.0476	-0.0246

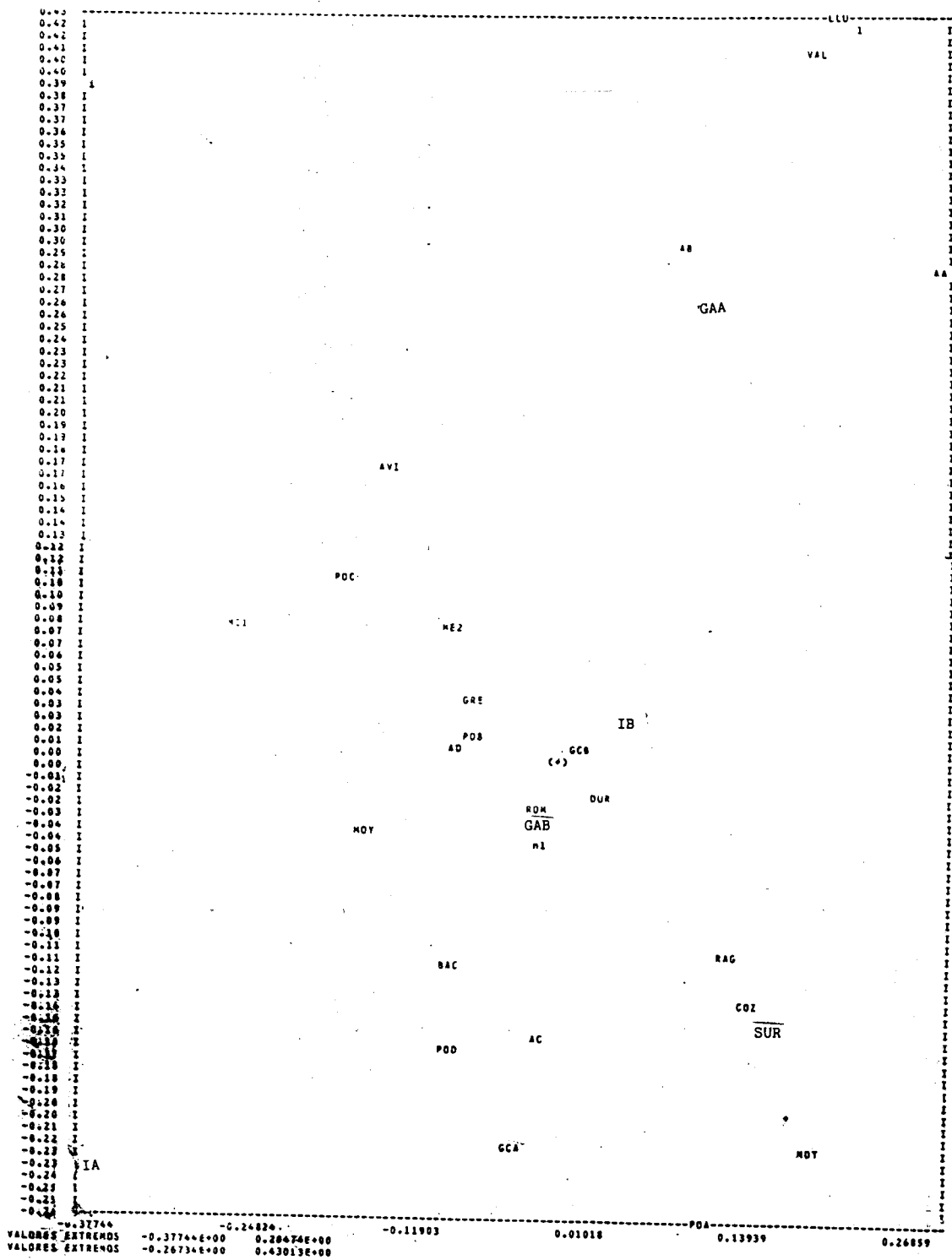


Fig. 73: Gráfico factorial obtenido mediante el análisis de correspondencias, cuando se tienen en cuenta las frecuencias cromosómicas y génicas (loci GOT-1, GOT-3; ADH-1 e IDH) obtenidas en las 18 poblaciones en las que se han realizado ambos análisis.

### 5. 5 Asociación entre aloenzimas y ordenaciones cromosómicas

Para aclarar este aspecto hemos efectuado un análisis citogenético y electroforético simultáneo de la gran mayoría de los individuos de las poblaciones que se recogen en la tabla 2.

Esto nos ha permitido conocer para cada individuo su constitución cromosómica para la segunda pareja y su genotipo para los cuatro sistemas enzimáticos analizados, que comprenden seis loci distintos. Hemos analizado la posible asociación existente entre cada uno de estos loci y las distintas ordenaciones cromosómicas y, solamente, hemos encontrado que existe asociación entre la ordenación estandar (tipos cromosómicos +, +1) y la ordenación invertida (tipos cromosómicos i, il) con dos electromorfos distintos del isoenzima ADH-1. Asimismo, hemos comprobado que hay asociación entre los citotipos heterocigotos con segmento y un electromorfo de la GOT-1.

#### 5.5.1 Asociación entre los distintos tipos cromosómicos y el locus ADH-1

En la tabla 39 se presentan las frecuencias absolutas que presentan los distintos genotipos de la ADH-1 en los individuos homocigotos para dos cromosomas sin inversión (genotipos +/+, y +/+1) y los homocigotos para cromosomas con inversión (genotipos i/i e i/il).

Tabla 39: Distribución de los distintos genotipos de la ADH-1 en los citotipos homocigotos para cromosomas sin inversión (+/+ , +/+1) y homocigotos para cromosomas con inversión (i/i, i/il)

<u>Citotipos</u>	<u>Genotipos ADH-1</u>										
	aa	ab	ac	ad	bb	bc	bd	cc	cd	dd	Total
+/+, +/+1	5	9	17	9	10	46	38	64	102	42	341
i/i, i/il	0	3	5	0	4	13	3	15	13	4	60
Total	5	12	22	9	14	59	41	79	115	46	401

A partir de los datos recogidos en dicha tabla hemos calculado las frecuencias absolutas que presentan los distintos alelos de la ADH-1 en los tipos cromosómicos sin inversión y con inversión

Tabla 40 : Frecuencias alélicas absolutas de la ADH-1 en los cromosomas con inversión y sin inversión

Ordenación	alelos				Total
	a	b	c	d	
Ord. estandar	45	113	291	233	682
Ord. invertida	8	27	61	24	120
Total	53	140	352	257	802

Hemos realizado un Ji-cuadrado de contingencia para ver si la distribución se realiza al azar, encontrando un valor de  $\chi^2 = 9.99$ , cuya probabilidad está comprendida entre  $.05 > p > .02$ . Este valor de Ji-cuadrado se debe principalmente al exceso de alelos d que presentan los tipos cromosómicos sin inversión, y al exceso de alelos c que presentan los tipos cromosómicos con inversión; es decir el alelo d está asociado a la ordenación que llamamos estándar y el alelo c está asociado a la ordenación que denominamos invertida

Hay que resaltar que estas dos asociaciones observadas en el conjunto de todas las poblaciones, se producen en cada una de las poblaciones analizadas y, en todas ellas, se producen en el mismo sentido, como se puede ver en la tabla 41 donde se recogen los valores de Ji-cuadrado poblacionales, alcanzando en alguna de ellas valores estadísticamente significativos.



Tabla 41: Valores de  $\chi^2$  de contingencia poblacionales, calculados para comprobar si existe asociación entre las reordenaciones cromosómicas (inversión) y los alelos c y d del locus ADH-1 en toda el área geográfica.

<u>Población</u>	<u><math>\chi^2</math></u>
GRE	2.29
RAG	-
ROM	1.10
AVI	2.27
DUR	-
MEN-1	.73
MEN-2	.66
LLUV	5.67
VAL	-
BCA	-
COZ	-
MOT	-
POA	-
POB	5.62
POC	6.20
POD	-
MOY	11.85 **
SUR	-

### 5.5.2 Asociación entre los citotipos con segmento y el locus GOT-1

En la tabla 42 se presentan las frecuencias absolutas de los tres genotipos de la GOT-1 en los individuos homocigóticos para cromosomas sin segmento (+/+, +/i e i/i) y los citotipos heterocigóticos para la presencia del segmento (+/+1, +/i1 e i/i1).

Tabla 42 : Distribución de los genotipos de la GOT-1 en los citotipos con segmento y sin segmento

<u>Citotipos</u>	<u>Genotipos</u>			Total
	a/a	a/b	b/b	
Sin segmento	-	28	270	298
Con segmento	5	6	31	42
Total	5	34	301	340

En la tabla 43 se presentan las frecuencias absolutas obtenidas para ambos alelos, en los citotipos sin segmento y en los citotipos con segmento.

Tabla 43 : Frecuencias alélicas absolutas de la GOT-1 en los citotipos cromosómicos con segmento o sin segmento

<u>Citotipos</u>	<u>alelos</u>		Total
	a	b	
Sin segmento	28	568	596
Con segmento	16	68	84
Total	44	636	680

El valor de la Ji-cuadrado experimental obtenida es de  $\chi^2 = 25.01$  cuya probabilidad es de  $p \gg \gg .001$ . Por lo tanto, se puede afirmar que existe una fuerte asociación entre los genotipos con segmento (en heterocigosis) y el alelo a del isoenzima GOT-1.

Esta asociación detectada entre el alelo a del locus GOT-1 y los tipos cromosómicos con segmento, se puede detectar también por medio del análisis de componentes principales realizado con los datos cromosómicos y génicos conjuntamente. En la matriz de relación entre las distintas variables obtenido por medio de dicho análisis, son el segmento y el alelo a de la GOT-1 los que presentan un valor más alto (véase tabla 44 ).



Tabla 45 : Estimaciones de la diferenciación entre poblaciones de especies vegetales, calculadas con el índice de fijación  $F_{ST}$  de Wright.

<u>Especie</u>	<u>nº de loci</u>	<u>nº de Pobl.</u>	<u><math>F_{ST}</math></u>	<u>Referencia</u>
Phlox drummondii	20	73	0.20	Levin, 1978
P. cuspidata	5	43	0.41	" "
P. roemariana	4	15	0.21	" "
Sarracenia purpurea	4-5	11	0.23	Schwaegerle y Schaal, 1979
Desmodium nudiflorum	5	2	0.17	Schaal y Smith 1980
Pinus rigida	21	11	0.02	Guries y Ledig 1982
P. contorta	21	5	0.018	Dancik y Yeh 1983
P. banksiana	21	3	0.024	" " "

Tabla 46 : Heterocigosidad media en distintas especies

<u>Especie</u>	<u>Nº P</u>	<u>Nº L</u>	H	<u>Referencia</u>
<u>Angiospermas</u>				
Hymenoppapus scabiosaeus	14	7	.20	Babbel y Selander, 1974
H. artemisiaefolius	12	7	.21	" "
Lupinus texensis	10	8	.35	" "
L. subcarnosus	8	8	.046	" "
Clarkia biloba	3	11	.15	Gottlieb, 1974
C. rubicunda	?	11	.11	"
C. dudleyana	1	8	.16	"
Phlox drumondii	73	20	.052	Levin, 1978
P. roemariana	15	20	.046	"
			H=.1507	
<u>Gimnospermas</u>				
Pinus contorta	9	25	.16	Yeh y Layton, 1979
Picea sitchensis	10	24	.15	Yeh y El-Kassaby, 1979
Pseudotsuga menziesii	11	21	.15	Yeh y O'Malley, 1980
Pinus rigida	11	21	.138	Guries y Ledig, 1982
P. contorta	5	21	.18	Dancik y Yeh, 1983
P. banksiana	3	21	.115	" "
			H=.1575	
<u>Autógamas</u>				
Oenothera strigosa	29	20	.028	Levy y Levin, 1975
O. parviflora	29	20	.148	" "
O. hookeri	14	20	.000	" "
O. argillicosala	10	20	.080	" "
Phlox cuspidata	43	20	.008	Levin, 1978
Plantago major	--	36	.050	Van Dijk y Van Delden, 1981
			H=.056	
<u>Insectos</u> (excepto Drosophila )			.0743	Nevo, 1978
<u>Drosophila</u>			.157	"
<u>Vertebrados</u>			.049	

Nº P = número de poblaciones Nº L = número de loci H= heterocigosidad

DISCUSION

## 6 Discusión

### 6.1 Naturaleza de las anomalías cromosómicas en M. comosum

Como hemos señalado en resultados (véase apartado 5.2.2, Fig. 19 y apartado 5.3, Figs. 41, 42, 43 y 44), durante el proceso meiótico de M. comosum hemos observado una alta frecuencia de puentes anafásicos, tanto en la primera pareja del cariotipo, como en otras dos parejas más (segunda y una de las pequeñas). La formación de puentes se produce en ambas divisiones anafásicas. Los puentes cromosómicos observados durante la anafase-I se pueden dividir en dos tipos: puentes que se producen sin formación de fragmento (Fig. 44), y puentes con formación de fragmento (Figs. 41, 42 y 43).

Por el contrario, en ninguno de los puentes observados en anafase-II hemos detectado la formación de fragmentos cromosómicos.

Los puentes sin fragmento, pensamos que se pueden deber, en principio, o bien a un retraso en la segregación anafásica del bivalente afectado, o en el caso de la primera pareja, debido a dificultades espaciales, por su gran tamaño.

La presencia simultánea de puentes y fragmentos, en las divisiones meióticas, ha sido ampliamente reseñada, tanto en especies animales (Lewis y John, 1966; Nur, 1968; Gosálvez et al, 1981) como en plantas (Matsuura, 1950; Couzin y Fox, 1973; Viinikka, 1977; Karp y Jones, 1983).

La primera de las hipótesis emitida para explicar tal fenómeno fué aportada por McClintock (1931, 1933). Según esta hipótesis dichos puentes y fragmentos se originarían por la formación de un quiasma en el bucle de inversión producido en un individuo heterocigótico para una inversión paracéntrica. Para que este mecanismo pudiera ser el origen más



probable de los puentes con fragmento observados en M. comosum, habrían de concurrir ciertas condiciones especiales que no han sido observadas en ninguna ocasión. Estas condiciones son:

a) Que se produzca un bucle de inversión en la primera fase de la meiosis, en las parejas en que se produce la formación de puentes con fragmento. En ninguno de los individuos analizados hemos podido detectar la formación de dicho bucle.

b) Que el fragmento resultante como consecuencia de la existencia de una inversión paracéntrica, sea de tamaño constante. Como se puede ver en las Figs. 41, 42 y 43, los fragmentos producidos, en los diversos puentes observados para la primera, son de tamaño variable en células del mismo individuo. Si dichos puentes con fragmentos de distinto tamaño estuvieran producidos por inversiones paracéntricas, habría que pensar en la existencia de un conjunto de inversiones, lo que no hemos observado.

En los puentes que se producen en la segunda pareja nunca hemos observado la presencia de fragmentos. Los puentes con fragmento observados en una de la parejas de menor tamaño (Fig. 56) se producen con una frecuencia muy baja, por lo que no hemos podido observar si se producen fragmentos de distinto tamaño.

c) Que los puentes no se observen en la segunda división meiótica. Los puentes observados en M. comosum, sobre todo los producidos en la primera pareja, incluso se producen en anafase-II (Fig. 47).

d) Que los puentes y fragmentos solamente ocurran en los cromosomas en que exista la inversión. En el caso de M. comosum habría que pensar, de acuerdo con este punto, en la existencia de varias inversiones que afectarían a distintos cromosomas.

Una segunda teoría alternativa a la anterior fué emitida por Lewis y John, (1966). Según esta teoría la formación de puentes con fragmentos en ambas divisiones se debería, probablemente, a errores en la formación

de quiasmas. Este tipo de sucesos fueron denominados por Jones (1968) como intercambios de tipo-U.

Los intercambios de tipo-U han sido ampliamente discutidos como productores de la formación de puentes, con o sin fragmento, tanto en especies de organismos vegetales (Haga, 1953; Start, 1970; Couzin y Fox, 1973; Bradham, 1969; Jones, 1966, 1969) como en organismos animales (Lewis y John, 1966; Gosálvez et al. 1981).

Los intercambios de tipo-U pueden afectar a cromátidas hermanas y no hermanas. La formación de intercambios erróneos entre cromátidas hermanas produce la formación de puentes en anafase-II, y en anafase-I el cromosoma afectado se vería sinapsado en el punto donde se ha producido el intercambio erróneo. Los intercambios erróneos entre cromátidas no hermanas dan lugar a la formación de puentes en anafase-I.

Dicho tipo de intercambios tienen una serie de características como son: a) se producen en líneas autofecundantes de plantas en las que la heterocigosis para inversiones paracéntricas estaría reducida (Rees y Thomson, 1955). b) Se ha encontrado un paralelismo entre la distribución de quiasmas y la distribución en el tamaño del fragmento (Jones, 1968; 1969; Karp y Jones, 1983). c) El tamaño del fragmento es muy variable (Bradham, 1969a; Couzin y Fox, 1973; Karp y Jones, 1983).

La relación entre la formación de puentes con fragmento y la formación de quiasmas ha sido ampliamente demostrada. Así, Giráldez y Lacadena (1978) estudiando cuatro líneas autofecundantes de centeno, encuentran que existe una relación positiva entre el grado de desinapsis, y el descenso en la formación de quiasmas en metafase-I respecto a diplo-tene, con la alta frecuencia de puentes en anafase-I en dichas líneas, llegando a la conclusión de que los intercambios de tipo-U son debidos a quiasmas erróneos.

Los resultados obtenidos en M.comosum nos inclinan a pensar que los puentes con fragmentos producidos en anafase-I son de-

bidos a intercambios de tipo-U. Existen cinco observaciones que apoyan dicha hipótesis:

a) El tamaño de los fragmentos de la primera pareja es variable en un mismo individuo (véanse Figs. 41, 42 y 43), cosa que no ocurriría si existiese una sola inversión paracéntrica. Para explicar el tamaño variable de los fragmentos producidos, como ya hemos señalado, deberíamos postular la existencia de una serie de inversiones, algo no detectado y difícil de producir.

b) La formación de univalentes precoces por parte de la primera pareja (Figs. 37 y 38), nos indicaría la existencia de fallos en el proceso de sinapsis y/o en la formación de quiasmas. Ambos fenómenos están relacionados con la producción de quiasmas erróneos y puentes en anafase-I (Giráldez y Lacadena 1978).

c) Los fragmentos producidos en anafase-I pueden permanecer hasta la segunda división, ya que pueden formar micronucleos, que al condensarse en sincronía con los cromosomas del núcleo principal llegan hasta metafase-II (Fig. 54). Esta persistencia de los fragmentos hasta la segunda división meiótica, ha sido utilizada por algunos autores como prueba de la existencia de intercambios de tipo-U (Couzin y Fox, 1973; Viinikka, 1977).

d) La observación frecuente de puentes anafásicos en anafase-II, que vendrían producidos como consecuencia de la formación de intercambios erróneos entre cromátidas hermanas (Fig. 55b). Dichos intercambios es posible observarlos en anafase-I (Fig. 55a).

e) Los puentes no solamente han sido observados en la primera pareja del cariotipo, sino que, aunque en muy baja frecuencia, también han sido observados en la segunda pareja del caritotipo (Fig. 19) y en una de las parejas pequeñas de menor tamaño, en este caso con for-

mación de fragmento (Fig. 56). Esto nos indicaría que los fallos en la sinapsis, también se producirían en otros bivalentes del complemento de M. comosum y que dichos fallos podrían estar provocados por una serie de causas que pueden variar desde genéticas hasta ambientales.

Así, si los puentes que ocurren en M. comosum se deben a intercambios de tipo-U, podría existir una tercera hipótesis para explicar la formación de puentes sin fragmento por la primera pareja. Dichos puentes se podrían deber a intercambios erróneos, que se producen en una posición terminal, por lo que sería difícil de observar el fragmento producido.

La frecuencia con que puede ocurrir tales fenómenos en M. comosum tiene un amplio rango de variación, habiendo individuos en los que no se ha observado la formación de puentes, e individuos que presentan una alta frecuencia (el máximo observado ha sido el 11.60% del total de anafases-I analizadas, véase (tabla 22)). En otros organismos, la frecuencia de formación de puentes, con o sin fragmento, es, asimismo, bastante variable (Viinikka, 1977; Karp y Jones, 1983).

Hay que señalar que no se ha observado que exista ningún tipo de influencia de las distintas reordenaciones sobre la producción de los intercambios de tipo-U, puesto que dicho fenómeno ocurre en individuos que presentan cualquier citotipo para la segunda pareja del cariotipo.

#### Localización de las zonas de formación de los intercambios de tipo-U

Las zonas donde ocurren los intercambios erróneos puede ser localizadas por el tamaño del fragmento producido. La correlación entre la distribución de quiasmas y la distribución de los intercambios de tipo-U ha sido demostrada en diversos organismos (Jones, 1968, 1969; Karp y Jones, 1983).

En la primera pareja de M. comosum existe cierta relación entre la posición de formación de quiasmas y los tamaños de los fragmentos producidos, pudiéndose relacionar el tamaño de éstos, con las posiciones en que ocurren los quiasmas (Fig.57). Pero, sin embargo, no parece existir una correlación exacta entre las frecuencias de formación de cada quiasma, con las frecuencias de aparición de cada tipo de fragmento en particular (Tabla 22). Esta misma situación ha sido observada en diversas líneas de Lolium perenne por Karp y Jones (1983), señalando estos autores que "aunque las posiciones de formación de quiasmas e intercambios de tipo-U coinciden, no es precisa una correlación de sus frecuencias, ni es necesario que haya ningún tipo de relación entre la incidencia de puentes con fragmento y el patrón de distribución de quiasmas".

En el caso concreto de M. comosum el fragmento que presenta una frecuencia mayor de la esperada es el de tamaño intermedio (véase tabla 22) correspondiente a quiasmas erróneos ocurridos en la zona intersticial del brazo largo de la primera pareja (véase Fig.42). Precisamente en dicha zona existen tres o cuatro bandas heterocromáticas intersticiales (Fig. 20). Como se ha señalado en casos anteriores (Viininka,1977) las zonas que presentan bandas heterocromáticas pueden ser muy propensas a intercambios de tipo-U.

