

## ***CAPÍTULO 4***

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD MORFOLÓGICA EN LA  
ZONA DE POLIMORFISMO ROBERTSONIANO  
BARCELONA DE *Mus domesticus* MEDIANTE  
MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA**



## 4.1. INTRODUCCIÓN

En una escala evolutiva, la interrupción del flujo genético entre poblaciones puede implicar la divergencia genética gradual de éstas, primero como resultado de la segregación genética de loci polimórficos existentes y seguidamente como resultado de la acumulación de nuevas mutaciones (Festing & Roderick, 1989; Harrison, 1998, citado en Perfectti, 2002). El alcance de la divergencia genética puede ser medido por el análisis directo de las secuencias de ADN, por el análisis de proteínas mediante electroforesis, por técnicas inmunológicas o bien estudiando características morfológicas. Los caracteres morfológicos presentan la desventaja de ser fenotipos complejos en los que los loci individuales se pueden expresar en diversos grados, pero a su vez son fáciles de obtener y pueden ser el resultado de la expresión de muchos loci. Entender la evolución de la morfología de un organismo requiere el conocimiento de la base genética de la variación de la forma y del tamaño. El interés en la variación morfológica ha sido desde hace tiempo el motor de muchos estudios de biología. Buscar una explicación a esta variación es el mayor objetivo de muchas investigaciones, incluyendo campos tan diversos como la morfología funcional, la macroevolución, la selección sexual y la biología evolutiva del desarrollo.

La morfometría geométrica surge a finales de los años 80 como un nuevo modo de estudiar las diferencias morfológicas, teniendo en cuenta la globalidad de la forma. Se diferencia de la morfometría tradicional en que el estudio de la forma se realiza mediante coordenadas de puntos, o *landmarks*, representadas en un plano o en un espacio cartesiano. La morfometría geométrica, llamada por Bookstein (1993) “nueva síntesis morfométrica”, deriva de la síntesis de dos escuelas que se desarrollaron independientemente durante el siglo pasado. Por una parte la aproximación que se origina directamente de la biometría de Karl Pearson (1857-1936), Francis Galton (1822-1911), W. F. R. Weldon (1860-1906) y Ronald Aylmer Fisher (1890-1962), quienes aplicaron el álgebra de la estadística multivariante (especialmente matrices de covarianza) a conjuntos de distancias, tomadas a partir de una muestra de individuos; y por otra parte la aproximación geométrica asociada al nombre de D’Arcy Wentworth Thompson (1860-1948) con el uso de la representación directa de la diferencia de forma mediante rejillas de deformación (Thompson, 1917).

## 4.1. INTRODUCCIÓN

---

Los trabajos que establecieron la base teórica de la morfometría geométrica aparecieron en los años ochenta: Bookstein (1984) propuso la descripción de la forma mediante coordenadas cartesianas que permitían visualizar las diferencias entre individuos y la posibilidad de aplicar pruebas t de Student para valorar la significación estadística; Goodall (1983) describió cómo utilizar los valores de las F en coordenadas no estandarizadas para la dimensión; y finalmente Kendall (1984) teorizó la existencia de un espacio de la forma (o espacio de Kendall) demostrando cómo los trabajos de Bookstein y Goodall se interpretaban en este espacio. A finales de los años 80, la estadística multivariante y la posibilidad de representar visualmente las diferencias morfológicas encontradas entre organismos hallaron su síntesis en la morfometría geométrica, que ha tomado contribución de las matemáticas, de la estadística, de la geometría no Euclídea y del desarrollo de los ordenadores cada vez más potentes con la finalidad de realizar las operaciones complicadas de los cálculos necesarios.

La morfometría geométrica estudia la forma de los organismos, entendiéndose como forma (*form*) el conjunto de dos componentes: dimensión (*size*) y conformación (*shape*). La dimensión viene definida por el tamaño del centroide (*centroid size*), que constituye una estimación geométrica de la dimensión de un objeto en todas las direcciones respecto a su centroide, a diferencia de las medidas lineares entre dos puntos, y se define como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las distancias entre el centroide del objeto y cada punto homólogo (Bookstein, 1991). La conformación se caracteriza únicamente por su propiedad geométrica (la posición relativa de las coordenadas en el espacio), y a su vez está formada por una componente uniforme y otra no uniforme. La primera representa toda la diferencia de forma asociada a una escala infinita, es decir no localizada en ningún punto del objeto que se está estudiando. Forman parte de esta transformación el alargamiento (dilatación) o la compresión o bien el deslizamiento de una parte sobre la otra. Las diferencias no uniformes son aquellas localizadas en determinadas áreas de la configuración (Bookstein, 1996).