En conclusión, la existencia de puentes y fragmentos cromosómicos en la primera pareja de M. comosum sobre todo podría explicarse como consecuencia de quiasmas erróneos en varias posiciones del cromosoma. Así, los fragmentos de tamaño pequeño se producirían como consecuencia de intercambios de tipo-U en la región distal del cromosoma. Los fragmentos de tamaño mediano se producirían a partir de quiasmas erróneos en la zona intersticial, y los fragmentos de tamaño grande se producirían por intercambios de tipo-U cercanos al centrómero. Asimismo,

existen intercambios de tipo-U entre cromátidas hermanas de la primera pareja que originarían puentes cromosómicos en la anafase-II. Por último, los puentes sin fragmento que aparecen en algunas divisiones de la primera pareja, y en otra pareja del cariotipo, pueden ser debidos a retrasos en la segregación anafásica, a dificultades espaciales de los cromosomas (sobre todo en la primera pareja) y, en algunos casos, a intercambios de tipo-U en posiciones terminales, que no originan fragmentos o los originan muy pequeños.

#### Origen y significado evolutivo de los intercambios de tipo-U

El mecanismo exacto de los intercambios de tipo-U permanece aún sin resolver. Este fenómeno ha sido observado en gran cantidad de híbridos y líneas puras; en estos casos se podrían explicar como debidos a la existencia de una mutación genética, que pudiera afectar a la formación de quiasmas, o por la acumulación de combinaciones homocigóticas de poligenes deletéreos. Tales fenómenos y causas se han utilizado como posibles orígenes de los intercambios de tipo-U en especies como el centeno (Rees y Thompson, 1955; Giráldez y Lacadena, 1977) y en el rábano (Dayal, 1979).

El caso de M. comosum se puede añadir a la gran cantidad de especies vegetales muestreadas en poblaciones naturales que presentan intercambios de tipo-U como son Paeonia californica (Walters, 1956); Claytonia virginica (Star, 1975); Najas marina (Viininka et al. 1977) (Viininka, 1977) Tulipa hageri (Couzin y Fox, 1973), entre otras.

Es significativo que muchas de estas especies que presentan intercambios de tipo-U, incluido M. comosum, sean especies perennes y con reproducción vegetativa.

Con respecto a los intercambios de tipo-U que tienen lugar en M.comosum, sobre todo en la primera pareja, es posible que su origen resida en la interacción entre causas (o predisposiciones) genéticas y ambientales. Así, si ciertas condiciones ambientales (como temperatura, nutrición etc.), interaccionando con el fondo genético de la especie, determinan cambios en los procesos de la formación de quiasmas, dichos fenómenos ocasionarían la formación de quiasmas erróneos. Tales quiasmas erróneos serían más frecuentes en determinados cromosomas (en este caso la primera pareja), y en ciertas zonas cromosómicas (las zonas con bandas heterocromáticas), por ser más propensa a verse afectada la formación de quiasmas en ellas.

Con respecto a dicho origen, hay que mencionar que estos fenómenos de intercambio de tipo-U suceden en poblaciones que están bastante alejadas geográficamente entre sí, como son las estudiadas por Bentzer (1972) en varias islas griegas y las analizadas por nosotros en la Península Ibérica. Estas anomalías han sido detectadas por nosotros en otras poblaciones de la Península Ibérica e Italia, aunque estos resultados no se incluyen en este trabajo.

Con respecto a los posibles consecuencias de la aparición de intercambios de tipo-U mencionados, de acuerdo con otros autores (Bentzer, 1973; Bradham, 1978), habría que decir que tales fenómenos pueden constituir el origen de de duplicaciones génicas.

## 6.2 Naturaleza de la variabilidad cromosómica de *M. comosum*

Tras el análisis citogenético efectuado en 884 individuos pertenecientes a 23 poblaciones naturales de *M. comosum* (Tabla 2) hemos llegado a la conclusión de que esta especie presenta dos tipos de mecanismos de variación cromosómica. El primer tipo está constituido por varios fenómenos citogenéticos (cromosomas accesorios, aneuploidía, poliploidía) que determinan el cambio del número cromosómico básico de la especie ( $2n=18$ ), en los individuos que los portan. El segundo tipo de mecanismos está constituido por los polimorfismos estructurales que presenta la segunda pareja del cariotipo en todas las poblaciones analizadas.

### 6.2.1 Fenómenos que cambian el número cromosómico básico de *M. comosum*

Refiriéndonos al primer tipo de mecanismos, hay que mencionar que hemos detectado la existencia de cromosomas accesorios, de naturaleza heterocromática, en dos individuos, uno en la población de Silleta (SILL) y el otro en la población de Gargalioni (GRE). En el primer individuo mencionado, el cromosoma accesorio es de mayor tamaño que en el segundo (Figs. 4 y 5). En ambos individuos el cromosoma accesorio es mucho más pequeño que el resto de los cromosomas de la dotación normal.

La presencia de cromosomas accesorios ha sido ampliamente reseñada tanto en animales como en plantas (Jones y Rees, 1982), siendo sus efectos variados, y a veces contradictorios, según el organismo de que se trate. En nuestro caso, no hemos podido profundizar en el análisis del comportamiento de los cromosomas accesorios de *M. comosum*, por la baja frecuencia con que se presentan (dos individuos en 884 = .23%).

En relación, asimismo, con los mecanismos de variabilidad cromosómi-



ca presentes en M. comosum, que contribuyen a cambiar el número cromosómico, hemos detectado en la población Portugal A (POA) la presencia de un individuo trisómico para la primera pareja ( $2n=19$ , Fig. 3). Los individuos aneuploides se originan por la unión de gametos con números cromosómicos anormales. En el caso del individuo que nos ocupa, se debe haber formado como consecuencia de que uno de los gametos que lo originaron tenía dos dosis de la primera pareja. Es interesante mencionar que, precisamente, en algunos individuos la primera pareja forma univalentes precoces (Fig. 37), como consecuencia de fenómenos de asinapsis o desinapsis, y que tal anomalía determina la formación de anafases-I y anafases-II en las que existen más de una dosis de la primera pareja (Figs. 39-40). Por lo tanto, es posible imaginar la formación de gametos con números cromosómicos anormales para la primera pareja, y que tales gametos pueden originar individuos trisómicos, como el que hemos detectado. La aneuploidía supone un desequilibrio cromosómico que las plantas soportan mejor que los animales, siendo por esta razón más frecuente en las primeras que en los segundos (Lacadena, 1981).

Por último, y en relación con este tipo de mecanismos de variabilidad cromosómica, hay que citar la detección de un individuo tetraploide ( $2n=36$ , Fig. 6) en la población Portugal D (POD). La poliploidía es un fenómeno que se produce tanto en animales como en plantas, pudiendo existir en las especies naturales en forma espontánea o bien como poblaciones o especies poliploides perfectamente establecidas.

La poliploidía espontánea se puede producir como consecuencia de la formación de gametos no reducidos simultáneamente por la línea germinal masculina y/o femenina, o por la formación de quimeras o mosaicos que afectan a la línea germinal (Lacadena, 1981). Este caso del individuo poliploide de M. comosum constituye un ejemplo de poliploidía espón-

tánea, por su baja frecuencia (un individuo en los 884 analizados = .11%). La poliploidia espontánea ha sido encontrada en diversas especies vegetales como es el manzano (Einset, 1952), con una frecuencia del .3%, y, asimismo, en especies como Zea, Datura y Antirrhinum, que han sido ampliamente estudiadas, se ha encontrado la existencia de poliploides espontáneos con frecuencia superior al .5% (Bungenberg de Jong, 1975), que son valores superiores al encontrado por nosotros en M. comosum.

De lo expuesto hasta ahora se deduce que este tipo de fenómenos de variabilidad cromosómica, se encuentran en una frecuencia muy baja en M. comosum, pudiéndose considerar los individuos que los presentan como mutantes ocasionales.

#### 6.2.2 Polimorfismos cromosómicos de la segunda pareja de M. comosum

En nuestro análisis citogenético hemos comprobado, asimismo, que la segunda pareja del cariotipo de M. comosum, presenta cuatro tipos cromosómicos que difieren entre sí por lo que se refiere a su índice centromérico ( $r$ ) y a la contribución de cada uno de ellos al total del cariotipo ( $c$ ) (véase apartado 5.2.1 y Fig. 7). Dichos tipos cromosómicos coinciden con los detectados por Garbari (1966, 1969) en poblaciones italianas, por Bentzer (1972), y Bentzer y Ellmer (1975) en poblaciones griegas, por García (1981) en poblaciones de Sierra Nevada (Granada) y por Ruiz Rejón y Oliver (1981) en poblaciones españolas. Teniendo en cuenta esta coincidencia hemos denominado a estos cuatro tipos cromosómicos: +, i, +1 e i1, siguiendo la terminología propuesta por Bentzer (1972) y Bentzer y Ellmer (1975).

El tipo cromosómico + es un cromosoma de morfología metacéntrica ( $r=1.28$ ) y de contribución relativa al total del cariotipo similar a la del tipo cromosómico i (17.86% del tipo +, y 18.90% del tipo i); en cambio el tipo cromosómico i presenta un índice centromérico ( $r$ ) muy dife-

rente al del tipo cromosómico + ( $r = 2.89$ ), lo que permite clasificarlo como un cromosoma subtelocéntrico.

Los tipos cromosómicos +1 e il presentan una contribución relativa al total del cariotipo superior a los tipos anteriores, + e i, (22.10% del tipo +1 y 23.60 del tipo il). El cromosoma +1 es submetacéntrico ( $r=2.05$ ), y el cromosoma il es subtelocéntrico ( $r=4.29$ ).

En conclusión, existen dos tipos cromosómicos, de morfología metacéntrica y submetacéntrica (+,+1), y dos tipos subtelocéntricos (i,il), es decir que se ha producido un cambio en la posición del centrómero del primer grupo al segundo. Por lo que se refiere al tamaño, se pueden clasificar los tipos cromosómicos en dos grupos, uno constituido por cromosomas de menor longitud (+,i) y otros de mayor longitud (+1,il), es decir existe un fenómeno que contribuye a la variabilidad en la segunda pareja, por lo que a la longitud de la misma se refiere.

Una vez comprobada la existencia de estos cuatro tipos cromosómicos en las poblaciones naturales de M. comosum, hemos tratado de averiguar la naturaleza de los fenómenos citogenéticos que originan estos polimorfismos.

De acuerdo con la bibliografía (véase p. ej. Hewitt, 1979) una pareja de cromosomas homólogos puede ser heteromórfica por dos razones, principalmente: 1ª) cuando en la pareja en cuestión existe un polimorfismo para una inversión pericéntrica y 2ª) cuando un miembro de la pareja tiene más material que el otro, haciendo los homólogos desiguales.

En el caso de M. comosum, la heterocigosidad estructural de la segunda pareja debe estar causada por fenómenos citogenéticos que conlleven cambios en la posición del centrómero y en la longitud. En relación con el primer tipo de fenómenos, es decir los que producen cambios en la posición del centrómero, hay que mencionar la posibilidad de que se trate de una inversión pericéntrica o de una trans-

posición centrada. Con respecto al segundo tipo de fenómenos, es decir los que determinan cambios en la longitud de los cromosomas, hay que mencionar la posibilidad de que se trate de una duplicación (o de una deleción) y/o de la existencia de un segmento cromosómico supernumerario.

#### 6.2.2.1 Polimorfismos cromosómicos producidos por el cambio en la posición del centrómero

Si el cambio en la posición del centrómero que ocurre en la segunda pareja del cariotipo de M. comosum se debiese a un fenómeno de transposición céntrica, sería posible esperar que en las anafases-I de las divisiones meióticas de los individuos heterocigotos (+/i,+l/i y +/il), ocurriese una alta frecuencia de puentes dicéntricos y fragmentos acéntricos, como consecuencia de la formación de quiasmas dentro de la zona afectada por el cambio centromérico.

Esto es, precisamente, lo que se han observado algunos autores, tal como Jackson (1973), en individuos de Haplopappus gracilis y, posteriormente, en una especie animal Eusimilis aureum (Rothfelds y Freeman, 1966), donde los cambios en la posición del centrómero se adjudican a transposiciones céntricas.

En estos casos lo único que cambia de posición es el centrómero y no las zonas adyacentes. Por esto se espera (y así sucede) que se produzca una alta frecuencia de quiasmas dentro de la zona comprendida entre los dos centrómeros. Dichos quiasmas originan puentes dicéntricos y fragmentos acéntricos.

En nuestro caso, hemos analizado el comportamiento meiótico de 8 individuos +/i, 3 +/il y 1 i/+l, (es decir individuos heterocigotos para cromosomas que difieren en la posición del centrómero), pertenecientes a una población granadina (Silleta), y en ningún caso se han detectado la formación de quiasmas dentro de la zona comprendida entre los dos centróme-

ros (Tabla 4). La ausencia de quiasmas en esta zona es un dato en contra del posible origen de estos cambios en la posición del centrómero mediante transposición céntrica. Asimismo, la ausencia de puentes dicéntricos y fragmentos acéntricos en las anafases-I de los individuos mencionados, apoya la idea de que, en M. comosum, el cambio en la posición del centrómero que ocurre en la segunda pareja, no está originado por una transposición céntrica. Tal como se ha mencionado en el apartado 5.2.2, los únicos puentes que aparecen en la segunda pareja, tanto en individuos de los citotipos mencionados, como en el resto de los analizados, son puentes sin fragmento. Estas dos observaciones apoyan el posible origen de dichos cambios por una inversión pericéntrica.

Desde el trabajo de White y Morley (1955) se reconoce que las inversiones pericéntricas en heterocigocis están caracterizadas por apareamiento recto en paquitene, por la supresión total de quiasmas dentro de los límites de la inversión y por segregaciones anafásicas compensadas genéticamente. La única excepción que se conoce para una inversión pericéntrica en estado polimórfico en que los individuos heterocigotos formen quiasmas en la zona incluida dentro de la inversión, aunque con una frecuencia muy baja, es el detectado en el saltamontes Trimerotropis sparsa por White (1951) y White y Morley (1955). También, en inversiones que se presentan como mutaciones espontáneas se ha encontrado que ocurren estos quiasmas. Entre otros, podemos señalar los casos del saltamontes Keyacris scurra (White, 1961) y, en plantas, los de Gasteria (Bradham, 1969b) y en Allium (Noda, 1974).

En nuestro caso de M. comosum, efectivamente, se observan estas dos características en el comportamiento meiótico de los individuos  $+/i$ ,  $+/il$  y  $+l/i$  (heterocigotos para cromosomas que difieren en la posición del centrómero).

Concretamente, en el comportamiento meiótico de estos individuos se puede observar lo siguiente: 1º) el apareamiento entre ambos homólogos, en la zona comprendida entre los centrómeros, se produce de forma recta, no formándose bucle de inversión, aunque sí es posible observar la formación de asinapsis (Fig. 10). Esta observación está de acuerdo con lo afirmado por Hewitt (1979) de que la heterocigosis para inversiones pericéntricas (en especies de Ortópteros), se caracteriza, generalmente, por el apareamiento recto no homólogo de las secuencias normal e invertida, y ha sido observado por Weissman (1976); Vaio et al. (1979) y Camacho y Cabrero (1982).

2º) La supresión de formación de quiasmas en la zona cromosómica comprendida entre los centrómeros (Tabla 4). Tal como se puede observar en dicha tabla, en los individuos de citotipo  $+/i$ ,  $+l/i$  y  $+/il$  no se produce la formación de quiasmas en las posiciones b y c, que estarían incluidas dentro de la zona invertida. Por el contrario en los individuos homocigotos, de uno u otro tipo ( $+/+$ ,  $+/+l$ ,  $i/i$  e  $i/il$ ), sí se produce la formación de quiasmas en dichas zonas.

El apareamiento recto actuaría como un supresor efectivo del crossing-over entre ambas secuencias, normal e invertida, habiéndose detectado, asimismo, este efecto en diversas especies de Ortópteros (White y Morley, 1955; Weisman, 1976; Camacho y Cabrero, 1982).

Es importante resaltar, como señala Hewitt (1979), que la supre-

sión de quiasmas que se produce en un bivalente heterocigótico para la presencia de una inversión pericéntrica, es fundamental para el mantenimiento del polimorfismo para la inversión en las poblaciones naturales. Si no ocurriera de esta forma, y se produjesen quiasmas, se producirían cromátidas con duplicaciones y deficiencias, que no favorecerían el establecimiento del polimorfismo. Como veremos posteriormente, este polimorfismo para cromosomas que difieren en la posición del centrómero está ampliamente extendido en las poblaciones naturales de M. comosum de toda su área de distribución.

La supresión de quiasmas en la zona comprendida dentro de la inversión tendría como efecto inmediato limitar la recombinación en los individuos heterocigotos y por lo tanto impedir la formación de nuevas combinaciones génicas, pudiendo, asimismo, conservar constante la combinación génica presente en los loci incluidos en la misma, produciendo un supergen (Ford, 1971; Weisman, 1976).

Como consecuencia de este efecto supresor de quiasmas que se produce en los individuos de citotipo  $+/i, +/il$  e  $i/+l$ , éstos presentan una frecuencia media de quiasmas menor que la de los individuos  $+/+$  e  $i/i$  (Tabla 4). Dicha diferencia es estadísticamente significativa en todos los casos (Tabla 5).

Por otra parte, aunque la formación de quiasmas intersticiales en los bivalentes de la segunda pareja heterocigotos para la inversión está dificultada, la formación de quiasmas distales en dichos individuos presenta una alta frecuencia (Tabla 4), siendo muy parecida e incluso superior a la que presentan los individuos homocigotos para los cromosomas estandar ( $+/+$ ) e invertido ( $i/i$ ). Esta formación de una alta frecuencia de quiasmas distales aseguraría que dicha pareja tuviera una perfecta segregación anafásica, pues, de acuerdo con Zarchi et al. (1972),

la función de dichos quiasmas es mantener siempre juntos los cromosomas homólogos durante la meiosis.

En algunos casos (White y Morley, 1955; Weissman, 1976; Cabrero y Camacho, 1982), se ha observado que en los bivalentes heterocigotos para una inversión pericéntrica se produce un aumento significativo de quiasmas distales, siendo interpretado dicho efecto como una forma de asegurar la segregación anafásica de dicho bivalente. De esta forma, aunque se reduce el número de quiasmas intersticiales, al aumentar el número de quiasmas distales, es posible que dichas reordenaciones puedan subsistir en las poblaciones naturales en estado polimórfico, pues, como señala Weisman (1976), solo permanecerán las reordenaciones que permitan la formación de un quiasma como mínimo, tanto en estado homocigótico u heterocigótico.

Por todo lo dicho pensamos que el origen más probable del cambio en la posición del centrómero en M. comosum se debe a una inversión pericéntrica.

De todas formas, tanto en los diferentes casos de Ortopteros y (White, 1951; White y Morley, 1955; Vaio et al. 1979; Cabrero y Camacho, 1982) y de especies vegetales (Bentzer, 1972; Noda, 1974), como en nuestro caso de M. comosum, no existe una confirmación última de que los cambios en la posición del centrómero ocurran por una inversión pericéntrica. Por el contrario los cromosomas de las glándulas salivares de Drosophila, han permitido identificar hasta 32 inversiones pericéntricas (Swanson et al., 1981), gracias al patrón de bandas e interbandas que dichos cromosomas presentan, y que facilitan el poder averiguar en que sentido se ha producido el cambio cromosómico.



Sin embargo, en nuestro caso, para tratar de profundizar en la naturaleza del fenómeno que origina el cambio en la posición del centrómero, hemos analizado, mediante la aplicación de las técnicas de bandeo-C, los tipos cromosómicos +,+1 comparándolos con los i,il. Nuestra idea era que mediante la aplicación de las técnicas de bandeo se pueden lograr marcadores cromosómicos que permitan resolver la naturaleza de este tipo de reordenaciones (Shaw et al. 1976; Davisson et al. 1981). Nuestro intento de caracterización de la segunda pareja mediante bandeo-C ha revelado que dicha pareja no presenta ningún tipo de banda heterocromática intersticial, que se pueda utilizar para reconocer cómo ha sucedido la reordenación centromérica. En este sentido solo hemos podido comprobar el cambio de posición de la banda heterocromática centromérica de los tipos cromosómicos +,+1 con respecto a los i, il (Fig. 22).

Aunque estos cambios de posición de la zona heterocromática del centrómero es compatible tanto con la transposición céntrica, como con una inversión pericéntrica, todas las observaciones indicadas anteriormente hacen que nos inclinemos por el origen mediante una inversión pericéntrica de los cambios producidos en la posición del centrómero en la segunda pareja de M. comosum.

En este sentido, otra evidencia que apunta al posible origen, de estos cambios en la posición del centrómero, mediante una inversión pericéntrica es la observación de la influencia de la reordenación en la formación de quiasmas en otros bivalentes del complemento, lo que está de acuerdo con las observaciones de otros autores (efecto Schultz-Redfiel, 1951).

En M. comosum se puede observar cómo en los individuos heterocigóticos,  $+/i$ , la primera pareja del cariotipo tiene una menor frecuencia de quiasmas que en los dos citotipos homocigotos, estandar  $(+/+)$  e invertido  $(i/i)$  (Tabla 6). En el caso de los individuos de genotipo  $i/i$  dicha diferencia es estadísticamente significativa (Tabla 7). Por tanto, se puede afirmar que existe un efecto intercromosómico, producido por la inversión en estado heterocigótico. Dicho efecto consiste en la reducción del número de quiasmas en la primera pareja de los individuos heterocigóticos,  $+/i$ , respecto a los individuos homocigotos estandar  $(+/+)$  e invertido  $(i/i)$ .

Solamente conocemos un caso en que este efecto se produzca en el mismo sentido del que hemos encontrado en M. comosum. Este caso es el citado por Cabrero y Camacho (1982), de una inversión pericéntrica detectada en el saltamontes Ailopus strepens.

Dicho efecto supresor se podría explicar si el apareamiento de los cromosomas homólogos se produjese según el modelo propuesto por Ashley (1979) y Bennett (1982). Tal modelo propone que el complemento diploide de una especie se organiza en dos cadenas cromosómicas lineales, en las que los cromosomas se unirían entre sí por sus telómeros, de acuerdo con la longitud relativa de sus brazos. El apareamiento homólogo en meiosis se produciría por la unión de ambas cadenas haploides. Si el apareamiento se produjera de esta forma, se podría esperar que en aquellos organismos heterocigotos portadores de una reordenación cromosómica, que alterase la longitud de los brazos, el apareamiento homólogo sufriría alteraciones. Dichas alteraciones se producirían no solo en el cromosoma afectado por la reordenación, si no también en otros cromosomas del complemento similares en tamaño (Maguire, 1983).