Los métodos geométricos, los cuales se aplican a datos obtenidos en forma de coordenadas de *landmarks* en dos o tres dimensiones, han engendrado un especial entusiasmo porque permiten recuperar y visualizar la información espacial que no es capturada por el conjunto de medidas de distancias. En estudios de sistemática, la morfometría geométrica es una

herramienta muy potente. El análisis de grupos muy próximos, como es el caso de poblaciones, demos y subespecies, siempre implica la comparación de formas muy similares, que difieren sobre todo en pequeños desplazamientos relativos de *landmarks*. Esto significa que es más probable que los *landmarks* sean homólogos cuando se comparan diferentes formas de grupos próximos que cuando los taxones no están tan relacionados (Loy, 1996).

Comúnmente en los trabajos de morfología en zonas híbridas se ha descrito la variación morfológica entre los taxones que se hibridan y cómo esta variación se muestra en los descendientes híbridos entre dichos taxones (Festing, 1972; Leamy, 1982a, 1982b; Thorpe & Leamy, 1983; Leamy & Thorpe, 1984; Festing & Roderick, 1989; Alibert *et al.*, 1997). La heterocigosidad estructural de los híbridos entre razas cromosómicas o entre éstas y las poblaciones caracterizadas por un cariotipo estándar pueden sufrir un decremento de la fertilidad, que puede llevar a la esterilidad, dependiendo del número de cromosomas heterocigotos o de la presencia de homologías monobranquiales (Wallace *et al.*, 1992; Castiglia & Capanna, 2000), como ya ha sido discutido en capítulos previos. Esto puede determinar el establecimiento de aislamiento reproductor con la consiguiente ruptura del flujo génico entre poblaciones y por consiguiente se puede producir una diferenciación morfológica (Thorpe *et al.*, 1982; Corti & Thorpe, 1989; Corti & Rohlf, 2001; Hauffe *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003). Pero no sólo se puede establecer una ruptura o disminución del flujo génico por esterilidad de híbridos, sino también por la supresión de la recombinación en cromosomas Robertsonianos en estado heterocigoto como resultado de un mal apareamiento de los cromosomas durante el paquiteno (Davisson & Akeson, 1993), o en estado homocigoto por la pérdida de la heterocromatina pericentromérica (Yamamoto & Miklos, 1978; Choo, 1998). Trabajos previos que comparan razas cromosómicas y animales estándar de *Mus domesticus*, efectuados ya sea con técnicas de morfometría geométrica (Corti & Rohlf, 2001) o con técnicas de morfometría tradicional (Thorpe *et al.*, 1982; Hauffe *et al.*, 2002; Saïd *et al.*, 1999), apuntan a una diferenciación morfológica atribuible a una reducción evolutiva del número cromosómico. También se detecta esta variación morfológica, relacionada con la diversidad cariotípica, en un estudio previo realizado en la zona de polimorfismo Robertsoniano Barcelona, en el que se utilizaron caracteres epigenéticos del cráneo y de la mandíbula para investigar la variabilidad fenética entre grupos cromosómicos (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2003).

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

---

En el presente capítulo se analiza el grado de diferenciación morfológica, y por tanto el grado de aislamiento genético, entre animales pertenecientes a distintos grupos cromosómicos de la zona de polimorfismo Robertsoniano Barcelona de *Mus domesticus*. Concretamente se atiende a la variabilidad de la forma de diversas estructuras óseas en función de la heterocigosidad estructural y del número cromosómico. De manera particular se escogió, como fuente de datos morfométricos, las normas dorsal y ventral del cráneo, lingual de la mandíbula y dorsal de la escápula. Cabe tener en cuenta que diferentes estructuras pueden dar información diversa sobre el pasado histórico de la zona de polimorfismo Robertsoniano, puesto que la presión selectiva no es la misma sobre todas ellas. El cráneo y la mandíbula contienen el cerebro y la mayor parte de los órganos de los sentidos y el aparato masticador y por consiguiente reflejan tanto patrones de procesos de adaptación como de filogenia. Como estructura post-craneana se utilizó la escápula, por ser una estructura plana en la que el error de la adquisición de datos se reduce, al estar minimizado el factor tridimensional. En consecuencia, se pretende valorar asimismo si la diferenciación morfológica ha actuado al mismo nivel en diferentes estructuras óseas. Se trata del primer estudio realizado, mediante técnicas de morfometría geométrica, en una zona de polimorfismo Robertsoniano de *M. domesticus* en la que no han sido detectadas razas cromosómicas.