El efecto supresor, que en estado heterocigótico tiene la inversión pericéntrica detectada en M. comosum, sobre la formación de quiasmas, tanto en el bivalente afectado por la reordenación, como en el 1º bivalente del complemento, debe tener un reflejo sobre la media de quiasmas en dichos individuos. Efectivamente, se puede observar (Tabla 6) que los individuos de genotipo +/i presentan una media de quiasmas menor que los individuos de genotipos homocigotos (+/+ y +/i), siendo estas diferencias estadísticamente significativas, en ambos casos (Tabla 8).

Creemos que este descenso que se produce en la frecuencia media de quiasmas por célula, en los individuos heterocigotos para la inversión pericéntrica detectada en M. comosum, es la primera vez que se cita. En aquellos casos en que este parámetro se ha medido, se ha encontrado que la inversión o bien aumenta la media de quiasmas como son los casos citados por Schultz y Redfiel, (1951); White y Morley (1955); Schroeter (1968) o no tiene efecto (Weisman, 1976; Vaio et al. 1979; Shaw y Wilkinson, 1980; Cabrero y Camacho, 1982).

Asimismo, éste es el primer caso en que, en especies vegetales, se ha detectado la existencia de un polimorfismo para una inversión en poblaciones naturales. Como se puede observar en la tabla 11, la inversión existente en M. comosum se encuentra ampliamente distribuida en las 23 poblaciones analizadas citogenéticamente. Las inversiones paracéntricas y pericéntricas en vegetales, hasta ahora, solamente han sido detectadas en las poblaciones naturales como mutantes ocasionales; Tsuchiya (1963) en el centeno; Sjodin (1971) en Vicia faba; Bradham, (1969a y 1969b) en Aloineia; Watanabe y Noda (1974) en Allium thunbergii; Noda, (1974) en Scilla scilloides; Ekber (1974) en cebada. Esta mínima incidencia de polimorfismos cromosómicos para inversiones se debe a que, en los individuos heterocigóticos, se producen entrecruzamientos entre la

zona estandar e invertida, lo que origina la formación de duplicaciones y deficiencias, lo que no favorece su establecimiento en las poblaciones naturales.

Por el contrario, en poblaciones naturales de especies animales han sido citados numerosos casos de polimorfismos cromosómicos para inversiones, tanto pericéntricas como paracéntricas. Las inversiones paracéntricas han sido citadas ampliamente en especies de Dípteros (véase Dobzhansky, 1970; Rothfeld, 1980; Knibb, 1983), así como inversiones pericéntricas (Yamaguchi y Mukai, 1974; Yamaguchi et al. 1976; Saguna et al. 1980).

Otro grupo animal donde han sido citados la existencia de polimorfismos cromosómicos para inversiones es en Ortópteros (véase Hewitt, 1979), siendo la mayoría de ellas inversiones pericéntricas. Asimismo, en roedores y aves también se ha encontrado la existencia de polimorfismos para inversiones pericéntricas (Yosida et al. 1965, 1967, 1971; Shields, 1973, 1976; Diaz de la Guardia et al. 1979, 1981).

#### 6.2.2.2 Polimorfismos cromosómicos debidos a las diferencias de longitud

Pasamos a continuación a analizar el segundo tipo de fenómenos citogenéticos que contribuyen a la formación de los polimorfismos cromosómicos que presenta la segunda pareja del cariotipo de M. comosum, es decir aquellos que producen cambios en la longitud de los cromosomas.

Como antes hemos señalado, los cuatro tipos cromosómicos que presenta la segunda pareja de M. comosum (Fig. 7) se pueden reunir en dos grupos, según sea su longitud relativa. Uno de estos grupos está constituido por los cromosomas de menor longitud (+,i) y el otro está formado por los otros dos cromosomas de mayor longitud (+1,il). Esta diferencia en el tamaño puede observarse no solamente en mitosis (Fig. 7), sino que, en meiosis, los individuos heterocigotos (+/+1, +/il, +1/i e i/il) presentan un bivalente desigual (Figs. 14, 15, 16, 17), lo que, de acuerdo

con Schroeter y Hewitt (1974), es una evidencia de que los dos homólogos tienen distinta longitud.

Uno de los mecanismos que pueden producir dichos cambios en la longitud de los cromosomas puede ser la deleción. Al representar una pérdida de material las deleciones suelen ser deletéreas, y por esto no deben de tener una gran importancia evolutiva (Lacadena, 1981), no siendo frecuentes en la naturaleza. Por ello, nosotros creemos que la deleción no es el mecanismo que produce los cambios en la longitud de la segunda pareja de M. comosum.

Por lo tanto, dichas diferencias pueden tener dos posibles orígenes: a) por duplicación de material cromosómico; tal duplicación habría sucedido recientemente, por lo que no estaría evolucionada. b) Por la presencia de un segmento supernumerario eucromático o heterocromático.

Si el mecanismo que produce el cambio de longitud entre ambos grupos cromosómicos de la segunda pareja de M. comosum fuera una duplicación reciente de material cromosómico, sería posible esperar la observación de fenómenos de autoapareamiento en las zonas implicadas (lo que sería una prueba de la existencia de homología entre el segmento original y el duplicado). Esto es lo que se ha observado en duplicaciones detectadas en el maíz (McClintock, 1941; Gavazzi et al. 1977) y en avena por Neijzing (1982). Asimismo, sería posible la observación de fenómenos de puente-rotura-fusión, que se producirían como consecuencia de la formación de quiasmas entre el segmento duplicado y el no duplicado, o entre el segmento duplicado y el cromosoma homólogo (McClintock, 1941).

En los individuos analizados de M. comosum que son heterocigóticos para cromosomas de diferente longitud ( $4 +/+1$ ,  $3+/i1$ ,  $1 i/+1$  y  $2 i/i1$ ), nunca hemos observado la existencia de fenómenos de autoapareamiento (Figs. 12 y 13), así como tampoco nunca hemos detectado en las anafases-I

analizadas fenómenos de puente-rotura-fusión (Fig 19). La no observación de estos dos fenómenos nos hace suponer que la duplicación no es el origen más probable de los cambios producidos en la longitud entre ambos grupos cromosómicos (+ e i, +1 e il) de la segunda pareja de M. comosum.

El segundo de los mecanismos que puede provocar diferencias en el tamaño de los cromosomas es la existencia de material supernumerario (segmentos supernumerarios), que pueden incluir tanto cambios en la cantidad de heterocromatina, o bien cambios en la cantidad de eucromatina (John, 1981).

En nuestro caso, el material cromosómico extra observado en M. comosum presenta un aspecto eucromático durante la profase-I de meiosis (Figs. 14, 15, 16 y 17), y, asimismo, cuando se analizan dichos cromosomas mediante técnicas de bandeo-C, tales segmentos tienen un aspecto totalmente eucromático, no presentando ningún tipo de banda heterocromática (Figs. 22 y 23). Estas dos observaciones apuntan a que dicho material extra observado en M. comosum constituye un segmento supernumerario eucromático.

La existencia de segmentos supernumerarios en el caso de organismos vegetales se produce con muy baja frecuencia, conociéndose pocos casos de su ocurrencia en poblaciones naturales (Ting, 1958; Bentzer, 1972; Ainsworth et al. 1983; Ruiz Rejón, 1983).

Por contra, en el grupo de los Ortópteros la presencia de segmentos supernumerarios está ampliamente reseñada ( véase Hewitt, 1979; Camacho et al. 1984).

Hewitt (1979) reconoce a los segmentos supernumerarios que se producen en Ortópteros dos características generales: 1ª) que cuando se producen afectan a los cromosomas cortos del complemento. En ocasiones también pueden ocurrir en miembros más grandes (John, 1973).

b) Que generalmente presentan heteropicnosis durante la profase-I

siendo de naturaleza heterocromática en todos los casos. Sin embargo, el comportamiento de dicha heterocromatina puede ser variable cuando se analiza por medio de bandeado-C (John y King, 1977; Gosalvez y Lopez-Fernandez, 1981). Posteriormente Camacho et al., (1984) han detectado en el saltamontes Omocestus bolivari, la presencia de un segmento supernumerario, cuya naturaleza es eucromática en meiosis I, y no presenta ningún tipo de tinción cuando se analiza por medio de Bandedo-C, al igual que el segmento supernumerario detectado por nosotros en M. comosum.

Por lo que se refiere al efecto que, en Ortópteros, pueden ejercer los segmentos supernumerarios sobre la formación de quiasmas, generalmente, han sido estudiados dos aspectos: los efectos sobre la formación de quiasmas por célula y los efectos sobre la localización de los quiasmas en los bivalentes que portan los segmentos extra.

Así, Camacho et al. (1984) llegan a la conclusión de que los efectos sobre la formación de quiasmas de los segmentos supernumerarios dependen de su naturaleza heterocromática. Los segmentos supernumerarios heterocromáticos que no presentan bandas-C aumentan la frecuencia media de quiasmas celular, mientras que los segmentos supernumerarios que se bandean total o parcialmente no tienen influencia sobre este parámetro. Igualmente el segmento supernumerario eucromático detectado por Camacho et al. (1984) no tiene, tampoco, influencia sobre dicho parámetro.

Sin embargo, un efecto que en Ortópteros parecen tener los segmentos supernumerarios, en general, sea cual sea su naturaleza heterocromática, es el de provocar el cambio de localización de quiasmas, desplazándolos a las zonas cromosómicas más alejadas del segmento. Incluso pueden tener un efecto supresor sobre la formación de quiasmas en el brazo del bivalente portador del segmento (John y King, 1982).

El segmento supernumerario de M. comosum ejerce un efecto supresor sobre la formación de quiasmas, en las posiciones incluidas entre el centrómero y el segmento (Tabla 4) (Figs. 14, 15, 16 y 17). Concretamente en dicha tabla podemos ver cómo, en los individuos de genotipo heterocigótico para cromosomas de longitud diferente en la segunda pareja (+/+1, +/il, +1/i e i/il), no se produce la formación de quiasmas en la posición d, en los individuos de genotipo +/+1, +/il y +1/i, y en las posiciones b, c y d en los individuos de genotipo i/i (estas tres zonas están comprendidas entre el centrómero y el segmento). Por el contrario, en dichas zonas sí se produce la formación de quiasmas en los individuos homocigotos para cromosomas sin segmento (+/+, +/i e i/i). Dicho efecto supresor, ha sido observado en el saltamontes Heteropternis obscurella (John y King, 1982) y está producido por un segmento supernumerario heterocromático en posición terminal.

Debido al efecto supresor ejercido sobre la formación de quiasmas por el segmento supernumerario de la segunda pareja de M. comosum, la segregación anafásica que se observa para dicho segmento es de tipo reduccional, en todas las anafases-I que hemos observado.

Dos son las posibles hipótesis para intentar explicar el origen del efecto supresor del segmento sobre la formación de quiasmas.

La primera de ellas pensamos que puede tener relación con la naturaleza eucromática del segmento, y con su posible origen. Si, como discutiremos más tarde el segmento de M. comosum es un relicto cromosómico, solo existiría telómero en el extremo del segmento. Así las cosas, si el apareamiento de los cromosomas con segmento y los cromosomas sin segmento ocurre por los telómeros habría un quiasma terminal, y un bucle de asinapsis en los cromosomas sin segmento (véase Fig.12). Esta asinapsis podría originar dificultades en el apareamiento (o un falso apareamiento) en todo el brazo de los cromosomas con segmento por lo que no habría quiasmas en el interior de este brazo. Alternativamente, los cromosomas sin segmento y con segmento se pueden aparear de forma recta quedando una zona final sin sinapsar, en los cromosomas con segmento (véase Fig.13).



En este caso, al no haber telómero en la zona del cromosoma con segmento enfrentada al telómero del cromosoma sin segmento, no habría verdadera sinapsis ni formación de quiasmas (de los estudios llevados a cabo por Westergaad y von Wettstein, 1972; Stern y Hotta, 1973 parece claro que los cromosomas homólogos se comienzan a sinapsar por los telómeros). En este caso, asimismo, no existirían tampoco quiasmas terminales, lo que viene corroborado por la ausencia de bivalentes en diploteny metafase-I en que se observen quiasmas entre el segmento y el centrómero; sólo se observan lo que creemos que son verdaderos quiasmas terminales en el extremo del segmento, en relación con el tipo de apareamiento anterior.

Esta asociación, al ocurrir entre dos zonas eucromáticas, puede ser de naturaleza quiasmada, en contraposición con las asociaciones eu-heterocromáticas observadas en el caso de segmentos supernumerarios heterocromáticos de saltamontes (John, 1973; Gosalvez y Lopez-Fernandez 1981; John y King 1982), donde la existencia de un quiasma puede ser cuestionada (Jones y Tease, 1984).

La formación de quiasmas en la zona terminal estaría de acuerdo con la explicación tradicional de que las asociaciones terminales entre los cromosomas de un bivalente se deben a un quiasma distalmente localizado (Jones y Tease, 1984).

Este tipo de asociación terminal entre un segmento eucromático y el telómero del cromosoma no segmentado, y su efecto intracomosomal sobre la formación de quiasmas, se contraponen a lo observado por Ruiz Rejón M. (Datos sin publicar), en individuos de la especie Tulipa australis que son portadores de un segmento supernumerario terminal, de naturaleza heterocromática. En dichos individuos la asociación terminal se produce entre el telómero del cromosoma no portador del segmento y la zona anterior al segmento supernumerario, quedando el segmento sin sinapsar. En estos individuos no se produce la supresión de quiasmas observada en M. comosum, produciéndose un quiasma en posición proximal al centrómero, lo que determinará que el segmento tenga segregación ecuacional en un determinado porcentaje de células.

La segunda de las hipótesis que podría explicar el efecto intracromosómico de supresión de quiasmas ejercido por el segmento eucromático detectado en M. comosum está, al igual que en el caso de la inversión, relacionado con el modelo propuesto para el apareamiento de los cromosomas homólogos por Ashley (1979) y Bennet (1981). Así, de acuerdo con este modelo, la variación producida en los brazos cromosómicos de la segunda pareja por la presencia del segmento, alteraría el proceso de sinapsis de esta pareja, dificultando la formación de quiasmas.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, podemos concluir que el segmento supernumerario en M. comosum, tiene un efecto supresor sobre la formación de quiasmas en las posiciones incluidas entre el centrómero y el segmento. Asimismo, y debido precisamente a este efecto supresor en la formación de quiasmas, la segregación anafásica de dicho segmento se produce siempre de forma reduccional.

Como consecuencia igualmente del efecto supresor ejercido por el segmento supernumerario sobre la formación de quiasmas, es posible la producción de un conjunto de genes coadaptados localizado en el brazo cromosómico de la segunda pareja portador del segmento. Tal conjunto de genes que se heredarían conjuntamente constituirían un supergen (Ford, 1971). Dicho supergen podría conferir un mayor valor adaptativo al cromosoma portador, lo que permitiría su establecimiento en las poblaciones naturales en estado polimórfico (véase más adelante pag. 231)

Por lo que se refiere, asimismo, a los efectos intracromosómicos ejercidos por el segmento supernumerario de M. comosum, en la tabla 4 se puede observar que las frecuencias de formación de quiasmas en las zonas terminales de los cromosomas portadores de dicho segmento, por lo general, son un poco más elevadas que en los individuos no portadores. Este aumento en la frecuencia de quiasmas terminales, aunque pequeño, se produciría, al igual que ocurría en el caso de los individuos he-

terocigóticos para la inversión, para asegurar una segregación anafásica de la segunda pareja perfecta.

Como consecuencia de la drástica supresión de la formación de quiasmas que se produce con la existencia del segmento supernumerario, la media de quiasmas de la segunda pareja en los individuos portadores del segmento sufre un descenso respecto a los individuos no portadores (Tabla 4). Este descenso es estadísticamente significativo para la media de los individuos de genotipo  $+/+$  e  $i/i$ , respecto a las medias de todos los genotipos portadores de segmento (Tabla 5). Es de resaltar, asimismo, que los individuos  $+/+1$  presentan una media mayor de quiasmas para la segunda pareja, y también estadísticamente significativa, que los otros individuos portadores  $+/il$ ,  $+1/i$  e  $i/il$ . Esta diferencia quizás se deba a que, en los individuos de genotipo  $+/+1$ , sí se producen quiasmas en las posiciones b y c, lo que no ocurre en los otros genotipos (véase tabla 4).

Un segundo aspecto de los efectos que el segmento supernumerario de M. comosum produce, es su influencia en la frecuencia de quiasmas de la primera pareja del cariotipo. En la tabla 6 se recogen las medias de quiasmas que presentan tanto los individuos portadores del segmento como los no portadores. Un primer dato a destacar es que los individuos  $+/+1$  e  $i/il$ , presentan una media de quiasmas menor que los individuos  $+/+$  e  $i/i$ , respectivamente, siendo en este caso las diferencias significativas (Tabla 7). Otro dato a destacar es que los individuos  $+/il$  y  $+1/i$  presentan unas medias de quiasmas muy similares a la de los individuos  $+/i$ . Por tanto, el segmento supernumerario, como la inversión, tiene un efecto supresor sobre la formación de quiasmas en la primera pareja.

Este efecto supresor producido en la primera pareja del cariotipo, podría explicarse de acuerdo con el modelo propuesto por Ashley (1979) y Bennet (1981) para el apareamiento de los cromosomas homólogos. Así, como consecuencia de la variación en la longitud de los brazos cromosómicos de la segunda pareja, producida por la presencia del segmento supernumerario, el apareamiento cromosómico se alteraría no solo en el bivalente portador del segmento, sino que dicho efecto se produciría también en otros bivalentes del complemento de similar tamaño (Maguire, 1983).

Estos dos efectos de supresión de quiasmas del segmento, tanto en la pareja portadora como en la primera pareja del cariotipo, producen un descenso en la media de quiasmas celular en los individuos heterocigóticos respecto a los homocigóticos no portadores (Tabla 6). Como se observa en la tabla 8 este descenso es estadísticamente significativo entre los individuos  $+/+1$  y  $+/+$ , y en los individuos  $i/il$  respecto a los individuos  $i/i$ . Asimismo, los individuos  $+/i$  presentan una media de quiasmas, para el total del cariotipo, mayor que los individuos  $+/il$  y  $+1/i$ . Esta diferencia se podría deber a que, en los individuos de genotipo  $+/il$  y  $+1/i$  no ocurren quiasmas en la zona  $d$  (comprendida entre el segmento y el centrómero) mientras que sí ocurren en los individuos  $+/i$ .

En resumen, podemos señalar que el segmento supernumerario de M. comosum reduce la frecuencia de quiasmas por célula. Este efecto supresor, no ha sido observado en ninguno de los segmentos supernumerarios de Ortópteros, pues como ya hemos señalado en estos organismos o bien elevan la frecuencia media de quiasmas (John y Hewitt, 1966; 1969; Shaw, 1970, 1971; John, 1973; Riva et al. 1984) o, en otros casos, los segmentos no influyen sobre este carácter. (Schroeter y Hewitt, 1974; Westerman 1976;

Gosálvez et al. 1981; Camacho y Cabrero 1982; Camacho et al., 1984).

El papel evolutivo del segmento supernumerario de M. comosum, puede residir, por tanto, en su influencia en la regulación de la recombinación, pudiendo contribuir dicho efecto a su mantenimiento en las poblaciones. Dos son los posibles consecuencias más directas del efecto supresor del segmento:

1º) la creación de un supergen (Darlington y Mather, 1949) en la zona de la segunda pareja próxima al segmento, en la que suprime totalmente la formación de quiasmas (véase pag. 231).

2º) Como consecuencia del efecto supresor del segmento sobre la recombinación, tanto en la primera pareja del cariotipo como en la segunda, se podría producir un descenso en la variabilidad genética engendrada por recombinación. Este descenso en la variabilidad puede ser importante desde el punto de vista adaptativo. Como señalan Rees y Dale (1974) y Westerman (1983), las poblaciones con baja frecuencia de quiasmas pueden tender a preservar mejor su variabilidad, pues se producen menos efectos disruptivos sobre los complejos de supergenes.

En cuanto al origen de los segmentos supernumerarios se han formulado dos posibles hipótesis (White, 1954, 1973).

a) Por translocaciones de otros autosomas, o bien de un cromosoma accesorio.

b) Por duplicación de material autosómico y posterior heterocromatinización de la zona duplicada.

Hasta ahora, en la bibliografía son muy pocos los casos aportados sobre el primer tipo de origen. En concreto Rao (1933) y Southern (1970)

han realizado algunas observaciones que apuntan hacia la existencia de translocaciones cromosómicas distales entre cromosomas homólogos, como posible origen de los segmentos supernumerarios.

La segunda hipótesis es la más aceptada hasta ahora, existiendo varios casos, (Shaw, 1970, 1971; John, 1973), en los que dicho origen parece muy probable.

Por lo que respecta al segmento supernumerario detectado en M. comosum, en ninguna ocasión hemos observado que dicho segmento presente asociación no homóloga con algún elemento del complemento normal. Asimismo, en ningún caso hemos observado individuos que presenten pérdida de material cromosómico en alguna pareja del resto del complemento. Por estos dos motivos, pensamos que se puede descartar la hipótesis del origen por translocación de otro cromosoma del complemento. Igualmente no creemos que se haya producido por translocación de un cromosoma accesorio, ya que, aunque hemos detectado la presencia de cromosomas accesorios en M. comosum, la frecuencia con que dichos cromosomas se observan es muy baja, y asimismo, la naturaleza heterocromática de dichos cromosomas no apoya la idea de que éste sea el origen del segmento de M. comosum.

A favor del posible origen del segmento supernumerario de M. comosum por duplicación, existen una serie de observaciones como son:

a) La asociación terminal entre el segmento y el cromosoma no segmentado indicaría la existencia de cierta homología entre ellos.

b) Las duplicaciones en tandem, detectadas en Drosophila, tienen un comportamiento sobre la recombinación que depende de su longitud. Así, las duplicaciones cortas y medianas aumentan o tienen un efecto pequeño sobre la recombinación ( Green, 1962; Kalisch, 1975). Por el contrario, las duplicaciones en tandem de tamaño grande producen un descenso en las frecuencias de recombinación ( Roberts, 1966, Kalisch, 1975). Esta dependencia de la longitud parece estar exclusivamente restringida a las duplicaciones en tandem ( Van de Vate y Jansen; 1978). Como hemos podido comprobar, el segmento supernumerario de M. comosum tienen un efecto supresor sobre la recombinación en el brazo cromosómico que lleva el segmento, por lo que tendría el mismo efecto que las duplicaciones en tandem de gran tamaño detectadas en Drosophila.

c) La existencia de intercambios de tipo-U en la segunda pareja puede ser el origen de dicha duplicación, por una rotura asimétrica del puente dicéntrico en anafase-I. Este origen ha sido señalado como probable para las duplicaciones observadas en Leopoldia weissii (Bentzer 1972) y en Aloe (Bradham, 1975).

Sin embargo, existe un dato que nos hace dudar sobre el posible origen por duplicación del segmento supernumerario de M. comosum, y es su naturaleza eucromática. Los dos mecanismos anteriormente

mencionados (translocación y duplicación) implican la existencia de material repetido que habitualmente aparece heterocromatinizado (Hewitt y John, 1968; Camacho et al., 1981). Si aceptamos su origen por duplicación permanece la incógnita de que por qué no ha sido heterocromatinizado el segmento supernumerario de M. comosum.

Una tercera explicación, diferente a las dos anteriores, podría ser la de que el segmento supernumerario observado en M. comosum fuera un relicto de un bloque cromosómico eucromático que formaba parte del cromosoma ancestral y que ha sufrido una translocación a otro cromosoma del complemento. Dicho bloque cromosómico habría sufrido posteriormente un proceso de diferenciación, lo que determina que no exista ningún tipo de homología entre el bloque original y el translocado.

Este posible tercer mecanismo estaría en relación con los fenómenos que han originado el cariotipo de M. comosum. El cariotipo de esta especie es claramente asimétrico y casi bimodal (Fig. 2), con dos grupos de cromosomas de tamaño muy diferente entre sí, siendo la especie que presenta el cariotipo más asimétrico de todas las especies del subgénero Leopoldia (Bentzer, 1973).

El origen de dichos cariotipos bimodales ha sido explicado por dos teorías diferentes:

Darlington (1963) sugiere que tales cariotipos derivan de otros más simétricos de origen poliploide, habiéndose producido los cromosomas cortos por pérdidas de trozos cromosómicos.



La segunda de las teorías, propuesta por Levitzky (citado en Stebbins, 1971), sugiere que los cariotipos bimodales se originan como resultado de translocaciones desiguales entre los cromosomas del cariotipo.

En el caso de M. comosum, el origen de su cariotipo asimétrico, casi bimodal, se podría atribuir a la existencia de translocaciones recíprocas desiguales. Esta hipótesis está avalada por el hecho de la existencia en el género Muscari, y concretamente en el subgénero Leopoldia, de una escala de cariotipos con nueve parejas de cromosomas progresivamente asimétricos, escala en la que el cariotipo de M. comosum sería el resultado final. Asimismo, en M. comosum se ha detectado la existencia de duplicaciones génicas (en el gen que controla la alcohol deshidrogenasa, véase resultados apartado 5.4.1, y en el gen que controla las esterasas Oliver et al., (1983), con características compatibles con un posible origen mediante translocaciones. Si, en el proceso evolutivo que ha originado el cariotipo tan característico de M. comosum, han intervenido las translocaciones para dar lugar a una pareja de gran tamaño, una pareja de tamaño intermedio y siete de tamaño pequeño, los segmentos cromosómicos que presenta la segunda pareja pueden constituir un relicto del cromosoma ancestral segundo (más grande que el actual). De hecho, las especies del subgénero Leopoldia del género Muscari emparentadas con M. comosum (p. ej. M. matritensis (Ruiz

Rejón et al., en prensa ) presentan dos parejas grandes de similar tamaño, ambas subtelocéntricas.

A favor de este posible origen del segmento de M.comosum, como un relicto de un cromosoma ancestral más grande, está, además, su comportamiento meiótico caracterizado por la aparente existencia de una sola zona de actividad telomérica, tal como se ha discutido anteriormente. En otros casos de segmentos heterocromáticos y/o eucromáticos terminales (ver Hewitt, 1979) la actividad telomérica de los cromosomas puede estar localizada aparentemente al comienzo del segmento, en el extremo del cromosoma normal (Ruiz Rejón M., datos sin publicar) . En algunos casos de segmentos terminales de saltamontes (John, 1973; Gosálvez y Lopez Fernandez, 1981 John y King, 1982) se ha defendido la asociación terminal entre zonas eucromáticas y heterocromáticas . Sin embargo otros autores (Nur, 1961) indican la posible existencia de zonas eucromáticas en el extremo de los segmentos en los que tendría lugar la formación de un quiasma terminal (Jones y Tease, 1984).

### 6.3 Variabilidad genética existente en *Muscari comosum*

Como hemos podido comprobar en nuestro estudio, *M. comosum* presenta gran variabilidad genética a dos niveles: variabilidad cromosómica y variabilidad génica. En un estudio realizado por Bentzer (1973) se comprobó que esta especie presenta, asimismo, gran variabilidad fenotípica (Tutin et al., 1980).

Desde el punto de vista cromosómico, además de mutantes ocasionales que afectan al número cromosómico, y cuya frecuencia es muy baja, *M. comosum* presenta cuatro tipos cromosómicos, claramente diferenciados entre sí, para la segunda pareja de su cariotipo. Estos cuatro tipos cromosómicos, como se ha discutido, están ocasionados por la presencia de una inversión pericéntrica y de un segmento supernumerario eucromático.

Desde el punto de vista génico, hemos podido observar que *M. comosum* presenta igualmente una gran variabilidad. Así, de seis loci analizados, cuatro de ellos son claramente polimórficos, presentando unos altos valores de proporción de loci polimórficos, (P), del número de alelos por locus, (A), y de heterocigosidad, (H).

### 6.3.1 Variabilidad cromosómica

El análisis de la variabilidad cromosómica, para la inversión y el segmento, lo hemos realizado en 852 individuos de 22 poblaciones que se extienden desde Grecia hasta las Islas Canarias, pasando por poblaciones de Italia continental, Sicilia, Francia, Islas Baleares y Península Ibérica (Tabla 2).

En dicho análisis hemos encontrado que de los cuatro tipos cromosómicos que puede presentar la segunda pareja de M. comosum, dos de ellos, el tipo + y el tipo i, se encuentran en todas las poblaciones (Tabla 10). Las tres combinaciones genotípicas que se pueden formar entre ellos se encuentran en la mayoría de las poblaciones, aunque existen cuatro poblaciones (COZ, MOT, POA y POD) en las que no ha sido observado el genotipo i/i (Tabla 9.).

Por otra parte, los otros dos tipos cromosómicos (+1 e il), portadores del segmento supernumerario detectado en M. comosum, son menos frecuentes, en general, que los tipos no portadores (Tabla 10). Nunca hemos encontrado individuos homocigóticos para cromosoma portadores del segmento. Esta misma ausencia de individuos homocigotos ha sido puesta de manifiesto por Bentzer y Ellmer (1975) en poblaciones griegas, y por Ruiz Rejón y Oliver (1981) en poblaciones españolas.

Como medida de la variabilidad cromosómica hemos utilizado la heterocigosidad observada en cada población. Los valores de dicho parámetro son muy variables para la inversión, existiendo poblaciones con valores muy altos, (.71 en MEN-1) y otras con valores bajos (.06 en COZ), presentando un valor medio en el conjunto de las poblaciones de  $H = .43 + .04$ . (Tabla 12).

Estos valores pueden ser comparados con los obtenidos por Ruiz Rejón y Oliver (1981), que encuentran que, generalmente, las poblaciones

de la Península Ibérica, presentan una heterocigosidad alta para la inversión (valores alrededor de .44) aunque, como en nuestro caso, existen poblaciones que presentan valores muy bajos para dicho parámetro. Estos autores calcularon también la heterocigosidad de seis poblaciones de dos islas griegas analizadas por Bentzer (1972), encontrando que, dichas poblaciones, presentan una alta heterocigosidad para la inversión ( $H = .52 \pm .02$ ). En nuestro caso que, también, hemos analizado poblaciones insulares (RAG, MEN-1, MEN-2, LLUV, VAL, MOY y SUR) cuando se calcula la heterocigosidad que presentan dichas poblaciones se encuentra un valor ligeramente superior al resto de las poblaciones ( $H = .44 \pm .03$ ) e inferior a las poblaciones griegas.

Por otra parte, la heterocigosidad observada para el segmento es igualmente altamente variable, existiendo poblaciones que presentan un valor elevado (LLUV,  $H = .45$ ) y otras donde no se ha observado el segmento y cuyo valor de H es 0. El valor medio en el conjunto de las 18 poblaciones es  $H = .08 \pm .02$ . Este valor es inferior al observado para la inversión. Por lo que se refiere a las poblaciones insulares, las dos poblaciones de la Isla de Mallorca (LLUV y VAL) presentan valores mucho más altos que el resto de las poblaciones tanto insulares como continentales.

A partir de los datos de la heterocigosidad observada en ambas ordenaciones hemos obtenido la heterocigosidad total observada en M. como-sum. Tal como se puede observar en la tabla 12 dicho parámetro alcanza un valor de  $H = .258 \pm .05$ . Este resultado se puede comparar con los observados por otros autores, principalmente en especies de Drosophila. Así, por ejemplo, Fontdevila et al. (1982) encuentran que, en poblaciones de Sudamérica de D. buzattii, la heterocigosidad observada es de  $H = .28 \pm .01$ .

Por su parte Ruiz (1983) encuentra que, esta misma especie, presenta una heterocigosidad media en poblaciones de Europa y América de  $H = .375 \pm .02$ , que es más alto que el observado por nosotros en M. comosum. Asimismo, en poblaciones de D. ananassae de la India, analizadas por Singh (1983), la heterocigosidad media observada es de  $H = .30 \pm .04$ , que es un valor superior al de M. comosum.

Los valores de heterocigosidad cromosómica observados en las especies de Drosophila citadas han sido calculados a partir de un número de ordenaciones mayor que el observado por nosotros en M. comosum, aunque el número de individuos analizados por población es semejante. Por lo tanto, debemos señalar que los valores de heterocigosidad obtenidos en M. comosum, tienen un menor grado de significación que en los casos de las especies de Drosophila, pues, como señalan Ayala y Valentine (1983), para que la estima de heterocigosidad sea significativa es necesario examinar un número elevado de marcadores genéticos.

Como hemos señalado, las poblaciones de las islas presentan en general unos niveles de variación ligeramente superior al de las poblaciones continentales. Esta observación está de acuerdo con lo señalado por Carson (1982) sobre que las poblaciones insulares de una especie que esté ampliamente distribuida (en su caso Drosophila) pueden ser, por lo menos, tan polimórficas como las poblaciones continentales, teniendo, por tanto, el mismo valor evolutivo las poblaciones insulares y continentales. Como hemos podido observar las poblaciones insulares de M. comosum presentan, en general, ambas ordenaciones cromosómicas, y, aunque existen cambios en las frecuencias de ordenaciones, pensamos que estas diferencias se pueden deber al efecto fundador o bien, a una adaptación de la especie a las condiciones ambientales particulares (Carson, 1982).

### 6.3.2 Variabilidad génica

El análisis de la variabilidad génica para cuatro sistemas enzimáticos (ADH, GOT, IDH y GDH) lo hemos realizado en 18 poblaciones que se extienden desde Grecia, pasando por los países mediterráneos, hasta las Islas Canarias.

Un primer aspecto a resaltar, y que se puede deducir de la tabla 27, donde se recogen los distintos frecuencias génicas de cada uno de los locus en las 18 poblaciones analizadas, es que el alelo más frecuente en cada uno de ellos lo es generalmente en todas las poblaciones. Asimismo, hay que señalar que en aquellos loci que presentan un cierto grado de polimorfismo, tales como ADH-1, IDH, GOT-1 y GOT-3, éste se extiende, en general, a lo largo de toda el área geográfica analizada (Figs. 67, 68 y 69). Tal como se puede observar en dichas figuras las frecuencias alélicas de las distintas poblaciones presentan gran similitud aunque estén muy separadas, geográficamente.

Las medidas de variabilidad génica estimadas en M. comosum, A, P y H, recogidas en la tabla 29, nos muestran que dicha especie presenta una alta tasa de variabilidad. Concretamente, hemos encontrado que presenta un alto porcentaje de loci polimórficos, al nivel del .95. El valor de P a dicho nivel es de  $P=38.88 \pm 3.56$ , que es muy parecido al valor medio encontrado por Hamrick et al. (1979) en 113 especies vegetales de diversas características biológicas. De hecho, M. comosum presenta un nivel similar de variabilidad al de las especies con reproducción sexual (35.64%), al de las especies de amplia distribución geográfica (30.36%) y superior al de las especies con un periodo de vida intermedio (28.09%) (estos datos, en general, se calcularon con un número medio de loci superior al utilizado por nosotros para el cálculo de P en M. comosum, por lo que dichos datos pueden ser más representativos (véase Hamrick et al. 1979).

Asimismo, este valor de P es semejante al encontrado con especies de invertebrados ( 17.3% ) y superior al encontrado en vertebrados ( 39.9% ), Nevo (1978).

Como es lógico esperar, con el criterio del .99, este valor de P es mayor, obteniendo un valor de  $54.63 \pm 2.95$  (Tabla 29).

El número medio de alelos por locus es,asimismo,elevado:  $A=1.86 + .04$ . Este valor es muy parecido al encontrado por Hamrick et al. (1979) en su revisión ya citadas de 113 especies, siendo inferior al valor de A de especies de Gimnospermas ( $2.12 \pm .20$ ), pero muy parecido al de las Angiospermas ( $1.78 \pm .15$ ). En concreto, M. comosum presenta un nivel algo superior al de las especies de reproducción sexual ( $1.63 \pm .07$ ), al de las especies de amplia distribución geográfica ( $1.58 \pm .15$ ) y al de las especies de vida perenne intermedia ( $1.46 \pm .09$ ). Igualmente, estos datos fueron calculados, generalmente, para un número de loci superior al utilizado por nosotros (Hamrick et al. 1979).

Por lo que respecta al valor de la heterocigosidad génica observada (H), debemos señalar que dicho parámetro presenta gran heterogeneidad entre los loci estudiados. En la tabla 28, donde se recogen los valores de heterocigosidad observada en cada uno de los locus, podemos observar que es el locus ADH-1 el que presenta un valor más alto. Este locus no presenta valores menores de  $H=.50$  en ninguna población. Le siguen por orden decreciente de heterocigosidad los loci IDH, GOT-1 y GOT-3. Este último locus se presenta fijado en un número importante de poblaciones.

La heterocigosidad génica media en la poblaciones de M.comosum es de  $H=.16 \pm .007$  presentando todas ellas valores muy homogéneos (Tabla 29) entre sí. Dicho valor de H es similar al de las especies diploides pertenecientes al grupo de las Gimnospermas álogamas ( $H=.1578$ ), siendo ligeramente superior al de las especies de Angiospermas



álogamas ( $H=.1502$ ) y superior al de las especies autofecundantes ( $H=.056$ ) (véase tabla 46). Dicho valor es asimismo, superior al observado en especies de vertebrados e insectos, excluyendo las especies de Drosophila (tabla 46).

Es de resaltar que en aquellas poblaciones en las que la heterocigosidad cromosómica presenta valores bajos (véase tabla 12), no ocurre lo mismo en el caso de la heterocigosidad génica (Tabla 29). Concretamente, tal como se observa en la Tabla 12, las poblaciones de MOT, RAG, POA y COZ presentan valores de heterocigosidad cromosómica inferiores al resto de las poblaciones. Por el contrario, estas poblaciones presentan unos valores de heterocigosidad génica similares al resto de las poblaciones (Tabla 29). Por lo tanto, se puede decir que dichas poblaciones no sufren ningún tipo de restricción de variabilidad génica. Este mismo efecto observado en nuestro análisis, fué encontrado por Ruiz Rejón y Oliver (1981) en dos poblaciones españolas.

Dicho efecto podemos interpretarlo en el sentido de que los polimorfismos enzimáticos demuestran mayor uniformidad geográfica que los polimorfismos cromosómicos, observación confirmada a partir de los estudios de Ayala et al. (1971) González-Duarte et al. (1973); Powel, (1973); Saura y Lakovara (1978) (véase más adelante).

También, y como ya hemos señalado en resultados (véase apartado 5.2.4), hemos analizado conjuntamente las frecuencias cromosómicas y génicas que presenta M. comosum en las 18 poblaciones en que han sido estudiados simultáneamente ambos aspectos. Con ello hemos pretendido cuantificar la variabilidad genética total de M. comosum, con el mayor número de marcadores posibles.

Los resultados obtenidos para las diferentes medidas de variabilidad, se pueden observar en la tabla 36. El valor medio de la heterocigo-

sidad observada en M. comosum de  $H = .21 + .02$  que, como ya hemos comentado, es un valor elevado cuando se compara con otras especies de las mismas características biológicas (véase tabla 46). Este valor es bastante mayor que el observado en especies de invertebrados, siendo muy parecido al que presentan las diferentes especies de Drosophila (tabla 46). Hay que señalar que los valores de heterocigosidad recogidos en esta tabla solo se refieren a datos génicos.

Asimismo las otras dos medidas de la variabilidad genética,  $P$  y  $A$ , presentan en el conjunto de las poblaciones valores elevados (tabla 36).

En cuanto a los posibles causas del mantenimiento de esta alta variabilidad genética, pensamos que puede ser debida, en parte, a las características biológicas que dicha especie presenta. M. comosum es una especie con bulbo que puede vivir varias generaciones, es decir es una especie de vida media intermedia, que ocupa una amplia área de distribución geográfica, con un alto efectivo de población, su reproducción es de tipo sexual no presentando en la naturaleza reproducción asexual (Garbari, com. per.), es una especie alógama (Knoll, 1921; Perez et., 1981; López Alonso, 1984) siendo polinizada por insectos. También presenta una alta fertilidad.

Todos estos factores biológicos pueden contribuir al mantenimiento de una alta tasa de variabilidad génica, como ocurre en otras especies que presentan tales características (Hamrick et al., 1979).

En las especies que reúnen estas características, la deriva es un factor que ejerce poca influencia, al ser el tamaño poblacional muy grande, por tanto la especie es capaz de retener gran cantidad de variabilidad genética. Esta variabilidad podría estar mantenida en parte por selección.

Otro posible factor que ha podido influir sobre el alto valor de variabilidad génica que presenta M. comosum, es el efecto que sobre esta especie haya podido causar la acción humana, ya que M. comosum es una especie sinantrópica (ocupa terrenos influenciados por el cultivo), siendo algunas veces cultivada.

De todo lo anteriormente expuesto podemos concluir que M.comosum es una especie vegetal que presenta una alta tasa de variabilidad genética, que puede estar producida por las características biológicas que dicha especie presenta. Asimismo, esta variabilidad podría estar mantenida por selección, como discutiremos posteriormente.

#### 6.4 Diferenciación geográfica en M.comosum

##### 6.4.1 Diferenciación cromosómica entre las poblaciones de M. comosum analizadas

El primer aspecto a destacar es la distribución universal que presentan ambas ordenaciones cromosómicas (inversión y segmento) en el área geográfica analizada, aunque existen algunas diferencias entre las frecuencias de las distintas poblaciones (Tabla 11 y Figs. 31 y 32).

El estadístico  $F_{ST}$  puede utilizarse como medida de la variabilidad entre poblaciones para la inversión y el segmento, ya que representa la varianza interpoblacional de las frecuencias de cada ordenación. Dicho estadístico presenta valores, para ambas ordenaciones, que indican que existe cierto grado de diferenciación entre las poblaciones de M.comosum (Tabla 15). Asimismo, el valor medio de  $F_{ST}=0.08$ , nos indica que el grado de heterogeneidad cromosómica interpoblacional no es muy alto.

Dichos valores de  $F_{ST}$ , calculados a partir de frecuencias cromosómicas, no pueden compararse con otros resultados similares ya que, salvo en contadas ocasiones, dicho estadístico no se ha aplicado a otros casos de polimorfismos cromosómicos. Así, Wright (1978) encuentra que, para poblaciones de Drosophila pseudoobscura estudiadas por Dobzhansky y Epling (1944), el valor medio de  $F_{ST}$  es de .123, para seis reordenaciones distintas, concluyendo que dichas poblaciones se diferencian geográficamente entre sí. Aunque el valor del estadístico  $F_{ST}$ , calculado en M. comosum puede tener un menor valor informativo, al estar calculado solamente con dos ordenaciones distintas, podemos resumir que las poblaciones de M. comosum se encuentran menos diferenciadas geográficamente que las de Drosophila pseudoobscura.

Por el contrario, cuando se analizan las frecuencias de ambas ordenaciones en las distintas poblaciones por medio de un análisis de Ji-cuadrado de contingencia, sí se encuentra que existen diferencias significativas entre las poblaciones. Como se puede ver en la tabla 15 ambas ordenaciones presentan valores estadísticamente significativos. Se puede asegurar que las poblaciones de M. comosum se diferencian entre sí, debido a las frecuencias cromosómicas que presentan. A esta misma conclusión llegó García (1981) estudiando seis poblaciones de M. comosum de Sierra Nevada (Granada), no encontrando que existiese correlación entre la altitud y la frecuencia de inversión.

En especies de Drosophila se ha encontrado también que, las poblaciones donde existen diversas ordenaciones cromosómicas, se diferencian entre sí por las frecuencias de las distintas ordenaciones que presentan (Fontdevila et al. 1981, 1982; Shing, 1983).

Para aclarar, asimismo, la posible diferenciación existente entre poblaciones, hemos realizado un análisis mediante el índice de distancia

genética de Prevosti (1974). En la tabla 16 se recoge la matriz de distancia genética en las 22 poblaciones analizadas. El índice de distancia medio entre las poblaciones de M.comosum es de  $D=.127 \pm .005$ . Este valor es ligeramente inferior al que se encuentra entre poblaciones de Drosophila buzzatti, del Nuevo y del Viejo Mundo (Ruiz, 1983)  $D=.177 \pm .005$ . Asimismo, Prevosti (1978) encuentra que, entre las poblaciones de Drosophila suboscuro de España y Marruecos, existe una distancia de  $D=.27 \pm .03$ , que es superior el encontrado en M. comosum.

En el dendrograma obtenido a partir de la matriz de distancia genética (Fig. 33), podemos observar que las 22 poblaciones se ordenan sin seguir un patrón geográfico. Sin embargo, es de destacar el agrupamiento formado por las poblaciones de LLUV y VAL, ambas de la isla de Mallorca, y que se diferencian del resto de las poblaciones.

También, tal como se observa en dicho dendrograma, existen varios agrupamientos que se diferencian del resto de las poblaciones. Así, podemos ver que existen dos agrupamientos, formado uno por las poblaciones de COZ, MOT, POA, RAG y SUR, y el otro por las poblaciones de POC, AVI, y MEN-1.