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1. Muestra analizada

Se analizaron animales procedentes de 16 localidades de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona y la zona estándar que la circunda (tabla 4.1). Los animales se dividieron en tres clases de edad atendiendo al estado reproductivo, mediante el estudio de las gónadas, y a las dimensiones corporales: juveniles (clase de edad I; longitud del cuerpo (CC)  $\leq 73$  mm; ausencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos), subadultos (clase de edad II;  $73\text{mm} < \text{CC} \leq 86$ ; presencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos) y adultos (clase de edad III;  $\text{CC} > 86$ ; presencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos). Se optó por esta separación de clases de edad y no la basada en el desgaste dentario, propuesta por Lidicker (1966), porque los animales procedían de poblaciones salvajes muy diversas en las que la variación en la dieta podría haber provocado un desgaste dentario



**Tabla 4.1.** Número de animales por localidad geográfica, por grupo de heterocigosidad estructural y por rango cromosómico para cada estructura ósea. Cl.II: clase de edad II; Cl. III: clase de edad III; 40ST: estándar; 40H: estándar híbridos; HH: homocigotos estructurales; HTI: heterocigotos con una fusión en heterocigosis; HTII: heterocigotos con dos fusiones en heterocigosis; HTIII: heterocigotos con tres o más fusiones en heterocigosis.

	Estructura ósea estudiada							
	Norma dorsal del cráneo		Norma ventral del cráneo		Norma lingual de la mandíbula		Norma dorsal de la escápula	
	Cl. II	Cl. III	Cl. II	Cl. III	Cl. II	Cl. III	Cl. II	Cl. III
<i>Localidad</i>								
Bellaterra	12	4	10	3	11	4	9	4
Calaf	0	5	0	5	0	6	0	5
Calafell	8	4	7	4	10	4	10	4
L'Espluga Calba	4	3	4	3	4	4	2	3
Fullera	3	15	3	15	4	15	3	13
Garraf	14	6	15	8	17	8	15	6
Gavà	6	0	6	0	6	0	0	0
Lavern	10	3	11	3	11	3	11	2
La Granada	30	4	31	4	31	4	22	3
Les Pobles	8	10	8	11	8	9	6	9
La Riera	2	4	3	3	2	5	3	4
Sabadell	6	1	6	1	4	1	0	0
Santa Coloma de Queralt	0	0	0	0	0	0	2	3
Sant Pau d'Ordal	21	16	21	15	20	15	22	14
Sant Sadurní d'Anoia	2	4	2	5	2	3	1	4
Vilanova i la Geltrú I	6	6	6	7	7	8	4	5
<i>Heterocigosidad estructural</i>								
HH	16	7	17	7	15	7	9	5
HTI	44	28	44	28	48	26	40	25
HTII	32	11	32	13	33	14	28	12
HTIII	21	9	21	11	22	9	18	9
40H	10	8	9	7	9	9	7	8
40ST	9	22	10	21	10	24	8	20
<i>Rango cromosómico</i>								
28-30	35	14	37	16	29	17	30	11
31-33	48	20	49	21	50	19	42	19
34-37	15	13	14	13	16	12	14	11
38-39	15	8	14	9	13	8	9	10
40H	10	8	9	7	9	9	7	8
40ST	9	22	10	21	10	24	8	20

diferente entre ejemplares de la misma edad. Dado el número relativamente bajo de especímenes de la clase I, sólo se utilizaron los animales de las clases II y III.

Debido a la estrecha relación existente entre la heterocigosidad estructural y el número diploide cromosómico se procedió a analizar los datos clasificando los animales en función de ambas variables. La distribución de los ejemplares según el criterio de heterocigosidad estructural fue la siguiente:

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

---

- Homocigotos estructurales (HH): animales de número cromosómico comprendido entre 28 y 38 cromosomas en los que todas las fusiones que presentaban estaban en un estado de homocigosis estructural.
- Heterocigotos I (HTI): animales con una fusión en heterocigosis estructural.
- Heterocigotos II (HTII): animales con dos fusiones en heterocigosis estructural.
- Heterocigotos III (HTIII): animales con tres o más fusiones en heterocigosis estructural.
- Estándar híbridos (40H): animales con un número diploide de 40 cromosomas pero que proceden de localidades en las que se han encontrado conjuntamente animales de cariotipo estándar e individuos con un  $2n < 40$  cromosomas.
- Estándar (40ST): animales con  $2n = 40$  cromosomas procedentes de localidades formadas íntegramente por animales estándar.

En los grupos HTI, HTII y HTIII no se tuvo en cuenta el número cromosómico y la presencia adicional de fusiones en estado homocigoto.

En el estudio de la variación de forma respecto al  $2n$ , los animales se agruparon en rangos de número diploide, lo que permitió disponer de un tamaño de muestra mayor en cada grupo. Los rangos cromosómicos establecidos fueron: 28-30, 31-33, 34-37, 38-39, 40H y 40ST. Los grupos correspondientes a los animales de 40 cromosomas coinciden con los dos últimos de la clasificación anterior.