La representación factorial obtenida cuando se someten las frecuencias cromosómicas a un análisis factorial de correspondencias (Fig.34) coincide, en términos generales, con el dendrograma anterior, estableciendo los mismos grupos básicos. Así, podemos ver como el agrupamiento formado por las poblaciones de LLUV y VAL se diferencia del resto de las poblaciones, principalmente, por la alta frecuencia del segmento que ambas poblaciones presentan. El agrupamiento formado por COZ, MOT, POA, RAG y SUR se diferencia por las altas frecuencias de ordenación estándar que presentan dichas poblaciones. El agrupamiento formado por POC, AVI y MEN-1 se diferencia por la alta frecuencia de ordenación invertida que presentan.

Asimismo, como hemos señalado en el apartado de resultados, hemos realizado un análisis de diferenciación cromosómica entre las poblaciones analizadas en el presente trabajo con seis poblaciones de dos islas griegas, estudiadas por Bentzer y Ellmer (1975). La distancia genética media es de  $D = .123 \pm .004$ , que es muy parecida a la encontrada entre nuestras poblaciones (Tabla 19). El dendrograma obtenido (Fig. 35) a partir de la matriz de distancias genéticas, nos permite observar que las nuevas poblaciones se distribuyen en el conjunto de nuestra poblaciones sin seguir una ordenación geográfica. Los agrupamientos producidos entre poblaciones son muy parecidos a los encontrados en nuestra poblaciones. Esto mismo ocurre en el gráfico obtenido mediante el análisis factorial de correspondencias (Fig. 36).

A la vista de estos resultados podemos hacer las siguientes conclusiones:

1º) No existe ninguna clina de distribución geográfica para ninguna de las ordenaciones cromosómicas que presentan la segunda pareja de M. comosum. La existencia de clinas para las frecuencias de ordenaciones cromosómicas (principalmente inversiones) en diversas especies de Drosophila (Dobzhansky, 1949; Stalker y Carson, 1948; Brcinc, 1962; 1966; Knibb et al., 1981) se ha interpretado como prueba del posible valor adaptativo de estas ordenaciones. Prevosti (1978) señala que en Drosophila suboscuro las clinas latitudinales detectadas para las frecuencias de inversiones tienen valor adaptativo. En cambio las clinas Este-Oeste, y las radiales existentes en esta misma especie, las interpreta dicho autor como debidas a factores históricos.

En el caso de M. comosum, como ya hemos señalado, al existir ambas ordenaciones en toda su área de distribución han de poseer un origen muy antiguo, y al no existir clinas de distribución, pensamos que los poli-

morfismos cromosómicos de esta especie deben tener unas propiedades adaptativas que les permitan mantenerse en toda su área de distribución.

2º) Existe muy poca diferenciación entre poblaciones de distintas áreas geográficas. Esta observación nos confirma que los polimorfismos cromosómicos que presenta M. comosum han dado lugar a un sistema taponado frente a las variables ambientales y edáficas que debe soportar la especie en su amplia área de distribución.

En nuestro caso los motivos de diferenciación cromosómica entre las distintas poblaciones pueden ser varios, pudiendo ir desde factores históricos que hayan podido influir sobre la distribución de la especie y/o al efecto fundador (Prevosti, 1978). Asimismo, se puede pensar que los polimorfismos para ambas ordenaciones hayan podido jugar un papel importante en la adaptación de la especie a los diversos ambientes. De acuerdo con este último aspecto el mantenimiento del polimorfismo cromosómico en las poblaciones naturales se podría explicar en función de los diversos nichos ecológicos que la especie pueda ocupar (Dobzhansky et al 1950; Da Cunha et al., 1950; Da Cunha y Dobzhansky, 1954).

En este sentido, habría que señalar cómo las dos poblaciones de la isla de Mallorca se diferencian del resto de poblaciones debido a las altas frecuencias del segmento que dichas poblaciones presentan. Esta diferencia existente en poblaciones de islas, podría estar causada por los mecanismos ya señalados de la deriva o al efecto fundador. Esta posible interpretación estaría apoyada por la observación realizada por Bentzer y Ellmer (1975), de que las variaciones en la frecuencia de inversiones en ciertas poblaciones griegas se explican por la acción de la deriva.

Asimismo, nuestros datos sobre la inexistencia del segmento

cromosómico en poblaciones de islas como Ragusa (Sicilia) y en las dos poblaciones de Menorca (véase tabla 11), así como su presencia en las Canarias, indica que está actuando la deriva y/o el efecto fundador sobre las diferencias en la frecuencia del segmento.

Por otra parte, un segundo grupo de poblaciones que se diferencia del resto es el de aquellas poblaciones que presentan una baja frecuencia para la inversión y el segmento. En este tipo de poblaciones en el que existe un bajo nivel de heterocigosis cromosómica, como ya hemos señalado, no se produce un descenso en la heterocigosidad génica. Esta observación hace difícil la explicación del bajo valor del polimorfismo cromosómico en dichas poblaciones por efecto de la deriva genética.

Ruiz Rejón y Oliver (1981) explican que en aquellas poblaciones donde la variabilidad cromosómica es baja, como sucede en nuestras poblaciones, el mantenimiento del polimorfismo cromosómico, quizás se deba a efectos de adaptación a causas ambientales o edáficos especiales.

Estas poblaciones podrían ser del tipo señalado por Lewontin (1974) como marginales. Este autor define como poblaciones "marginales" aquellas en las que, temporalmente condiciones ambientales inestables, imponen una fuerte presión selectiva. Dichas poblaciones no tienen por qué coincidir con el borde geográfico de distribución de la especie, sino que pueden ser poblaciones de borde ecológico, donde las condiciones ambientales son adversas a la especie. En tal situación se necesitarían respuestas rápidas al efecto de la selección, lo que estaría facilitado por una mayor frecuencia de recombinación, que se obtendría al no haber individuos heterocigotos para ambas reordenaciones cromosómicas (Lewontin, 1974).



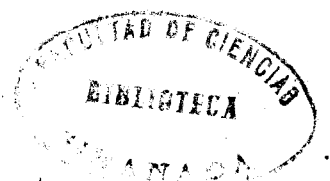
En nuestro caso, al descender las frecuencias de la inversión y del segmento, en estas poblaciones consideradas de borde ecológico, se favorecería la aparición de individuos homocigotos para la ordenación estandar. Estos individuos tal como se puede observar en la tabla 4 presentan una alta frecuencia de recombinación, lo que favorecería la aparición de nuevas combinaciones génicas.

Por tanto, en conclusión, podemos señalar que la distribución geográfica para los polimorfismos cromosómicos de M. comosum puede estar influenciada tanto por la actuación de la deriva, como por la acción de la selección.

#### 6.4.2 Diferenciación génica entre las poblaciones de M comosum

Dos son los aspectos que resaltan, por lo que se refiere a la variabilidad génica, en las poblaciones naturales de M. comosum. El primero de ellos es que para cada uno de los loci el alelo más frecuente lo es en todas las poblaciones. El segundo aspecto es que la mayoría de las poblaciones presentan, por lo general, los mismos alelos en todos los loci y en todas las poblaciones. Es decir, existe una gran homología entre las distintas poblaciones de M. comosum.

La diferenciación entre poblaciones la hemos cuantificado, en principio, mediante el estadístico  $F_{ST}$ , y un análisis de Ji-cuadrado. En la tabla 32 se recogen los valores de  $F_{ST}$ , calculados para cada uno de los loci polimórficos. Como se puede observar los valores individuales de  $F_{ST}$  para cada uno de los loci nos confirma, la alta similitud que existe entre las frecuencias génicas de las distintas poblaciones.



La media de  $F_{ST}$  en los cuatro loci analizados es de  $F_{ST} = .0465 \pm .003$ . Dicho valor, comparado con los obtenidos por otros autores en especies vegetales, nos confirma que existe gran homogeneidad entre las poblaciones de M. comosum (Tabla 45).

Los valores de  $F_{ST}$  de M. comosum son muy parecidos a especies vegetales de vida larga y gran flujo génico (Yeh y El-Kassaby, 1980; Yeh y O'Malley, 1980; Guries y Ledig, 1982; Dancik y Yeh, 1983) e inferiores a los de especies de vida anual o bianual con restricciones de flujo génico. Los altos valores de  $F_{ST}$  en algunas de las especies vegetales recogidas en la tabla 45, en general, son debidos a fenómenos de consanguinidad (Guries y Ledig, 1982).

Pero, al igual que ocurría en el caso de las distintas ordenaciones cromosómicas, cuando se realiza un análisis de Ji-cuadrado de contingencia para los distintos genes, los valores obtenidos nos indican que las poblaciones son diferentes entre sí (Tabla 31).

Asimismo, hemos realizado un análisis de la diferenciación entre las distintas poblaciones mediante los índices de distancia genética de Prevosti (1974),  $D$ , y el índice de distancia no sesgada de Nei (1978),  $\hat{D}$ .

El valor medio encontrado mediante el primero de los índices es de  $D = .07 \pm .002$ . El valor medio de identidad genética encontrada con el segundo de los índices es  $I = .992 \pm .001$ , y de distancia no sesgada  $\hat{D} = .008 \pm .002$ . Dichos valores son menores a los encontrados por otros autores, mediante el índice de distancia de Nei (1972),  $D$ , en especies vegetales como Lycopodium (Levin y Crepet, 1973) Lupinus y Hymenoppapus (Babbel y Se-

lander, 1974), pero son muy similares a las de algunas especies de pinos (Dancik y Yeh, 1983). También, mediante los dos índices de Nei I y D, Ayala y Kiger (1980) señalan que las poblaciones de una misma especie vegetal, en general, presentan un valor de  $I = .966 \pm .005$  y de  $D = .035$ . Como podemos observar, dichos valores presentan una ligera desviación respecto al encontrado en M. comosum, existiendo menor grado de diferenciación entre las poblaciones de nuestra especie. Los valores de identidad y diferenciación génica encontrados por nosotros son muy parecidos a los encontrados por (Pascual, 1983) en poblaciones de M. comosum España,  $D = .008$  y  $I = .992$ .

En los dendrogramas obtenidos a partir de la matriz de distancias génicas de Prevosti (1974) (Fig. 71) podemos observar cómo las 18 poblaciones analizadas se ordenan, al igual que ocurría para las frecuencias cromosómicas, sin seguir un patrón geográfico. Se puede observar sin embargo que existen algunos agrupamientos, que se separan del resto de las poblaciones, siendo de destacar que al igual que ocurría para los datos cromosómicos el agrupamiento formado por las poblaciones de LLUV y VAL, ambas de Mallorca, se separa también para los datos génicos del resto de las poblaciones. Otro agrupamiento que se puede considerar que se separa del resto de poblaciones es el formado por las poblaciones de BAC POB, POD, MEN-1 y MOY.

Estos mismos agrupamientos se vuelven a producir, cuando analizamos las frecuencias de los distintos alelos, mediante un análisis factorial de correspondencias (Fig. 74). Así, el agrupamiento formado por las poblaciones de VAL y de LLUV se diferencia del resto de las poblaciones, gracias a las altas frecuencias que presenta para el alelo a de la GOT-1, y de los alelos a y b de la ADH-1.

El segundo grupo de poblaciones formado por las de MEN-1, POB, MOY y BAC se diferencian del resto gracias a las altas frecuencias del alelo a de la IDH y del alelo d de la ADH-1.

Al igual que ocurría en el caso de las frecuencias cromosómicas, las variaciones detectadas entre las frecuencias génicas de algunas poblaciones, se podrían explicar por efecto de la deriva y/o el efecto fundador, o por adaptación a ciertas condiciones ambientales particulares de ciertas poblaciones. En este sentido, es interesante resaltar cómo en los dos análisis de diferenciación realizados (dendrogramas y factorial de correspondencias) las poblaciones de LLUV y VAL, se vuelven a separar del resto de las poblaciones debido a las frecuencias génicas que presentan para los alelos a de la GOT-1 y de los alelos a y b de la ADH-1, principalmente. Esta separación, similar a la que ya hemos citado para los datos cromosómicos, apoya la idea de que el efecto fundador ha podido jugar un importante papel en dichas poblaciones. Si el efecto fundador ha influido en la formación de dichas poblaciones, podríamos pensar que la asociación detectada entre el alelo a de la GOT-1 y el segmento es simplemente un hecho fortuito. Los primeros colonizadores de estas dos poblaciones presentarían una alta frecuencia del segmento y del alelo a de la GOT-1. También, podríamos pensar que la diferenciación que estas dos poblaciones presentan respecto del resto de las poblaciones analizadas, se ha producido como consecuencia de la adaptación a condiciones ambientales existentes en dichas poblaciones. De esta forma, la asociación entre el segmento y el alelo a de la GOT-1 podría tener valor adaptativo.

Dos son las conclusiones más importantes que podemos hacer a la vista de los resultados obtenidos, con respecto a la distribución geográfica de la variabilidad genética que presenta M. comosum. La primera es que, al igual que ocurría para las ordenaciones cromosómicas, las poblaciones de M.comosum no se diferencian altamente entre sí por las frecuencias génicas que presentan, y que tampoco presentan ningún patrón de diferenciación geográfico (véase Figs. 66, 67 y 68).

La segunda de las observaciones es que la diferenciación es mayor a nivel cromosómico ( $D=.127_{\pm}.005$ ) que a nivel génico ( $D=.07_{\pm}.002$  y  $D=.008_{\pm}.002$ ) (véanse tabla 16, 33, y 34). Esta observación de la mayor diferenciación entre poblaciones, debido a las frecuencias cromosómicas de las distintas ordenaciones que a las frecuencias génicas, ha sido también realizada en poblaciones naturales de D. suboscuro por Prevosti (1978). Dicho autor atribuye esta observación a que los polimorfismos enzimáticos se producen como consecuencia de las características adaptativas generales de la especie, y el polimorfismo cromosómico se produce como una adaptación a factores locales.

Para explicar la gran homogeneidad genética (cromosómica y génica) existente entre las poblaciones de M. comosum son varios los factores que se podrían aportar. Estos factores van desde factores históricos, hasta selectivos, pasando por el flujo génico y las características biológicas y factores ambientales del área en que vive la especie.

Atendiendo a los factores históricos, podríamos señalar como primera posibilidad la de que quizás, todas las poblaciones de M.comosum, se hubieran originado recientemente a partir de un corto número de individuos. Este origen sería factible si esta especie fuese ampliamente cultivada. Aunque existen evidencias de que en algunas regiones de Italia

se cultiva (Garbari com. per.), es muy difícil pensar que todas las poblaciones naturales de M. comosum se hayan podido originar de bulbos procedentes de dichos cultivos. En cambio, la acción directa del hombre ha podido tener influencia sobre la distribución de esta especie y sobre su patrón de variabilidad. El posible transporte de las semillas de M. comosum, como acompañante de las semillas agrícolas, favorecería la homogenización entre poblaciones, aún entre distancias largas.

Otra posibilidad que permitiría explicar la gran homogeneidad genética existente entre las poblaciones de M. comosum, es la característica que esta especie presenta de ir asociada a la actividad humana. Los biotopos que normalmente ocupa esta especie están influenciados por actividades agrícolas, lo que de alguna forma homogenizaría los distintos ambientes y las poblaciones que en ellos se puedan establecer.

Esta situación se parecería a la observada en especies animales que viven asociadas a la actividad humana como son Drosophila melanogaster (Eanes y Koehn, 1978; Wright, 1978; Knibb et al., 1981; Knibb, 1982) y Mus musculus (Wright, 1978). En el primer caso, el valor del índice de Diferenciación  $F_{ST}$  es muy parecido al existente entre poblaciones de poblaciones de M. comosum (.009). En el segundo caso, el valor de  $F_{ST}$  es casi el doble al observado en la especie estudiada por nosotros.

Un factor biológico que podría explicar la falta de diferenciación genética entre las poblaciones de M. comosum es la alta flexibilidad (plasticidad) fenotípica que dicha especie presenta (Benzert, 1972; Tutin et al., 1980). La plasticidad fenotípica puede permitir a los individuos una respuesta a las diferentes condiciones ambientales sin que se produzcan cambios en sus genotipos (Bradshaw, 1965).

Otra característica biológica que podría explicar la homogeneidad

existente entre las poblaciones de M.comosum es el gran tamaño efectivo de población que esta especie presenta. Esta característica no permitiría la actuación de la deriva genética, con lo cual no se producirían diferencias significativas entre poblaciones (Levin,1978)

Otro agente evolutivo que puede tener un papel homogenizador de las poblaciones es el flujo génico. El papel del flujo génico en la homogenización de las poblaciones naturales ha sido ampliamente discutido. Tradicionalmente se ha considerado al flujo génico como una fuerza capaz de neutralizar la posible acción diversificadora de la selección (Kimura y Maruyama, 1971). Sin embargo, este papel homogenizador ha sido criticado tanto por modelos teóricos como por comprobaciones experimentales (Edler,1973). Especies vegetales en las que se haya criticado el flujo genético como fuerza homogenizadora son Pinus ponderosa (Mitton et al ,1977; Linhart et al., 1981) y Hordeum spontaneum (Nevo et al.,1983), entre otras. Estas especies presentan un alto flujo génico, pero, sin embargo, presentan clinas para variantes aloenzimáticas.

En M. comosum, no hemos realizado medidas directas de la cantidad de flujo génico. Sin embargo, López Alonso (1984) mediante datos indirectos llega a la conclusión de que en esta especie no existen restricciones al flujo génico. Asimismo, este autor, al estudiar el grado de diferenciación geográfica intrapoblacional e interpoblacional, encuentra que ésta es mayor en el primer nivel que en el segundo. Este resultado nos indica que, aunque la actuación del flujo génico sería la de homogenizar las poblaciones a los dos niveles señalados, deben existir otros factores, selectivos o aleatorios que hagan que las poblaciones estén estructuradas internamente en demas, así como diferenciadas entre poblaciones.

Desde el punto de vista selectivo, podemos señalar que, el hecho de que no exista gran diferenciación entre las poblaciones analizadas, tal vez pueda indicar que la variabilidad genética que presenta M.co-

mosum, resulte de las características adaptativas de la especie (Pre-vosti, 1978). Como ya hemos señalado, M. comosum se desarrolla en ambientes espacial y temporalmente homogéneos (habitats generalizados). En esta situación puede resultar ventajoso para una especie limitar hasta cierto grado su variabilidad, de modo que únicamente se produzcan los fenotipos que estén bien adaptados. Esta situación se consigue mediante selección equilibradora.

#### 6.4.3 Características adaptativas de la variabilidad genética de M. comosum

Como ya hemos señalado en apartados anteriores, M. comosum presenta una alta variabilidad genética (cromosómica y génica) en las poblaciones de su área de distribución. Asimismo, hemos podido constatar como, aunque existen diferencias entre poblaciones, esta variabilidad genética es bastante uniforme en el área de distribución de la especie. Como se ha mencionado en los apartados anteriores, el mantenimiento de la variabilidad genética que presenta M. comosum, y su distribución uniforme, puede ser debida, en parte, a la interacción de factores biológicos, junto a la acción de la deriva génica y el flujo génico. Entre los factores biológicos que esta especie presenta, y que pueden contribuir a mantener su alta variabilidad y su distribución tan uniforme, podemos señalar: el alto efectivo de población, el periodo de vida intermedio, la reproducción alógama, la alta flexibilidad fenotípica, así como la alta tasa de flujo genético.

De todas formas cabría preguntarse qué parte de la variabilidad genética que presenta M. comosum, es debida a la acción de la selección natural, así como, hasta qué punto la uniformidad en la distribución de la variabilidad genética de esta especie es adaptativa. O, dicho de otra forma, hasta qué punto está relacionada la variabilidad genética



que presenta M. comosum, en su cantidad y su distribución, con el ambiente en que vive.

Son varias las observaciones que nos hacen pensar que la selección natural puede actuar en el mantenimiento y la distribución de los polimorfismos (cromosómicos y génicos) existentes en M. comosum. Algunas de ellas ya se han mencionado en partados anteriores de la discusión.

Aquí diremos, por lo que se refiere a la inversión, que en la mayoría de las poblaciones el estadístico  $F_i$  presenta valores negativos (tabla 13), lo que se puede tomar como evidencia de un exceso de individuos heterocigotos en las poblaciones. Asimismo, los estadísticos  $F_{IS}$  (calculado a partir de los valores de  $F_i$  poblacionales) y  $F_{IT}$  (calculado a partir de la suma total de individuos analizados) reflejan un ligero exceso de individuos heterocigotos, al tomar valores negativos (tabla 15).

La significación de los índices de fijación se obtiene por los correspondientes test de bondad de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg. Como podemos ver en la tabla 14 los valores de Ji-cuadrado o  $T_s$  de Student, en su caso, no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a las frecuencias de equilibrio. Nuestros datos coinciden para esta misma ordenación, con los encontrados por Bentzer (1972), Bentzer y Ellmer (1975), Ruiz Rejón y Oliver (1981) García (1981).

La aparente contradicción entre los valores de los índices de fijación y los valores de los estadísticos empleados para determinar el ajuste a las frecuencias de equilibrio de la inversión puede explicarse por varias razones: 1ª) la varianza de  $F_i$  es máxima en el intervalo  $0 > P > 0.3$ , que es justamente el intervalo de las plantas alógamas como

es M. comosum, y de ahí la notable insensibilidad del test de Ji-cuadrado para detectar desviaciones significativas (Brown,1979). 2ª) Se requieren grandes tamaños muestrales para detectar desviaciones significativas para valores de F importantes (Cavalli-Sforza y Bodmer,1971).

La conclusión más importante es que las poblaciones de M. comosum analizadas se encuentran en equilibrio de H-W para la inversión. Sin embargo existe un exceso de individuos heterocigotos detectado mediante los estadísticos  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  de Wright. Este exceso, de individuos heterocigotos no puede ser detectado mediante un análisis de Ji-cuadrado por las razones expuestas. Este exceso de heterocigotos podría estar producido por heterosis.

Son numerosos los casos en los que se ha sugerido la heterosis como mecanismo de mantenimiento de polimorfismos cromosómicos de inversiones. Así, en Drosophila son muchos los casos aportados de la existencia de heterosis, o mayor valor adaptativo de los heterocigotos (Dobzhansky y Pavlosky, 1955; Stalker,1976; Risch,1971; Stalker,1976; Watanabe y Watanabe,1977; Yu y Spies,1978). La heterosis ha sido citada también como mecanismo de mantenimiento de polimorfismos para inversiones en otras especies de Dípteros (Butlin et al., 1978; Collins et al., 1978).