Los ejemplares clasificados como 40H pueden ser descendientes sólo de animales con 40 cromosomas, de heterocigotos estructurales para todas las fusiones, o bien proceder de apareamientos entre estos últimos y animales con  $2n = 40$ . Debido a este posible origen múltiple no se pudo asegurar una procedencia íntegramente estándar de los animales 40H, pudiéndose tratar de un grupo genéticamente más próximo a las poblaciones Robertsonianas. Por este motivo, se optó por separar los grupos 40ST y 40H en los análisis morfométricos.

### 4.2.2. Obtención y análisis de datos

Las estructuras óseas analizadas fueron las normas dorsal y ventral del cráneo, la norma lingual de la mandíbula y la norma dorsal de la escápula. El número de ejemplares estudiados para cada estructura fue diferente debido al diverso estado de conservación de las piezas

óseas (tabla 4.1). La mandíbula es posiblemente el sistema de caracteres morfológicos más apropiado para el estudio puesto que presenta una amplia serie de rasgos heredables, como se ha demostrado en el ratón de laboratorio (Festing, 1972; Leamy, 1990).

#### 4.2.2.1. Adquisición de las imágenes

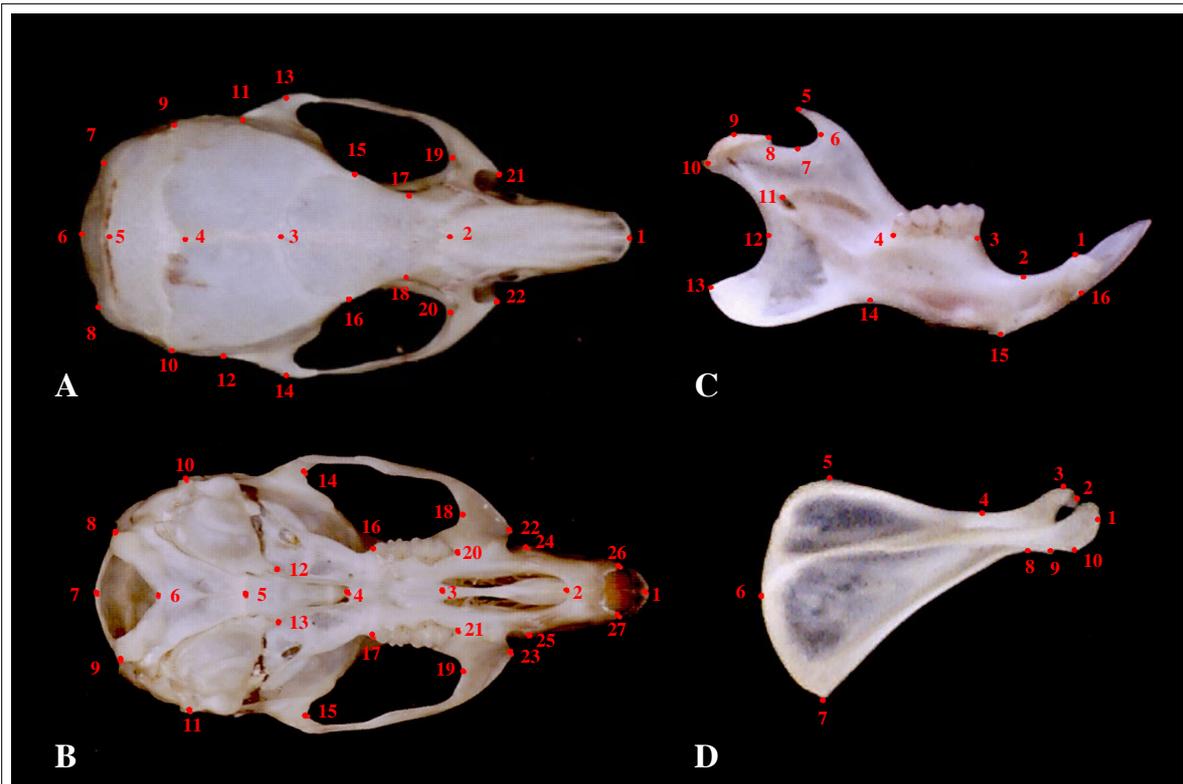
Se realizaron fotografías digitales de cada muestra mediante una cámara digital (Pixera Profesional; Pixera Corporation) con una resolución de 1.2 millones de píxeles y con una lente Nikon de 135 mm, colocando el objeto a 53 cm de distancia. La distancia en la que se efectúan las fotografías debe ser constante para poder comparar las dimensiones de los individuos y debe ser suficientemente grande, respecto a la dimensión del objeto, como para reducir al mínimo el error causado por la perspectiva. En cada fotografía se insertó una referencia milimétrica para determinar el valor de la escala.