En especies de Ortópteros, también ciertos polimorfismos descritos para inversiones pericéntricas muestran un exceso de individuos heterocigotos, como ocurre en Trimerotropis gracilis (White, 1958) Moraba scurra (Lewontin y White, 1960) y Oedaleonotus enigma (Hewitt y Schroeter,1968), En estos casos, el polimorfismo se mantiene por ventaja selectiva de los heterocigotos.

En plantas, también se ha señalado la existencia de un posible caso de ventaja heterótica para una inversión pericéntrica existente en una especie del género Cyrtanthus (Ising,1969).

Otra posible evidencia del posible valor adaptativo de las inversiones y de las reordenaciones cromosómicas, en general, es la demostración de que éstas son portadoras de supergenes que confieren a los individuos que las presentan mayor valor adaptativo (Dobzhansky et al. 1980).

Las inversiones, debido a su efecto supresor de la recombinación en los individuos heterocariotípicos, pueden ser un mecanismo de formación de bloques de genes que se heredan como una unidad. Si bajo ciertas condiciones ambientales se produjese la sobredominancia de uno, varios o muchos de los loci contenidos en la inversión, se podría explicar de esta forma el mantenimiento de la inversión en las poblaciones (Dobzhansky, 1949, 1950).

La inversión pericéntrica detectada en la segunda pareja de M. comosum, produce la supresión total de la formación de quiasmas en las posiciones b y c, que están incluidas en la zona cromosómica afectada por la inversión (Tabla 4).

En el análisis realizado respecto de la asociación entre la inversión y los diferentes electromorfos de los cuatro loci estudiados hemos encontrado que existe una fuerte asociación entre la ordenación estandar y el electromorfo d de la ADH-1, y entre la ordenación invertida y el electromorfo c de este mismo isoenzima (Tabla 40).

Las asociaciones observadas no son absolutas. Ambos alelos pueden aparecer en una u otra ordenación. También hay que resaltar que esta asociación ocurre a lo largo de todo el área de distribución de la especie, y que se produce en todas las poblaciones en el mismo sentido. En la tabla 43 podemos observar que los valores de Ji-cuadrado, en algunas de las poblaciones alcanzan valores significativos.

En la naturaleza, son numerosos los casos de asociación no al azar entre inversiones cromosómicas y electromorfos de determinados isoenzimas, sobre todo en especies de Dípteros (Prakash y Lewontin, 1968; Langley, et al., 1974; Mukai y Volker, 1977; Prevosti, 1978; Loukas et al., 1979; Day et al., 1982). Esta asociación ha sido interpretada como evidencia de coadaptación de los loci incluidos en la reordenación cromosómica (Prevosti, 1957; Prakash y Lewontin, 1968). Pero el caso más claro de coadaptación es el observado por Fontdevila et al., (1983) en Drosophila suboscuro.

Nosotros pensamos que la asociación encontrada entre ambas ordenaciones y los dos electromorfos de la ADH-1 puede tener un posible valor adaptativo, existiendo varias razones que apoyan esta interpretación:

La primera es la posible existencia de ventaja heterótica para la reordenación invertida, y los electromorfos de la ADH-1, que vendría indicada por los valores negativos que tanto la inversión como el locus ADH presentan en la mayoría de las poblaciones para el estadístico  $F_i$  (tablas 15 y 34).

La segunda de las razones es el hecho de que la asociación se produzca en el mismo sentido en todas las poblaciones, como ya hemos indicado. Las asociaciones que se producen a lo largo de toda el área geográfica de una especie, son interpretadas como prueba de la existencia de selección (Lewontin, 1974). Son varios los casos que se han señalado en las que dicho tipo de asociación se produce, en todo el área de distribución de la especie; entre otros podemos señalar los encontrados por Zouros et al., (1974); Prevosti, (1978); Fontdevila et al., (1978), Fontdevila et al., (1979); Charleworth et al., (1979); Loukas et al., (1979); Day et al., (1982).

Por último, otro aspecto que puede indicar el valor adaptativo de

los polimorfismos cromosómicos para inversiones es la observación de clinas asociadas a factores ambientales en su distribución geográfica. En este sentido se han interpretado numerosos casos de clinas para las frecuencias de inversiones en varias especies de Drosophila (Stalaker y Carson, 1948; Brcinc, 1962, 1966; Ward et al., 1974; Pinsker et al., 1978; Knibb et al. 1981). De la misma forma se interpretan las clinas latitudinales de Drosophila suboscuro (Prevosti, 1978). En cambio este mismo autor ha interpretado las clinas Este-Oeste y la radiales, existentes en la misma especie, como debidas a factores históricos.

En el caso de M. comosum, como hemos podido comprobar, la distribución geográfica de la inversión no presenta ningún patrón geográfico. Pero, al mismo tiempo, se puede observar que dicha ordenación se presenta en todas las poblaciones del área analizada, existiendo pocas diferencias entre sus frecuencias. Esta homogeneidad en la distribución de la inversión, puede venir provocada por la gran estabilidad y homogeneidad del ambiente en que ésta especie se desarrolla. Esta circunstancia puede favorecer el mantenimiento de la inversión en las poblaciones. Otra posible explicación alternativa es la de que la inversión puede tener cierto valor adaptativo que le permita establecerse en las poblaciones de forma polimórfica. Las diferencias existentes entre las poblaciones se deberían o bien a efectos de deriva genética o/y efecto fundador, a efectos históricos, o a adaptaciones a condiciones ambientales especiales.

En relación con el posible valor adaptativo de la inversión habría que señalar que en M. comosum, aparentemente, no se cumple la regla de Carson (1955) de distribución de inversiones en las poblaciones naturales. De hecho en las poblaciones, que teóricamente deberían de ser de borde geográfico (Portugal, Islas Canarias) la frecuencia de individuos heterocigotos para la inversión es muy alta. Esta alta frecuencia de in-

dividuos heterocigotos se podría explicar en el sentido de que dichas poblaciones aunque pueden ser de borde geográfico, no reúnen las condiciones necesarias para ser de borde ecológico. Sin embargo existen otras poblaciones tales como, COZ, MOT, RAG, POA y SUR que, presentando una baja frecuencia de heterocigotos, sí se podrían considerar como de borde ecológico. En dichas poblaciones, como ya hemos comentado, aunque se produce un descenso en el polimorfismo cromosómico, no se produce un descenso en la variabilidad génica, lo que está a favor de la actuación de la selección en dichas poblaciones (al menos sobre las ordenaciones cromosómicas).

Asimismo, y tal como ha encontrado López Alonso (1984) en su estudio realizado en tres poblaciones de M. comosum, el grado de diferenciación entre demos de una misma población, es mayor que la diferenciación entre poblaciones. Este hecho puede indicar la existencia subambientales intrapoblacionales. En este sentido se podría argumentar que la inversión se puede mantener por un proceso de anidación, producido intrapoblacionalmente. Esta observación no ha sido comprobada con datos experimentales.

Por lo que respecta al polimorfismo para el segmento supernumerario en la tabla 13 podemos observar que el estadístico  $F_i$  presenta valores negativos en la mayoría de las poblaciones en las que éste ha sido detectado. Igualmente, los estadísticos  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ , en el conjunto de las poblaciones, presentan valores negativos. Estas tres observaciones nos indican que en la mayoría de las poblaciones existe un exceso de individuos heterocigotos para el segmento (tabla 15).

Los valores de bondad de ajuste obtenidos mediante un test  $T_s$  de Student para frecuencias normalizadas se presentan en la tabla 14.

En principio y debido a su baja frecuencia se podría pensar que hay una baja probabilidad de encontrar individuos homocigotos para

dicha ordenación. Pero como se indica en la tabla 11, al menos en una población, (LLUV), la frecuencia del segmento es lo suficientemente alta, como para esperar que se produjesen individuos homocigotos. Efectivamente, cuando se aplica un análisis de  $T_s$  de Student para frecuencias normalizadas, en dicha población se encuentra que existe un defecto significativo de individuos homocigotos (Tabla 14).

Esta misma observación ha sido realizada igualmente por Ruiz Rejón y Oliver (1981) en dos poblaciones españolas. Este mismo defecto se presenta en una población griega analizada por Bentzer (Ruiz Rejón y Oliver, 1981).

Estos datos parecen señalar que los individuos homocigotos para el segmento supernumerario pueden estar seleccionados desfavorablemente.

En poblaciones naturales de saltamontes donde ha sido detectada la presencia de segmentos supernumerarios de forma polimórfica y se han estudiado un número suficiente de individuos, se ha demostrado que dichas poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (Chou y Kuan, 1965; Hewitt y John, 1968, Westerman y Fontana, 1973; Westerman, 1975; Dearn, 1977; Gosálvez y Lopez-Fernandez, 1981; Santos y Giraldez, 1982). También, han sido detectadas poblaciones naturales donde se ha observado un exceso de homocigotos (Hewitt y John, 1970; Schroeter, 1970; Fernandez Piqueras et al., 1984). En el caso de Chorthippus parallelus, analizado por Hewitt y John (1970), dicho exceso se atribuye a efectos de consanguinidad. También se ha observado que en numerosos casos existen diferencias en la frecuencia de los segmentos supernumerarios entre las distintas poblaciones de una especie, e incluso entre distintos puntos de una misma población (efecto Whalund) (Hewitt, 1979).

De la situación encontrada en M. comosum resaltan dos observaciones. Por un lado existe un deficit de individuos homocigotos para el segmento, que en algunos casos es estadísticamente significativo. Por otro lado hemos detectado mediante los estadísticos  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$ , que existe un exceso de individuos heterocigotos para el segmento. Esta situación nos haría pensar que la heterosis puede jugar un importante papel en el mantenimiento del segmento supernumerario en las poblaciones naturales.

Como ya hemos señalado (véase tabla 4) el segmento supernumerario de M. comosum, al igual que la inversión, suprime la recombinación en el brazo cromosómico portador de dicho segmento. Este efecto supresor favorece la formación de supergenes.

En el análisis realizado respecto de la asociación entre el segmento y los diferentes electromorfos de los loci variables estudiados hemos encontrado que existe una fuerte asociación entre el segmento en estado heterocigótico y el electromorfo a del isoenzima GOT-1.

Respecto de esta asociación habría que señalar que, aunque existe el posible efecto de producción de un supergen por el segmento al suprimir el entrecruzamiento, al ser poco frecuente el segmento en las poblaciones analizadas, es difícil explicar si la asociación es efectiva en toda el área geográfica analizada. Solamente en la población de LLUV (Mallorca), donde el segmento es muy frecuente, existe tal asociación, siendo además ésta población la que más contribuye al conjunto de datos. Por tanto, la asociación detectada podría deberse al efecto fundador y/o deriva genética (Ohta, 1982), que se ha podido producir en la población.

Otro dato que puede señalar la acción de la selección en el mantenimiento del segmento en forma polimórfica en las poblaciones naturales de M. comosum es el hecho de que presenta una amplia distribución geográfica. Aunque ésta, no se ajusta a una clina, sin embargo, el segmento está



ampliamente distribuido en el área geográfica analizada (Tabla 11 Fig.32). Esta observación, además de señalar que, probablemente, su origen es muy antiguo (Prevosti, 1978), nos indica que el segmento puede conferir mayor poder adaptativo a los individuos portadores.

Otra posible evidencia a favor de la actuación de la selección en el mantenimiento de ambos polimorfismos cromosómicos, es la existencia de desequilibrio de ligamiento entre ellos (Lewontin, 1974). Tal como se puede observar en la tabla 21, la distribución de ambas reordenaciones no es al azar, sino, que existe un exceso de cromosomas invertidos portadores de segmento. A partir de los datos de esta tabla hemos realizado un cálculo del desequilibrio de ligamiento existente, encontrando un valor de  $d=.17$ . Dicho cálculo lo hemos realizado por el método dado por Ayala y Kiger (1980), y este valor representa un alto índice de ligamiento cuando se compara con otros estudios similares (Knibb, 1981).

La asociación no al azar entre diferentes inversiones existentes en distintas especies de Drosophila ha sido señalada como prueba de la acción de la selección (Levitan, 1955; Stalker, 1976; Inoue y Watana-be, 1976; Alahiotis et al., 1976).

Esta posible interpretación adaptativa, en nuestro caso debemos de tomarla con precaución. pues, como ya hemos señalado, el segmento ha sido detectado mayoritariamente en dos poblaciones, con lo cual se podría producir un posible efecto fundador.

De todas formas, es interesante la observación realizada pues, como tanto la inversión como el segmento suprimen la recombinación cromosómica por separado, ambos pueden producir la formación de supergenes. Al ir simultáneamente juntas ambas ordenaciones en un mismo cromosoma, (il), este efecto es mucho más amplio, con lo cual se puede producir un ligamiento mayor.

En nuestro análisis realizado sobre la variabilidad genética existente en M. comosum, hemos detectado que esta especie presenta una alta tasa de variabilidad genética, así como una alta similitud genética entre las distintas poblaciones (Tablas 33 y 34).

Del análisis realizado mediante el estadístico  $F_i$  en cada una de las 18 poblaciones analizadas para los loci con mayor grado de variabilidad (ADH-1, GOT-1, GOT-3 e IDH) (Tabla 30), podemos obtener dos conclusiones:

1º) Los valores del estadístico  $F_i$  para cada locus, muestran una gran heterogeneidad entre poblaciones. 2º) Los loci ADH-1 y GOT-3 (en este caso en aquellas poblaciones donde es variable) presentan, mayoritariamente, valores negativos. Esta última observación nos indicaría la existencia de un exceso de individuos heterocigotos en ambos loci. También estos dos loci presentan valores negativos para los estadísticos  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$  (Tabla 32), lo que viene a confirmar que existe un exceso de individuos heterocigotos.

Sin embargo, tal como se puede observar en la tabla 31, cuando se realiza un análisis estadístico para comprobar el grado de significación del exceso de individuos heterocigotos, se encuentra que, en general, todas las poblaciones se encuentran en equilibrio de H-W, tanto para los loci ADH-1 y GOT-3 como para los loci IDH y GOT-1.

Solamente existen algunas excepciones a esta norma general, como son las poblaciones de Portugal D (POD) para la ADH-1, y la población Portugal B (POB) para el locus IDH, pudiéndose asegurar que dichas desviaciones puede ser debida a efectos de deriva.

Como ya hemos señalado para el caso de la inversión, estos valores aparentemente contradictorios pueden ser interpretados como lógicos por varias razones ya dichas en la inversión (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1971; Brown, 1979).

En la bibliografía son numerosos los casos en que se han señalado que las variantes isoenzimáticas presentan características adaptativas (Lewontin y Hubby, 1966; Ayala y Powell, 1972; Ayala et al., 1974; Schaal y Levin, 1976; Clegg et al., 1978; Nevo et al., 1981; Wills, 1981).

Asimismo, son también numerosos los casos en los que se ha invocado la teoría neutralista para explicar el mantenimiento de los polimorfismos enzimáticos (Kimura, 1968, 1969, 1982; Kimura y Ohta, 1974).

En nuestro caso pensamos que, al menos en el caso del locus ADH-1, la variabilidad genética puede presentar valor adaptativo. Una observación que puede apoyar esta hipótesis es el exceso de individuos heterocigotos, detectados mediante los estadísticos F de Wright.

Otra posible evidencia de la acción de la selección en el mantenimiento del polimorfismo en el locus ADH-1 puede venir dada por la asociación que presentan dos alelos de dicho locus con las ordenaciones cromosómicas estandar e invertida de la segunda pareja del cariotipo (tabla 40).

Pensamos que esta asociación puede estar mantenida por la actuación de la selección, basándonos para ello en dos observaciones: 1ª) la asociación se produce en el mismo sentido en toda el área geográfica. 2ª) La posible ventaja heterótica observada, tanto para la inversión como para el locus ADH-1, lo que viene indicado por los valores negativos que ambos presentan para los estadísticos F de Wright.

Todas estas observaciones realizadas sobre el posible valor adaptativo de la variabilidad genética de M. comosum son pruebas indirectas y se deben interpretar con precaución, pues como señala Lewontin (1984): "si se reúnen los elementos históricos y la variabilidad del ambiente y de la fisiología, cualquier diferencia puede reputarse adaptativa.

Por lo tanto, hay que valorar con cuidado estos resultados no corroborados por datos reales de supervivencia y reproducción".

Esto es algo que nos proponemos realizar en estudios posteriores en el caso de M. comosum, una vez analizada la naturaleza de la variabilidad cromosómica y génica existente en esta especie, así como el patrón de distribución geográfica de la variabilidad genética, aspectos ambos que nos propusimos analizar en este trabajo, y que nos parecen previos al de profundizar en los efectos que las variantes genéticas de la especie pueden tener sobre la supervivencia y reproducción.

RESUMEN  
Y  
CONCLUSIONES

Tras el análisis citogenético y electroforético conjunto que hemos llevado a cabo en 23 poblaciones naturales de M. comosum L. (Liliaceae), podemos llegar a las siguientes conclusiones:

PRIMERA: Muscari comosum presenta dos tipos de mecanismos de variabilidad cromosómica. El primer tipo está constituido por varios fenómenos (cromosomas accesorios, aneuploidía, poliploidía) que ocurren en baja frecuencia. El segundo tipo de mecanismos de variabilidad cromosómica de M. comosum está constituido por dos polimorfismos estructurales que presenta la segunda pareja en todas (o casi todas) las poblaciones analizadas, y que originan la presencia de los tipos cromosómicos +, i, +1 e il.

SEGUNDA: Los polimorfismos cromosómicos debidos a cambios de la posición del centrómero en la segunda pareja del cariotipo de M. comosum, con toda probabilidad, son debidos a una inversión pericéntrica. Son datos que apuntan en este sentido los siguientes:

- 1º El apareamiento recto en la zona afectada de los individuos heterocigotos.
- 2º La supresión total de quiasmas dentro de la zona de la inversión
- 3º Las segregaciones anafásicas compensadas.
- 4º La influencia de la reordenación en la formación de quiasmas en otros bivalentes del complemento.

TERCERA: Los polimorfismos cromosómicos debidos a diferencias de longitud en la segunda pareja son debidos, muy probablemente, a la presencia de un segmento cromosómico supernumerario, relicto de un cromosoma ancestral más largo. Son datos que apuntan en este sentido:

- 1º Su naturaleza eucromática.
- 2º Su comportamiento meiótico en heterocigosis, que está caracterizado o bien por una asociación terminal quiasmada, o bien por una ausencia de sinapsis y de quiasmas. Estos comportamientos dan lugar a segregaciones anafásicas reduccionales, en todos los casos .

CUARTA: Tanto la inversión como el segmento ejercen efectos diversos sobre el patrón de formación de quiasmas. Así, la inversión ejerce un efecto supresor sobre la formación de quiasmas en la propia segunda pareja y en la primera. Debido a ello los individuos heterocigotos para la inversión presentan unas medias de quiasmas menores que los individuos homocigotos. Por lo que se refiere al segmento, suprime la formación de quiasmas intersticiales en el brazo portador de segmento de individuos heterocigotos, así como hay un descenso en la formación de quiasmas en la primera pareja de individuos portadores de segmento. Debido, asimismo, a estos efectos los individuos portadores del segmento presentan unas medias de quiasmas menores que los individuos no portadores.

QUINTA: Como consecuencia del efecto supresor que ejercen tanto la inversión como el segmento sobre la formación de quiasmas, se puede producir la formación de supergenes. En nuestro análisis hemos detectado que existe asociación no al azar entre las ordenaciones cromosómicas y determinados alelos isoenzimáticos. Así, el alelo c del locus ADH-1 presenta asociación con la ordenación cromosómica invertida, y el alelo d de este mismo locus presenta asociación con la ordenación cromosómica estándar.

estandar. Esta asociación ocurre en el mismo sentido en toda el área geográfica analizada. Por otra parte, en los individuos heterocigotos para el segmento se ha detectado una alta frecuencia del alelo a del locus GOT-1. Esta asociación puede estar originada por un efecto de fundador, pues, solamente, ocurre en la población de Lluví localizada en la Isla de Mallorca.

SEXTA: Tanto la inversión como el segmento están ampliamente extendidos y presentes en las 23 poblaciones analizadas (aunque el segmento falta en algunas de ellas). La heterocigosidad media para la inversión es alta  $H = .43 \pm .04$ . La heterocigosidad media para el segmento es menor  $H = .08 \pm .02$ . La heterocigosidad global (a partir de los datos de la inversión y el segmento) es, asimismo alta  $H = .258 \pm .05$

SEPTIMA: El análisis de la variabilidad génica que presenta M. comosum para seis loci enzimáticos (ADH-1, IDH, GOT-1, GOT-2, GOT-3 y GDH) en 18 poblaciones, indica que M. comosum es una especie con alto grado de variabilidad genética:  $A = 1.86 \pm .04$ ;  $P(.95) = 38.88 \pm 3.56$  y  $H = .16 \pm .007$ . Cuando, para calcular estos parámetros, se consideran la inversión y el segmento como dos loci génicos dialélicos, los valores siguen siendo altos:  $A = 1.87 \pm .03$ ,  $P(.95) = 44.44 \pm 2.98$  y  $H = .21 \pm .02$ .

Son varios los factores que pueden influir en el mantenimiento de la alta tasa de variabilidad genética que presenta M. comosum. Entre ellos señalaremos:

Determinadas características biológicas que esta especie presenta, como son: su alto tamaño efectivo de población, su amplia distribución geográfica, que presenta un periodo de vida medio intermedio, su tipo



de reproducción exclusivamente sexual en poblaciones naturales, siendo, además, una especie alógama, así como el que presente una alta fertilidad.

La acción humana también ha podido influir en el mantenimiento de la alta variabilidad genética presente en M. comosum, ya que es una especie sinantrópica (ocupa terrenos influenciados por cultivos). Al homogenizar el hombre los ambientes en que esta especie se desarrolla, ello le permitiría el mantenimiento de una alta variabilidad génica.

La selección natural también puede contribuir en el mantenimiento de esta alta tasa de variabilidad génica.

OCTAVA: Por lo que se refiere a las frecuencias de la inversión y del segmento, la diferenciación geográfica que presentan las poblaciones de M. comosum, es escasa. Los valores de los estadísticos utilizados para cuantificar esta diferenciación son bajos  $F_{ST} = .08$  y  $D = .127 \pm .005$ . Mediante un análisis factorial se pone de manifiesto que los factores que más diferencian las poblaciones son la frecuencia del segmento, así como la frecuencia de la ordenación invertida. Asimismo hemos comprobado que no existe ningún patrón de distribución geográfico para ambas ordenaciones, no existiendo por tanto clinas.