#### 4.2.2.2. Obtención de landmarks

Los *landmarks* se digitalizaron mediante el programa TpsDig 1.31 (Rohlf, 1996a). Los datos obtenidos correspondieron a coordenadas  $x$  e  $y$  de 22 *landmarks* en la visión dorsal de cráneo, 27 *landmarks* en la visión ventral del cráneo, 16 *landmarks* en la visión lingual de la mandíbula y 10 *landmarks* en la visión externa de la escápula (figura 4.1, tabla 4.2). El criterio de la selección de los puntos es importante: deben ser buenos descriptores de la forma, equivalentes (homólogos) en los diversos ejemplares y se han de poder ubicar con precisión y certeza. Esta homología, referida a los *landmarks*, es de tipo operativa (Marcus *et al.*, 2000) y no debe confundirse con el concepto de homología utilizado en taxonomía, es decir la sinapomorfía utilizada en cladística. Los *landmarks* no son atributos biológicos a comparar sino que son el medio que ayuda a escoger estos atributos (Marcus *et al.*, 2000).

Según Bookstein (1991) se pueden definir tres tipos de puntos en función del criterio geométrico o biológico utilizado para su ubicación:

-*Landmarks* de tipo 1: aquellos que se encuentran en una zona de yuxtaposición de diversos tejidos o huesos.



**Figura 4.1.** Representación de los *landmarks* escogidos para cada estructura. A: Norma dorsal del cráneo. B: Norma ventral del cráneo. C: Norma lingual de la mandíbula. D: Norma dorsal de la escápula.

-*Landmarks* de tipo 2: aquellos que su homología entre casos viene dada sólo por evidencias geométricas y no histológicas.

-*Landmarks* de tipo 3: aquellos que tienen al menos una coordenada deficiente, como por ejemplo cualquiera de los extremos del diámetro más largo o la parte más baja de una concavidad. La base multivariante de la geometría morfométrica permite utilizarlos como *landmarks* en algunos análisis, pero la deficiencia que implican se ha de tener en cuenta en las interpretaciones geométricas o biológicas.

La descripción y tipo de *landmarks* utilizados en el presente estudio se exponen en la tabla 4.2 (véase también figura 4.1).

#### 4.2.2.3. Análisis de la dimensión

Se utilizó el *centroid size* como estimación de la dimensión de la estructura. El tamaño de las normas dorsal y ventral del cráneo se calculó como el *centroid size* de la hemiconfiguración de *landmarks* (para más detalles ver apartado 4.2.2.4). Para la mandíbula y la escápula se

**Tabla 4.2.** Descripción y clasificación según Bookstein (1991) de los *landmarks* utilizados para el estudio de las normas dorsal y ventral del cráneo, de la norma lingual de la mandíbula y de la norma dorsal de la escápula (véase también figura 4.1)

	<i>Landmarks</i>	Descripción	Tipo	
Norma dorsal del cráneo	1	Punto anterior de la sutura internasal	1	
	2	Nasion	1	
	3	Bregma	1	
	4	Lambda	1	
	5	Margen posterior de la sutura interparietal-occipital	3	
	6	Opistion	2	
	7 y 8	Margen posterior del exoccipital	2	
	9 y 10	Margen externo izquierdo de la sutura lambdoidea	1	
	11 y 12	Angulo posterior externo del proceso cigomático del escamoso	2,3	
	13 y 14	Angulo anterior externo del proceso cigomático del escamoso	2,3	
	15 y 16	Margen externo de la sutura coronal	1	
	17 y 18	Punto de máxima concavidad de la constricción interorbitaria	2,3	
	19 y 20	Margen anterior del proceso zigomático del maxilar	2,3	
	21 y 22	Margen exterior del foramen intraorbital	2,3	
	Norma ventral del cráneo	1	Prostion	1
		2	Margen anterior del foramen incisivo	3
		3	Margen posterior del foramen incisivo	3
4		Margen posterior de la placa horizontal del hueso palatino	2	
5		Sincondrosio esfeno-occipital	1	
6		Basion	3	
7		Protuberancia occipital externa	3	
8 y 9		Angulo marginal del cóndilo occipital	2,3	
10 y 11		Meato acústico óseo externo	2	
12 y 13		Proceso muscular de la bulla timpánica	2	
14 y 15		Margen posterior interno del proceso zigomático del escamoso	2,3	
16 y 17		Margen posterior del M <sup>3</sup>	2	
18 y 19		Margen anterior del proceso cigomático maxilar	3	
20 y 21		Margen anterior del M <sup>1</sup>	2	
22 y 23		Margen exterior del foramen infraorbital	2	
24 y 25		Margen inferior del foramen infraorbital	2,3	
26 y 27	Margen exterior del incisivo	2		
Norma lingual de la mandíbula	1	Margen superior de la incisión del incisivo inferior	2,3	
	2	Punto de máxima curvatura del diastema inferior	3	
	3	Margen anterior del M <sub>1</sub>	2	
	4	Margen posterior del M <sub>3</sub>	2	
	5	Proceso coronoide	2	
	6	Punto de máxima curvatura interna del proceso coronoide	3	
	7	Punto de máxima curvatura inferior del proceso articular	3	
	8	Margen anterior del cóndilo articular	2	
	9	Margen superior del cóndilo articular	3	
	10	Margen posterior del cóndilo articular	2	
	11	Margen posterior del foramen mandibular	2	
	12	Punto de máxima curvatura de la rama ascendente del dentario	3	
	13	Proceso angular	2	
	14	Incisura facial de los vasos	3	
	15	Punto de máxima curvatura inferior de la sínfisis	3	
	16	Margen inferior de la inserción del incisivo inferior	2,3	

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

(continuación, tabla 4.2)

	Landmarks	Descripción	Tipo
Norma dorsal de la escápula	1	Margen externo del acromion	3
	2	Margen externo del proceso coracoideo	2,3
	3	Margen anterior del proceso coracoideo	3
	4	Punto de máxima curvatura del borde anterior de la escápula	3
	5	Ángulo craneal	3
	6	Punto de máxima curvatura del margen dorsal	3
	7	Ángulo caudal	2
	8	Punto de máxima curvatura del borde externo	3
	9	Margen posterior del ángulo externo	2
	10	Ángulo del acromion	2

obtuvo el *centroid size* de la estructura derecha e izquierda de cada individuo y se realizó la media entre ambos. El cálculo de los valores del *centroid size* se realizó con el programa TpsSmall (Rohlf, 1998).

El estudio del dimorfismo sexual, de las diferencias entre clases de edad y del efecto de la localidad se realizó mediante un ANOVA de tres factores, con interacción, sobre el *centroid size*. Para ello sólo se tuvieron en cuenta los animales de 40 cromosomas estándar. La finalidad de seleccionar un grupo homogéneo para el estudio del efecto de estos factores fue eliminar del análisis variables que incluyeran variabilidad, puesto que en los grupos establecidos, tanto para la heterocigosidad estructural como para el número cromosómico, la distribución de clases de edad y de sexos no estaba balanceada, y los factores localidad, heterocigosidad estructural y número cromosómico están estrechamente relacionados, con lo que resulta difícil independizar sus efectos. Los resultados obtenidos se extrapolaron a la totalidad de la muestra analizada. Puesto que la heterocigosidad estructural y el número cromosómico están fuertemente ligados, se estudió la variación del *centroid size* realizando ANOVAs independientes sobre cada uno de estos factores.

Se estudió la normalidad de la distribución de los datos y la homogeneidad de varianzas, mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente.

### 4.2.2.4. Análisis de la conformación

Previamente al análisis de los datos se procedió a eliminar el posible efecto de la asimetría, obteniendo la media entre las configuraciones de landmarks de la parte izquierda y derecha de cada una de las estructuras estudiadas. Para las visiones dorsal y ventral del cráneo se

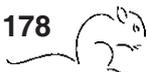
rotaron las configuraciones de manera que el *landmark* que determina el margen posterior del foramen mágnium se situó en el origen de coordenadas (0,0) y el *landmark* que marca el extremo del rostro se ubicó sobre el eje de abscisas (x,0). A continuación se promediaron los *landmarks* de las partes derecha e izquierda del cráneo. Estas hemiconfiguraciones fueron las que se utilizaron para los análisis subsiguientes. Para la mandíbula y la escápula se realizó la imagen especular de la configuración de *landmarks* correspondiente al lado derecho del cuerpo, cambiando de signo las coordenadas x de cada uno de los *landmarks*. A continuación se superpuso la pieza izquierda y la imagen especular de la derecha mediante el algoritmo de mínimos cuadrados de Procrustes y se promediaron las coordenadas de ambas configuraciones. Estos promedios fueron los que se utilizaron en los análisis posteriores.