Sin embargo, existen dos grupos de poblaciones que presentan unas frecuencias cromosómicas diferentes del resto de las poblaciones. La diferenciación producida en el primer grupo, constituido por las dos poblaciones de la Isla de Mallorca, Lluví y Valldemosa, podría deberse a efectos de deriva genética y/o efecto fundador. El segundo grupo de poblaciones está integrado por aquellas poblaciones que presentan una baja frecuencia para la inversión y el segmento (Cozviyar, Motrilejo, Portugal A, Ragusa y Santa Ursula). Estas poblaciones en las que existe

un bajo nivel de heterocigosidad cromosómica, no presentan sin embargo, un descenso en la heterocigosidad génica, pudiendo ser poblaciones de borde ecológico, y por tanto el descenso en la heterocigosidad cromosómica puede tener valor adaptativo.

NOVENA: La diferenciación geográfica existente entre poblaciones de M. comosum, debida a las frecuencias de los alelos de los distintos loci analizados, es menor que la detectada mediante los datos cromosómicos presentando unos valores de  $F_{ST} = .0465$  ;  $D = .07_{\pm} .002$  y  $\hat{D} = .08_{\pm} .002$ . En el análisis factorial realizado se pone de manifiesto que los factores que más diferencian las poblaciones entre sí son la frecuencia del alelo a de la GOT-1, así como las frecuencias de los alelos a de la IDH y d de la ADH-1. Asimismo debemos señalar que ninguno de los loci analizados, presenta ningún patrón de distribución geográfico, no existiendo clinas geográficas.

Sin embargo, dos poblaciones Lluví y Valldemosa, se diferencian del resto de las poblaciones, debido principalmente a las altas frecuencias que presentan ambas de los alelos a de la GOT-1, y a y b de la ADH-1. Esta diferenciación producida a nivel génico, junto a la que ya hemos señalado que ocurre a nivel cromosómico en estas mismas poblaciones, apoya la idea de que el efecto fundador ha podido tener un importante papel en el origen de ambas poblaciones.

DECIMA: Son varios los factores que se pueden invocar para explicar la gran homogeneidad genética (cromosómica y génica) existente entre las poblaciones de M. comosum. Estos factores van desde causas históricas hasta selectivas, pasando por el flujo génico y características biológicas de la especie, así como las características ambientales del área en que vive.

Entre los factores históricos, podríamos señalar la acción directa del hombre, al haber podido transportar las semillas de M.comosum como acompañantes de las semillas agrícolas, lo que favorecería la homogenización entre poblaciones.

De las características biológicas que M. comosum presenta, y que pueden explicar la falta de diferenciación genética entre las poblaciones, señalaremos su alta flexibilidad fenotípica, su gran tamaño efectivo de población y la existencia de flujo génico.

Desde el punto de vista selectivo, podemos señalar, que el hecho de que no exista gran diferencia entre las poblaciones de M. comosum puede resultar de las características adaptativas de esta especie. M. comosum se desarrolla en hábitats generalizados (zonas influenciadas por cultivos) lo que favorecería el que solamente aparecieran en las poblaciones determinados fenotipos bien adaptados a estas condiciones tan homogéneas. Esta situación se podría conseguir mediante selección equilibradora.

UNDECIMA: Son varias las observaciones que nos hacen pensar que la selección natural puede estar actuando en el mantenimiento y distribución de los polimorfismos cromosómicos y génicos existentes en M.comosum. Entre ellas podemos señalar:

1º Aunque la mayoría de las poblaciones aparecen, tanto para ambas ordenaciones cromosómicas como para los distintos loci analizados, en equilibrio de Hardy-Weinberg, sin embargo, mediante el análisis realizado mediante los estadísticos F de Wright, se detecta un exceso de heterocigotos, tanto para la inversión como para el segmento y el locus ADH-1. Estos excesos de individuos heterocigotos podrían estar producidos por heterosis.

2º La existencia de asociación no al azar entre las ordenaciones estandar e invertida y dos electromorfos del locus ADH-1. Esta asociación puede estar mantenida por selección, ya que se produce en toda el área geográfica en el mismo sentido, lo que puede indicar que dicha asociación puede tener cierto valor adaptativo.

3º La asociación no al azar entre el segmento, en estado heterocigoto y el alelo a del locus GOT-1. Esta asociación es significativa en las poblaciones de LLuví y Valldemosa en las que el segmento presenta una alta frecuencia, por lo que la asociación detectada también puede deberse a efecto fundador.

4º La existencia de poblaciones de borde ecológico en las que aunque se produce un descenso en el polimorfismo cromosómico, no se produce un descenso en la variabilidad génica. Esta observación está a favor de la actuación de la selección en dichas poblaciones al menos sobre las ordenaciones cromosómicas.

5º Existe un déficit de individuos homocigotos para el segmento, que en algunos casos es estadísticamente significativo.

6º Hemos detectado, mediante los estadísticos F de Wright, que existe un exceso de individuos heterocigotos para el segmento. Esta situación nos haría pensar que la heterosis puede actuar en el mantenimiento del segmento supernumerario en las poblaciones.

7º La existencia de desequilibrio de ligamiento entre la inversión y el segmento es otra posible evidencia de la actuación de la selección en el mantenimiento de los polimorfismos cromosómicos en las poblaciones.

DUODECIMA: La alta frecuencia de puentes y fragmentos cromosómicos que presenta la primera pareja de M. comosum, sobre todo, podemos explicarla como consecuencia de quiasmas erróneos en varias posiciones del cromosoma, siendo especialmente frecuentes en las zonas del brazo largo con bandas heterocromáticas.

BIBLIOGRAFIA

- ALAHOTIS, S.: MILLER, S.: y BERGER, E. (1977)  
Nature 269: 144-145
- ALLARD, R. W. (1975)  
Genetics 79s: 115-126
- ANTONOVICS, J. (1971)  
Am. Sci. 59: 593-599
- ANTONOVICS, J. y BRADSHAW, A. D. (1970)  
Heredity 25: 349-362
- ANDERSON, P. R. (1981)  
In Genetics Studies of Drosophila population. Edited by J.  
B. Gibson y J. G. Oakeshott. Australian National University  
Camberra Australis.
- ANDERSON, W. W.; OSHIMA, C.; WATANABE, T.; DOBZHANSKY, TH. y PAVLOSKY O.  
(1965)  
Genetics 58: 423-434
- ANDERSON, W. W.; DOBZHANSKY, TH.; PAVLOSKY, O.; POWELL, J. y YARDLEY, D.  
(1975)  
Evolution 29: 24-36
- AQUADRO, CH. F. y AVISE, J. C. (1982)  
Genetics 102: 269-284
- ASHLEY, T. (1979)  
J. Cell. Sci. 38: 357-367
- AYALA, F. J. (1965)  
Genetics 51: 527-554
- AYAJA, F. J. (1968)  
Science 162: 1453-1459

- AYALA, F. J. (1982)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 550-554
- AYALA, F. J. y KIGER, A. J. (1980)  
Modern Genetics. Benjamin/Cummings. California
- AYALA, F. J. y POWELL, J. R. (1972)  
Biochem. Genetics 7: 331-345
- AYALA, F. J.; y TRACEY, M. L. (1974)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 999-1003
- AYALA, F. J.; TRACEY, M. L.; BARR, L. G.; MCDONALD, J. F. y PEREZ SALAS, S. (1974)  
Genetics 77: 343-384
- AYALA, F. J. y VALENTINE, J. W. (1983)  
La evolución en acción. Editorial Alhambra.
- BABEL, G. R. y SELANDER, R. K. (1974)  
Evolution 28: 619-630
- BAKER, H. G. (1965)  
In Genetics of Colonizing Species. Edited by H. G. Baker y G. L. Stebbins. Academic Press, New York and London
- BARGIELLO, T y GROSSFIELD, J. (1979)  
Biosystems 11: 183-192
- BARNES, P. (1983)  
Genetics 105: 87-104
- BENNETT, M. D. (1982)  
In Systematic Association Special Vol. nº 20: Genome Evolution  
Edited by G. A. Dover and R. B. Flavell. Academic Press New York.
- BENZECRI, J. P. (1976)  
L'analyse des données. II L'analyse des correspondances. Ed. Dunot  
Paris.



- BENTZER, B. (1972)  
Bot. Notiser 125: 180-185
- BENTZER, B. (1972)  
Bot. Notiser 125: 406-418
- BENTZER, B. (1973)  
Bot. Notiser 126: 69-132
- BENTZER, B. (1974)  
Bot. Notiser 127: 69-86
- BENTZER, B. y ELLMER, H. (1975)  
Hereditas 81: 127-132
- BENTZER, B. y LANDSTROM, TH. (1975)  
Hereditas 80: 219-232
- BERGMAN, F. (1975)  
Silvae Genet. 24: 175-177
- BLOCK, K. (1976)  
Hereditas 84: 177-212
- BRADSHAW, A. D. (1965)  
Adv. Genet. 13: 115-155
- BRADSHAW, A. D. (1972)  
Evol. Biol. 5: 25-47
- BRADSHAW, A. D.; MCNEILLY, T. S.; GREGORY, R. P. G. (1965)  
Symp. Br. Ecol. Soc. 5: 327-343
- BRADSHAW, A. D.; CHADWICK, M. J.; JOWETT, D. y SNAYDON, R. W. (1971)  
J. Ecol. 52: 665-676
- BRADHAM, P. E. (1969a)  
Chromosoma 27: 216-225
- BRADHAM, P. E. (1969b)  
Heredity 69: 125-129

- BRADHAM, P. E. (1970)  
Heredity 25: 125-129
- BRADHAM, P. E. (1974)  
Chromosoma 47: 85-108
- BRADHAM, P. E. (1976)  
In Current Chr. Resch. Eds. K. Jones and P. E. Bradham. P.  
North Holland Amsterdam
- BRCINC, D. (1962)  
Choromosoma 13: 183-195
- BRCINC, D. (1966)  
Evolution 20: 16-29
- BRCINC, D. (1972)  
Univ. Texas. Publi. 7213: 103-116
- BRCINC, D. y BUDNIK, M. (1976)  
Evolution 30: 146-151
- BROWN, A. H. D. (1978)  
Theor. Pop. Biol. 15: 1-42
- BROWN, A. H. D.; FELDMAN; M. W. y NEVO, E. (1980)  
Genetics 96: 523-536
- BROWN, A. H. D.; MARSHALL, D. R. y MUNDAY, J. (1976)  
Austr. J. Biol. Sci. 29: 389-396
- BROWN A. H. D. y MORAN, G. F. (1979)  
Isozymes and the genetic resources of forest trees. Presented at  
the Symposium on Isozymes of North American Forest trees and Forest  
Insects. July 27, 1979 (Berkeley, California)
- BROWN, A. H. D. y ZOHARY, D. (1955)  
Genetics 40: 850
- BUNBERGERG DE JONG, C. M. (1957)  
Bibliog. Genetica 17: 111-228

- BUTLINS, R. K.; COLLINS, P. M.; SKEVINGTON, S. J. Y DAY; T. H. (1982)  
Heredity 48 (1): 45-55
- BUTLINS, R. K.; READ, I.L. y DAY, T. H. (1982)  
Heredity 49 (15): 51-62
- CAMACHO, J. P. M. y CABRERO, J. (1982)  
Caryologia 35 (5): 411-424
- CAMACHO, J. P. M.; CABRERO, J. y VISERAS, E. (1981)  
Genetica 56: 185:188
- CAMACHO, J. P. M.; VISERAS, E.; NAVAS, J. y CABRERO, J. (1984)  
Heredity 53 (1): 167-175
- CARSON, H. L. (1955)  
Biolo. 20: 276-287
- CARSON, H. L. (1958)  
Adv. Genet. 9: 1-40
- CARSON, H. L. (1982)  
Heredity 48 (1): 3-25
- CARSON, H. L. y HEED, W. B. (1964)  
Poc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 52: 427-430
- CAVALLI-SFORZA, L. L. y BODMER, W. F. (1971)  
The Genetics of Human Populations. Freeman San Francisco.
- CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D.; LOUKAS, M. y MORGAN, K. (1979)  
Genetics 93: 983-994
- CHOU, K. Y. y KUAN, C. (1965)  
Acta Entomol. Sinica 14: 1-6
- CLARKE, B. (1975)  
Genetics Suppl. 79: 101-113
- CLARKE, B. (1979)  
Proc. R. Soc. Lond. B 205: 453- 474

- CLEGG, M. T. y ALLARD, R. W. (1972)  
Proc Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69: 1820-1824
- CLEGG, M. T.; KIDWEEL, M. G. y DANIEL, N. J. (1978)  
Genetics 83: 793-810
- COLLINS, P. M. (1978)  
Ph. D. Thesis University of Nottingham.
- COLUZZI, M. (1972)  
Science 176: 59
- COLUZZI, M. SABATINI, A.; PETRARCA, V. D. y DECO, M. A. (1977)  
Nature 266: 832
- COUZIN, D.A. y FOX, D. P. (1973)  
Chromosoma 41: 421-436
- DA CUNHA, A. B.; BURLA, H. y DOBZHANSKY, TH. (1950)  
Evolution 4: 212-235
- DA CUNHA, A. B. y DOBZHANSKY, TH. (1954)  
Evolution 8: 119-134
- DA CUNHA, A. B.; DOBZHANSKY, TH.; PAVLOSKY, O. y SPASSKY, B. (1959)  
Evolution 13: 389-404
- DANCIK, B. P. y YEH, F. C. (1983)  
Can. J. Genet. Cytol. 25: 57-64
- DARLINGTON, S. D. (1963)  
Chromosomes Botany and the Origins of Cultivated Plants. Allen and Unwin London.
- DARLINGTON, C. D. y MATHER, K. (1949)  
The Elements of Genetics. Allen and Unwin London
- DARLINGTON, C. D. y UPCOTT, M.B. (1941)  
J. Genet. 41: 297-338
- DARWIN, C. (1859)  
On the Origins of Species by Means of Natural Selection (6th. ed. 1972). Murray London.

- DAY, T. H.; DOBSON, T. HILLIER, P. C. ; PARKIN, D. T. y BRYAN, C. (1982)  
Heredity 48 (1): 35-44
- DAYAL, N. (1979)  
Cytologia 44: 1-5
- DIAZ DE LA GUARDIA, R.; LADRON DE GUEVARA, R. (1981)  
Genetica 55: 99-103
- DIAZ DE LA GUARDIA, R.; LADRON DE GUEVARA, R. y PRETEL, A. (1979)  
Genetica 51: 103-106
- DOBZHANSKY, TH. (1937)  
Genetics and the Origins of Species. Columbia Univer. Press N. Y.
- DOBZHANSKY, TH. (1941)  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 27: 47-50
- DOBZHANSKY, TH. (1943)  
Genetics 28: 162-186
- DOBZHANSKY, TH. (1948)  
Genetics 33: 158-176
- DOBZHANSKY, TH. (1949)  
Hereditas (suppl.) 210-224
- DOBZHANSKY, TH. (1970)  
Genetics of the Evolutionary Process. Columbia Univer. Press N. Y.
- DOBZHANSKY, TH. (1971)  
In Ecological Genetics and Evolution (ed. by R. Creed) 109-113  
Blackwell, Oxford.
- DOBZHANSKY, TH. y AYALA F. J. (1973)  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 27: 47-50

- DOBZHANSKY, TH.; AYALA, F.J.; STEBBINS, G. L. y VALENTINE, J. W. (1980)  
Evolución. Ed. Omega Barcelona.
- DOBZHANSKY, TH.; BURLA, H. y DA CUNHA, A. B. (1950)  
Am. Naturalist 84: 229-246
- DOBZHANSKY, TH. y EPLING, C. (1949)  
Proc Nat. Acad. Sci. U.S.A. 34: 137-141
- DOBZHANSKY, TH. y LEVENE, C. (1949)  
Genetics 33: 537-547
- DOBZHANSKY, TH.; LEVENE, C.; SPASSKY, B. y SPASSKY, N. (1959)  
Genetics 44: 75-92
- DYKHUIZEN, D. y HARTL, D. L. (1980)  
Genetics 96: 801-817
- EANES, W. F. y KOEHN, R. K. (1978)  
Biochem Genet. 16: 971
- EKBÉR, I. (1974)  
Hereditas 76: 1-30
- FERNANDEZ-PIQUERAS, J.; RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; SENTIS-CASTAÑOS, C. y  
ROJO-GARCIA, E. (1984)  
Caryologia 36: 69-76
- FARRIS, J. S. (1972)  
Am. Nat. 106: 645-668
- FARRIS, M. A. y SCHALL, B. A. (1983)  
Amer. J. Bot. 70 (2): 246-255
- FISHER, R. A. (1921)  
Phil. Transf, Roy. Soc. 122: 309-368

- FISHER, R. A. (1930)  
The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford University Press  
XIV + 272 pp
- FICH, W. W. y MARGOLIASH, E. (1967)  
Science 155: 276-284
- FONTDEVILA, A. (1978)  
Investigación y Ciencia 20: 94-103
- FONTDEVILA, A.; MENDEZ, J. Y ENRIQUEZ, I. (1979)  
Acta Cient. Compostelana 15: 121-131
- FONTDEVILA, A. RUIZ, A.; ALONS, G, y OCAÑA, J. (1981)  
Evolution 35 (1): 148-157
- FONTDEVILA, A. RUIZ, A. OCAÑA, J. Y ALONSO, G. (1982)  
Evolution 36 (4): 843-851
- FONTDEVILA, A.; ZAPATA, C.; ALVAREZ, G.; SANCHEZ, L.; MENDEZ, J. Y  
ENRIQUEZ, I. (1983)  
Genetics 105: 935-955
- FORD, E. B. (1940)  
Polimorphism and taxonomy. New Systematics. Edited by J. S.  
Huxley. Clarendon Press, Oxford 438 pp.
- GARBARI, F. (1966)  
Caryologia 19: 419-428

- GARBARI, F. (1968)  
Giorn. Bot. Ital. 101 (1967):300-301.
- GARBARI, F. (1969)  
Giorn. Bot. Ital. 103 n°1: 1-9
- GARBARI, F. (1973)  
Webbia 28: 57-80
- GARGARI, F. y GREUTER, W. (1970)  
Taxon 19 (3): 329-335
- GARCIA, L.J. (1981)  
Tesina Univ. de Granada.
- GARCIA, M. P. y PREVOSTI; A. (1981)  
Genet. Iberica 33:151-174
- GARTSIDE, D. M. Y MCNEILLY, T. (1971)  
Heredity 32: 287-297
- GAVAZZI, G.; SANDRI, M.; ANZANI, G. Y GHIDONO A (1977)  
Heredity 38 (3): 349-358
- GILLESPIES, J. H. y LANGLEY, C.H. (1974)  
Genetics 76: 837-848
- GIRALDEZ, R. y LACADENA, J. R. (1977)  
Chromosoma 66: 193-204
- GOTTLIEB, L. D. (1973)  
Evolution 27: 205-214
- GOTTLIEB, L. D. (1976)  
Biochemical consequences of Speciation in Plants. In Molecular  
Evolution Sunauer Associates Inc. Sunderland. Massachussetts.  
Ed. by F.J. Ayala.



- GOTTLIEB, L. D. (1977)  
Ann. of Miss. Bot. Gard. 64: 164-180
- GONZALEZ-DUARTE, R.; GONZALEZ-IZQUIERDO, M. C. y PREVOSTI, A. (1973)  
Atti. Acad. Sci. Inst. Bologna 261 serie IV 63-70
- GOSALVEZ, J.; GARCIA DE LA VEGA, C.; LOPEZ-FERNANDEZ, C. y RUFAS, J. S. (1981)  
Broteria-Genetica (Lisboa) II (LXXVII) 41-50
- GOSALVEZ, L. Y LOPEZ-FERNANDEZ, C. (1981)  
Genetica 56: 197-204
- GRANT, V. (1975)  
Genetics of Flowering Plants. N. Y. Columbia Univ. Press 514 pp.
- GREEN, M. M. (1962)  
Genetics 33: 154-164
- GURIES, R. P. y LEDIG, T. F. (1982)  
Evolution 36 (2): 387-402
- HAGA, T. (1953)  
Cytologia 18: 50-60
- HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B. y MITTON, J. B. (1979)  
A. REV. Ecol. Syst. 10: 173-200
- HANCOCK, J. y BRINGHURSTS, R. (1978)  
Amer. J. Bot. 65: 795-803
- HARPER, J. L. (1977)  
Population Biology of Plants. Academic Press London.
- HARRIS, H. (1966)  
Proc. Roy. Soc. Lond. (B) 164: 298-310
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A. y EDWARDS, Y. H. (1977)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 698-701
- HARTL, D. L. (1981)  
Science N. Y. 213: 1369-1370

- HARTL, D. L. y DUKHUIZEN, D.E. (1981)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 6344-6348
- HEWITT, G. M. (1979)  
Animal Cytogenetics, vol 3. Orthoptera. Gebruder Borntraeger
- HEWITT, G. M., JOHN B. (1968)  
Chromosoma 25: 319-342
- HEWITT, G. M.; JOHN B. (1970)  
Chromosoma 31: 198-206
- HEWITT, G. M. y SCHROETER, G.L. (1968)  
Chromosoma 25: 121-140
- HILL, M. O. (1974)  
Appl. Statis. 23: 340-354
- HUBBY, J. L. y LEWONTIN, R. C. (1966)  
Genetics 54: 577-594
- HUNTER, R. L. y MARKET, C. L. (1957)  
Science 125: 1294-1295
- HUXLEY, J. S. (1942)  
Evolution: The Modern Synthesis. Harper New York.
- INOUE, Y. y WATANABE, T. K. (1979)  
Jpn. J. Genet. 54: 69-82
- ISING, G. (1969)  
Hereditas 63: 213-256
- JACKSON, R. C. (1973)  
Evolution 27: 243-256
- JAGER, E. J. (1972)  
In Taxonomy Phytogeography and evolution. Ed. D. H. Valentine Acad.  
Pres. London.
- JAIN, S. K. (1976)  
In Population Genetics and Ecology. Eds. S Karlin y E. Nevo,  
pp. 49-89. Acad. Pres. New York.

- JAIN, K. B. L. y JAIN, K. S. (1970)  
Heredity 25: 217-221
- JHONSON, G. B. (1974)  
Science 184: 28-37
- JOHN, B. (1973)  
Chromosoma 44: 123-146
- JOHN, B. (1981)  
Chromosomes Today vol (7) 128-137. George Allen and Unwin eds.
- JOHN, B. y HEWITT, G. M. (1966)  
Chromosoma 18: 254-271
- JOHN; B. y HEWITT, G. M. (1969)  
Chromosoma 28: 73-84
- JOHN, B. y KING M. (1977)  
Chromosoma 65: 59-79
- JOHN, B. y KING M. (1982)  
Chromosoma 85: 39-65
- JONES, G. H. (1968)  
Mutat. Res. 5: 385-395
- JONES, G.H. (1969)  
Chromosoma 26: 105-118
- JONES, G. H. y TEASE C. (1984)  
Chromosoma 89: 33-36
- JONES, R. N. y REES, H. (1982)  
B Chromosomes. Academic Press.
- KAHLER, A.L.; ALLARD, R. W.; KRZAKOWA, M.; WEHRHAM, C. F. y NEVO, E. (1980)  
Theor. Appl. Genet. 56: 31-47
- KALISCH, W. E. (1975)  
Theor. Appl. Genet. 46: 169-180

- KARP, A. y JONES, R. N. (1983)  
Theor. Appl. Genet. 65: 149-156
- KAUL; D. y PARSONS, P. A. (1965)  
Heredity 20: 381-392
- KEELER, K.H. (1978)  
Evolution 32: 638-645
- KIMURA, M. (1968)  
Nature 217: 624-626
- KIMURA, M. (1969)  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 63: 1181-1188
- KIMURA, M. (1979)  
Scient. Am. 241: 98-126
- KIMURA, M. (1982)  
In Molecular Evolution, Protein Polimorphism and the Neutral Theory.  
Ed. by M. Kimura. Kimura. Japan Scientific Societies Press. Tokyo
- KIMURA, M. y MARUYAMA, T. (1971)  
Genet. Resch. 18: 125-131
- KIMURA, M. y OHTA, T. (1971)  
Nature 229: 467-469
- KNIBB, W. R. (1983)  
Genetica 58: 213-221
- KNIBB, W. R.; OAKESHOTT, J. G. y GIBSON, J. B. (1981)  
Genetics 98: 833-847
- KNOLL, F. (1921)  
Abh. Zool. Bot. Ger. Wien. 12 (1): 1-119
- KOEN, R. K. Y EANES , W. F. (1978)  
Evol. Biol. 11: 39-100
- KOJIMA, K. Y TOBARI, Y. N. (1968)  
Genetics 63: 639-651
- KRIMBAS, C. B. y LOUKAS, M. (1980)  
In Evolutionary Biol. vol 12. Edited by M. Hecht. W.C. Steere y  
B. Wallace. Plenum Publishing Corporation N. Y.

- LACADENA, J. R. (1981)  
Genética 3ª edición. Ed. A.G.E.S.A. Madrid
- LANDE, R. (1979)  
Evolution 33: 234-251
- LANGLEY, C. H.; ITO, K. y VOELKER, R. A. (1977)  
Genetics 86: 447-454
- LANGLEY, C. H.; TOBARI, Y. N. y KOJIMA, K. (1974)  
Genetics 78: 921-936
- LARSON, A. (1981)  
Am. Nat. 118: 119-125
- LAURIE-AHLBERG, C.C. y MERRELL, D.J. (1979)  
Evolution 33: 342-349
- LEBART, L. y FENELON, J. P. (1975)  
Statistique et Informatique Appliquées. Dunod Paris.
- LEVAN, A.; FREDGA, K. y SANDBERG, A.A. (1964)  
Hereditas 52: 201-220
- LEVIN, D. A. (1977)  
Evolution 31: 477-494
- LEVIN, D.A. y CREPET, A. (1973)  
Evolution 32: 245-263
- LEVINS, R. (1968)  
Evolution in Changing Environments. Princeton Univer. Press New York
- LEVY, M. y LEVIN, D. A. (1975)  
Genetics 79: 493-512
- LEVY, M.; STEINER, E. y LEVIN, D. A. (1975)  
Biochem. Genet. 13: 487-500
- LEWIS, K. R. y JOHN, B. (1966)  
Chromosoma 18: 287-304

- LEWONTIN, R. C. (1974)  
The Genetics Basis of Evolutionary Change. Columbia Univ. Press N.Y.
- LEWONTIN, R. C. (1984)  
La diversidad humana. Prensa Cientifica Ed. Labor.
- LEWONTIN R. C. y HUBBY, J. L. (1966)  
Genetics 54: 595- 609
- LEWONTIN, R.C. y WHITE, M. J. D. (1960)  
Evolution 14: 116-129
- LOPEZ ALONSO, D (1984)  
Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- LOUKAS, M. ; KRIMBAS, C. B. y VERGINI, Y. (1979)  
Genetics 104: 173-179
- MAGUIRE, M. P. (1983)  
Genetics 104: 173-179
- MARKET, C. L. y MOLLER, F. (1959)  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 45: 753-763
- MARTIN, J. y LEE, B. T. O. (1981)  
In Evolution and Speciation. Essays in Honor of M. J. D. White.  
Eds. W. R. Atchley y D, Woodruff. Cambridge Univ. Press.
- MARTINEZ ZAPATER, J. M. (1983)  
Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Madrid
- MARUYAMA T. y KIMURA, M. (1974)  
Nature 249: 30-32
- MATSUURA, M. (1950)  
Cytologia 16: 48-57
- MAYR, E. (1942)  
Systemactics and the Origins of Species. Columbia Univ. Press.
- MAYR, E. (1965)  
Summary In The Genetics of colonizind species. Edited by H.G.Baker and  
G.L. Stebbins. Acad. Press New York and London
- MCCLINTOCK, B. (1931)  
Agr. Exp. Stat. Res Bull. 163: 1-30
- MCCLINTOCK, B. (1933)  
Z. Zellforsch Mikrokasp Anat. 19: 191-237

- MCCLINTOCK, B. (1941)  
Genetics 26: 234-282
- MCDONALD, Y. F. y AYALA, F. J. (1974)  
Nature Lond. 250: 572-574
- MCLEOD, M. J.; ESHBAUGH, W. H. y GUTTMAN, S. I. (1979)  
Bull. Torrey Bot. Club 106: 326-333
- MCNAUGHTON, S. J.; FOLSOM, T. C.; LEE, T.; Park, F.; PRICE, C.; ROEDER, D.  
SCHIMITZ, J. y STOCKWELL, C. (1974)  
Ecology 55: 1163-1165
- METTLER, L. E.; VOELKER, R. A. y MUKAI, T. (1977)  
Genetics 78: 921-936
- MITTON, J. B. y KOEHN, R. K. (1975)  
Genetics 79: 97:111
- MITTON, J. B.; LINHART, Y. B.; HAMRICK, J. L. y BECKMAN, J. S. (1977)  
Theoret. Appl. Genet. 51: 5-13
- MONCLUS, M. y PREVOSTI, A. (1971)  
Evolution 25: 214-217
- MORDIA, K. J.; KENT, J. T. y BIBBY, J. M. (1979)  
Multivariate Analisis. Academic Press N. Y.
- MORETTI, J.; BROUSIER, G. y JAILE M. J. (1957)  
Bull. Chim. Biolo. 39
- MUKAI, T.; WATANABE, T. K. y YAMAGUCHI, O. (1974)  
Genetics 77: 771-793
- MUKAI, T. y VOELKER, R. A. (1977)  
Genetics 86: 175-185
- MULLER, H. J. (1964)  
Mutation Res. 1: 2-9
- NASSAR, R. (1979)  
Genetics 91: 327-338

- NASSAR, R. MUSH, H. J. y COOK, R. D. (1973)  
 Evolution 27: 558-564
- NANKIVELL, R. N. (1974)  
 Chromosoma 22: 42-68
- NEI, M. (1972)  
 Am. Nat. 106: 283-292
- NEI, M. (1975)  
 Molecular Population Genetics and Evolution. North-Holland Publ. Comp.
- NEI, M. (1978)  
 Genetics 89: 583-590
- NEI, M. (1980)  
 In Vito Volterra Symposium on Mathematical Models in Biology. Ed.  
 C. Barigozzi. Springer-Verlag Berlin.
- NEIJZING, M. G. (1982)  
 Chromosoma 85: 287-298
- NEVO, E. (1978)  
 Theoretical Population Biology 13: 121-177
- NEVO, E. (1983)  
 In Protein Polymorphism: Adaptative and taxonomie significance. Ed. by  
 G. S. Oxford and D. Rollinson. Systematics Association Acad. Press
- NEVO, E.; BAR-EL, CH.; BAR, Z. y BEILES, A. (1981)  
 Oecologia 48: 199-208
- NEVO, E.; GOLENBERG, E.; BEILES, A.; Brown, A. H. D., ZOHARY, D. (1982)  
 Theor. Appl. Genet. 62: 241-254
- NEVO, E.; LAVIE, B. y BEN-SHLOMO, R. (1983)  
 In Isozymes Current topics in Biological and Medical Research. (M.C, Ra-  
 tazzi, J. G. Scandalios, J. G. and G. S. Whitt eds.) Liss Pub. N. Y.
- NEVO, E.; PEARL, T.; BEILES, A.; WOOLD A. y ZOLLER, U. (1980)  
 Vº Journées Etude Pollution. 61-68 Cagliari CIESM



- NODA, S. (1974)  
Bot. mag. (Tokyo)
- NUR, U. (1961)  
Chromosoma 12: 272-279
- NUR, U. (1968)  
Chromosoma 25: 198-214
- OHTA, T. (1982)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
- OLIVER, D. R. (1981)  
Annu. Re. Entomol. 16: 211-230
- OLIVER, J. L.; MARINEZ-ZAPATER, J. M.; PASCUAL, L.; ENRIQUEZ, A.M.
- RUIZ REJON, C. y RUIZ REJON, M. (1983)  
In Isozymes Current Topics in Biological and Medical Research, vol.10:  
Genetics and Evolution, 341-346. Alan R Liss Inc. New York.
- PASCUAL, L. (1983)  
Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- PEREZ, L. (1982)  
Tesina . Universidad de Granada.
- PHILIP, L. C. (1942)  
J. Genet. 44: 129-142
- PINSKER, W.; LANKINEN, P. y SPERLICH, D. (1978)  
Genetica 48: 207-214
- PIERCE, B. y MITTON, J. B. (1980)  
Am. Nat. 116: 850-861
- POWELL, J. R. (1973)  
Genetics 74. s 217
- POWELL, J. R. (1975)  
Evol. Biol. 8: 79-119
- PRAGER, E. M. y WILSON, A. C. (1976)  
J. Mol. Evol. 9: 45-57
- PRAKASH, S. (1973)  
Genetics 75: 347-369
- PRAKASH, S. y LEWONTIN, R. C. (1968)  
Genetics 59: 398-405

- PRAKASH, S. y LEWONTIN, R. C. (1968)  
Genetics 59: 398-405
- PRAKASH, S.; LEWONTIN, R. C. y HUBBY, J. L. (1969)  
Genetics 61: 841-858
- PREVOSTI, A. (1957)  
Publi. Inst. Biol. Apl. Barc. 26: 53-60
- PREVOSTI, A. (1966)  
Genet Res. 10: 81-93
- PREVOSTI, A. (1971)  
Genética Ibérica 23: 69-84
- PREVOSTI, A. (1972)  
Genética Ibérica 24: 11-21
- PREVOSTI, A. (1974)  
Miscellanea Alcobé: 109-118. Public. Univer. Barcelona.
- PREVOSTI, A. (1978)  
Investigación y Ciencia 20:90-103
- QUIROS, C. (1983)  
In Isozymes in plant genetics and breeding .Ed. S. D. Tanksley.
- REED, T. E. y SCHULL, W. F. (1968)  
Amer. J. Human. Gent. 20: 579-582
- REES, H. y THOMPSON, J. B. (1955)  
Heredity 9: 399-407
- RICK, C. M. y FOBES, F. B. (1975)  
Evolution, Lancaster Pa. 29: 443-457
- RICK, C. M. ;FOBES, J. B. y Holle M. (1977)  
Plant Syst. Evol. 127: 139-170
- RISCH, P. (1971)  
Genetica 42: 79-103
- RIVA, E.; FOX, D. P.; GIRALDEZ, R. y SANTOS, L. (1984)  
Heredity 53 (1): 101-106

- ROBERTS, P. A. (1966)  
Genetics 54: 969-979
- ROOSE, M. L. y GOTTLIEB, L. D. (1976)  
Evolution 30: 818-830
- ROOSE, M. L. y GOTTIEB, L. D. (1980)  
Genetics 95: 171-187
- ROTHFELDS, K. H. (1980)  
In Insect Cytogenetics. Ed. by R. L. Blackman, G. M. Hewitt and M. Ashburner. Publ. for the Royal Ento. Soc. by Black Sci. Publi.
- ROTHFELDS, K. H. y FREEMAN, M. (1966)  
Can. J. Zool. 49: 937-945
- RUIZ PANADERO, A. (1982)  
Resumen Tesis Doctoral. Ser. Publ. Univer. de Santiago de Compostela
- RUIZ REJON, M. (1983)  
Libro de Resúmenes de las XIX Jornadas de Genet, Luso-Españolas.Coimbra
- RUIZ REJON, M. y OLIVER, J. L. (1981)  
Heredity 47 (3): 403-407.
- RUIZ REJON, M.; PASCUAL, L.; RUIZ REJON, C.; VALDES, B. y OLIVER, J.L. (1984)  
Biochem. Syst. and Ecol. (en prensa)
- SANTOS, J. L. y GIRALDEZ, R. (1982)  
Chomosoma 85: 507-518
- SANTOS, M.;TARRIO, R.;PORTO,A.; ZAPATA, C.; Y ALVAREZ, G. (1983)  
Libro de Resúmenes de las XIX Jornadas de Genet. Luso-Españolas.Coimbra
- SAURA, A. LAKOVAARA, S. ; LOKKI, Y. y LANKINEN, Y. (1973)  
Hereditas 75: 33-46
- SCHAAL, B. A. y LEVIN, D. A. (1976)  
Amer. Natur. 110: 191-206
- SCHOEN D, J. . (1982)  
Evolution 36 (2): 361-370
- SCHROETER, G. L. (1968)  
Ph. D. Thesis University of California
- SCHROETER, G. L. Y HEWITT, G. M. (1974)  
Can. J. Genet. Cytolog. 16: 285-296

- SCHULTZ, J. y REDFIELD, A. (1951)  
In *Drosophila* Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 16:175-197
- SCHWAEGERLE, K. E. y SCHAAL, G. R. (1979)  
Evolution 33: 1210-1218
- SELANDER, R. K. y KAUFMAN, D. W. (1973)  
Evolution 29: 385-401
- SELANDER, R. K.; SMITH, M.H.; YANG, S.Y.; JHONSON, W.E. y GENTRY, J.B. (1971)  
Univ. Texas Publ. 7103: 49-90
- SERRADILLA, J. M. y AYALA, F.J. (1983)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2022-2025
- SHAW, D. D. (1970)  
Chromosoma 30: 326-343
- SHAW, D. D.; WEBB, G. C. y WILKINSON, P. (1976)  
Chromosoma 56:169-190
- SHAW, D. D. y WILKINSON, P. (1980)  
Chromosoma 80: 1-31
- SHIELDS, G. F. (1973)  
Can. J. Genet. Cytolog. 15: 461-471
- SHIELDS, G. F. (1976)  
Can. J. Genet. Cytolog. 18: 747-751
- SHIELDS, G. F. (1982)  
The Condor 84 (1): 110-116
- SHUMAKER, K. M. y BABBLE, G. R. (1980)  
Evolution 34 (1): 110-116
- SIMPSON, G. G. (1944)  
Tempo and Mode in Evolution. Columbia Univer. Press.
- SIMPSON, G. G. (1953)  
The Major Features of Evolution. Columbia University Press.
- SINGH, B. N. (1982)  
Genetica 59: 151-156
- SINGH, B. N. (1983)  
Caryologia 36 (4): 333-343

- SJODIN, J. (1971)  
Hereditas 67: 39
- SMITHIES, O. (1955)  
Biochem. J. 61: 629-641
- SNEATH, P. H. A. y SOKAL, R. R. (1973)  
Numerical taxonomy. The Principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman and Co.; San Francisco
- SOLBRIG, O. T. y SIMPSON, B. B. (1974)  
J. Ecol. 62: 473-486
- SOKAL, R. R. y ROHLF F. J. (1969)  
Biometry. W. H. Freeman, San Francisco
- SOULE, M. (1973)  
A. Rev. Ecol. Syst. 4: 165-187
- SOUTHERN, D. I. (1970)  
Chromosoma 30: 154-168
- SPERLICH, D. (1964)  
Z. Vererbungsl. 93: 73-81
- SRECRAMA, R. y RAY-CHANDHUNI (1974)  
Dr. Inf. Ser. 51: 136-137
- START, A. E. (1970)  
Am. J. Bot. 57: 1145-1149
- STEBBINS, G. L. (1950)  
Variation and Evolution in Plants. Columbia Univer. Press.
- STEBBINS, G. L. (1971)  
Chromosomal evolution in higher plants. Ed. Arnold. Publ. Ltd London  
VIII + 216 p.p.

- STEBBINS, G. L. (1981)  
In Poliploidy Biological Relevance. Ed. Lewis W. H.. Plenum Press N. Y.
- STEBBINS, G.L. (1983)  
En estudios sobre la filosofía de la biología. Eds. F. J. Ayala y  
Th. Dobzhansky. Ariel, Methodos, Barcelona.
- STERN, H. y HOTTA, (1973)  
Phil. Trans. R. Soc. London B. 277: 277-294
- STEWART, F. M., CLEEG, M. T. Y KIDWELL, J. F. (1979)  
Theor, Appl. Genet. 54: 133-139
- STLAKER, H. D. (1976)  
Genetics 82: 323-347
- STLAKER, H. D. y CARSON, H. L. (1948)  
Evolution 2: 295-305
- STUBERT, C. W.; GOODMAN, M. H. y JOHNSON, F. M. (1977)  
Biochem. Genet. 15: 383-394
- STURTERVANT A. H. (1926)  
Biol. Zentralbl. 46: 697-702
- SWANSON, C. P.; MERZ, T. y YOUNG, W. J. (1981)  
Cytogenetics. The Chromosome in Division, Inheritance and Evolution  
2º ed. Prentice-Hall Inc.
- SWOFFORD L. D. y SELANDER, R. K. (1981)  
J. Hered. 72: 281-283
- SYNDER, T. P. y AYALA, F. J. (1979)  
Genetics 92: 995-1003

- TING, T. C. (1958)  
Chromosoma 9: 286-291
- TOBARI, Y. N. y KOJIMA, K. (1967)  
Genetics 57: 179-188
- TSUCHIYA, T. (1963)  
In Proc. Int, Congr. Genet. Vol I. The Netherlands, I: 122-122
- TUTIN, T. G. et al., (1980)  
Flora Europaea. Vol. V. Cambridge Univer. Press
- VAIO, E.; DE GOÑI, S. y REY, C. (1979)  
Chromosoma 71 : 371-386
- VAN DE VATE, C. y JANSEN, G. J. (1978)  
Genet Res. Camb. 31: 29-52
- VAN DIJK, H. y VAN DELDEN, W. (1981)  
Thecr. Appl. Genet. 60: 258-290
- VIINIKKA, Y. (1977)  
Hereditas 86: 91-102
- VIINIKKA, Y.; KOTIMAHY y LITMANA, K. (1978)  
Hereditas 88: 279-283
- WALTERS, J. L. (1956)8;  
Am. J. Bot. 43: 342-354
- WARD, B. L.; STARMER, W. T.; RUSSELL, J.S. y HEED, W. B. (1974)  
Evolution 28: 565-579
- WATANABE, H. y NODA, S. (1974)

WATANABE, T. K. y WATANABE, T. (1977)

Genetics 85: 319-329

WEISMAN, D. B. (1976)

Chromosoma 55: 325- 347

WENDELL, F. F. (1980)

Isozyme Bulletin 13: 116

WESTERGAAD, M. y VON WETTSTEIN, D. (1972)

Ann. Rev. Genet. 6: 71-110

WESTERMAN, M. (1970)

Heredity 25: 662-667

WESTERMAN, M. (1975)

Heredity 35: 165-172

WESTERMAN, M. (1983)

Heredity 51 (2): 501-506

WESTERMAN, M. y FONTANA P. B. (1973)

Heredity 31: 223-229

WHITE, M. J. D. (1951)

Genetics 36: 31-53

WHITE, M. J. D. (1954)

Animal Cytology and Evolution. 2º ed. Cambridge Univer. Press

WHITE, M. J. D. (1961)

Australian J. Zool. 9: 784

WILLS, C. (1981)

Genetic Variability. Claredon Press Oxford.



- WRIGHT, S. (1965)  
Evolution 19: 395-420
- WRIGHT, S. (1970)  
In Mathematical Topics in Populations Genetics. Ed by K. Kojima  
pp 1-31. Springer-Verlag New York.
- WRIGHT, S. (1977)  
Evolution and the Genetics of Populations. Vol 3. Experimental results  
and evolutionary deductions. University of Chicago Press.
- WRIGHT, S. (1978)  
Evolution and the Genetics of Populations Vol 4. Variability within  
and Among Natural Populations. University of Chicago Press.
- YAMAGUCHI, O.; CARDELLINO, R. A. Y MUKAI, T. (1976)  
Genetics 83: 409-422
- YAMAGUCHI, D. y MUKAI T. (1974)  
Genetics 78: 1202-1221
- YEH, F.C. y EL-KASSABY; (1980)  
Can. J. For. Res. 10: 415-422
- YEH, F. C. y O'MALLEY, D. (1980)  
Silvae Genet 29: 83-92
- YOSIDA, T. H., MORIGUCHI, Y.; YANG, Y. S. y SHIMAKURA, K. (1967)  
Rep. National Inst. of Genetics Japan n° 17.
- YOSIDA, T. H.; NAKAMURA, A. Y FUKAYA T. (1965)  
Chromosoma 16: 70-80
- YOSIDA, T. H.; TSUCHIYA, K. y MORIWAKI, K. (1971)  
Chromosoma 33. 30-40
- YU, H. F. y SPIESS, E. B. (19785)  
Genetics 90: 783-800

ZARCHI, Y. ; SIMCHEM, G. y SCAAP, T. (1972)

Chromosoma 38: 77-94

ZOHARY, D. (1956)

Genetics 40: 874

ZOUROS, E.; KRIMBAS, C. B.; TSAKAS, S. y LOUKAS, M. (1974)

Genetics 78: 1223-1244