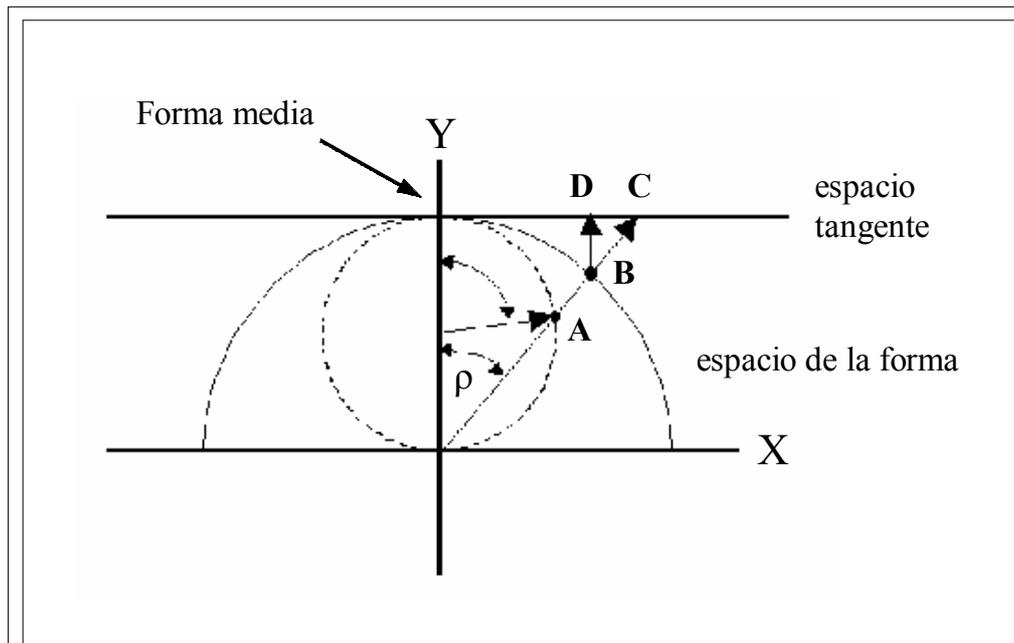
Las configuraciones de *landmarks* resultantes, después de haber eliminado el efecto de la asimetría, se redujeron al espacio de la forma o de Kendall. Esto se realizó mediante el análisis generalizado de Procrustes (GPA; procedimiento ortogonal de GLS, *Generalised Least Squares*; Rohlf & Slice, 1990). Los pasos en los que se basa el método son: a) trasladar las configuraciones de manera que coincidan los centroides respectivos; b) estandarizar las dimensiones haciendo el *centroid size* igual a uno; c) calcular la configuración media (o consenso) del conjunto de individuos, como media de las coordenadas para cada *landmark*; d) superponer los individuos según el criterio de mínimos cuadrados respecto a una configuración consenso; e) calcular los residuos (nuevas coordenadas para cada individuo después de los pasos a-d) sobre los que se realizarán los análisis estadísticos. Por este método la configuración consenso se calcula cada vez que se añade una nueva conformación, siendo éste el modo de obtener la menor distancia posible entre cada uno de los individuos y la conformación consenso. De esta forma, los residuos se calculan respecto a una configuración consenso óptima no definida *a priori* y que tiene en cuenta la dispersión efectiva de los puntos. En este momento del análisis, la representación mediante *landmarks* de cada ejemplar corresponde a un punto en un espacio curvo, no Euclídeo llamado espacio de la forma o espacio de Kendall (1984, 1986, citado en Rohlf, 1996b). En el caso de puntos bidimensionales, al pasar las configuraciones al espacio de forma se ha producido una pérdida de dimensión dada por la traslación (dos grados de libertad), la rotación (un grado de libertad) y la estandarización a la dimensión unitaria (un grado de libertad). Así pues el

espacio de la forma está caracterizado por  $pk-4$  dimensiones, siendo  $p$  el número de *landmarks* y  $k$  la dimensión de los puntos (2 en el caso de puntos bidimensionales).

La distancia entre los puntos en el espacio de Kendall se denomina distancia de Procrustes. Ésta se define como la raíz cuadrada de la suma de las diferencias al cuadrado entre la posiciones de los *landmarks* de dos configuraciones superpuestas al *centroid size* (Bookstein, 1996). La distancia de Procrustes tiene la propiedad de no variar respecto a la dirección de la deformación. Las propiedades matemáticas del espacio de la forma son muy complejas no pudiéndose utilizar la estadística multivariante convencional. Así, una alternativa para poder utilizar los análisis estadísticos convencionales es hacer una aproximación del espacio de forma no-Euclídeo a un espacio tangente que presenta una geometría Euclídea. Este espacio está formado por las proyecciones de los objetos que se encuentran en el espacio de forma a un espacio vectorial lineal tangente al espacio de forma. El punto de tangencia viene dado por la configuración consenso (estima media de las configuraciones). La variación de la forma capturada en el espacio tangente lineal no está limitada sólo a cambios lineales de la forma (cambios uniformes) sino que recoge toda la información de la variación de la forma (figura 4. 2).

Bookstein (1989) adaptó un algoritmo, llamado *thin-plate spline*, para el estudio de la deformación de finas láminas metálicas al cálculo de retículos de deformación de formas biológicas, análogo a las cuadrículas utilizadas por D'Arcy Thompson (1917). Esta función corresponde a un método para visualizar el espacio tangente en los análisis estadísticos de la variación de forma. Minimiza la energía de torsión (*bending energy*) necesaria de deformación de una hoja metálica para hacer coincidir los *landmarks* de la configuración media con los de una forma determinada o viceversa. Esta energía es mayor cuanto más próximos están los puntos donde se aplica la deformación. La función *thin-plate spline* está formada por dos componentes, la deformación afín y no afín, ambas función de la matriz de energía de torsión. La transformación afín es una componente lineal que comprende translación, rotación, escala y deformación (*shearing*). Sólo esta última es una componente de la forma y corresponde a una extensión o compresión uniforme y una posible reflexión (*reflection*) de un objeto en una dirección determinada. Es lo que Bookstein (1991) denomina componente uniforme de la forma. Los cambios afines son aquéllos que las líneas paralelas





**Figura 4.2.** El diagrama muestra una sección transversal del espacio de la forma (círculo de línea discontinua), el espacio preforma de las formas alineadas respecto a la referencia por GLS (semicírculo) y el espacio tangente (línea horizontal). El ángulo  $\rho$  es la distancia de Procrustes en radianes entre una forma (A) y la forma media (punto de tangencia entre el espacio de forma, el espacio preforma y el espacio tangente). El punto B corresponde a la posición de A en el espacio preforma después de la superposición por GLS de ser escalado respecto al *centroid size* unitario. C es la proyección estereográfica del punto A en el espacio tangente (coordenadas de forma) y D es la proyección ortogonal del punto B en el espacio tangente (coordenadas del espacio tangente de Kendall). La proyección ortogonal, que es la comúnmente utilizada, subestima la distancia entre B y la configuración consenso, mientras que la estereográfica la sobrestima (Rohlf, 2002a).

las mantienen paralelas, pero puede cambiar el ángulo entre ellas. La transformación no afín describe las diferencias entre un objeto y la referencia como la suma de las deformaciones no lineales del objeto. Esto corresponde a deformaciones locales de expansión, compresión, torsión, etc. y es el cambio de forma no uniforme.

La matriz de energía de torsión resultante del ajuste de la función *thin-plate spline* a la configuración de referencia se puede descomponer en una matriz de diversos ejes ortogonales, denominados *principal warps* y en una matriz diagonal de valores propios. Los *principal warps* son vectores propios de la matriz de energía de torsión que describen las deformaciones de la configuración de referencia a diferentes escalas espaciales. Tanto la matriz de energía de torsión como los *principal warps* son una función exclusiva de la conformación de la configuración consenso. Los tres últimos valores propios de la matriz de

energía de torsión son siempre igual a cero. Los vectores asociados a éstos representan las componentes uniformes y todas las transformaciones que no requieren energía. A partir de ahora la forma no se define sobre la base de las coordenadas de los puntos originales sino sobre los *principal warps*. Los parámetros asociados a cada individuo se pueden expresar en función de los *principal warps*. Esto lleva a definir los *partial warps* (Bookstein, 1989), que corresponden a los *principal warps* aplicados a lo largo de cada eje de coordenadas y escalados apropiadamente con la finalidad de corresponder a la parte no afín de la función *thin-plate spline* que transforma las coordenadas de referencia en las de un espécimen en particular (Rohlf, 1996b). Los *partial warps*, junto con los términos uniformes, proporcionan una base ortogonal para un espacio que es tangente al espacio de forma de Kendall, cerca de la forma media. La proyección de los individuos superpuestos sobre los *partial warps* produce las puntuaciones de los *partial warps*, que describen las desviaciones a partir de la configuración consenso. La matriz de las puntuaciones de los *partial warps* se denomina *weight matrix* y puede ser utilizada como un conjunto de variables en los subsiguientes análisis estadísticos multivariantes (Rohlf, 1996b, Rohlf *et al.*, 1996). La geometría de los *partial warps* viene determinada exclusivamente por la geometría de los *principal warps* y no tiene en cuenta la covariación de *landmarks* en la muestra de estudio. Por este motivo su geometría es inestable de modo que si se cambia la configuración de referencia cambia dicha geometría y los valores de los *partial warps*. Los *partial warps* están correlacionados entre ellos y por consiguiente no se pueden analizar como variables biológicas separadas. Así los *principal warps* de la matriz de la *bending energy* representan la base ortogonal para describir las diferencias de forma en el espacio tangente al espacio de Kendall, y la *weight matrix* la modificación de la forma de cada individuo respecto a la configuración consenso en cada uno de los *principal warps*. Los *relative warps* (RW) son componentes principales de una distribución de formas en el espacio tangente definido por la *weight matrix*. Cuando el estudio de morfometría geométrica se realiza sobre dos dimensiones, la componente uniforme está escrita por dos variables (*Unix* y *Uniy*) y la no uniforme (*weight matrix*) por  $p-3$  parejas de variables ( $x$  e  $y$ ) donde  $p$  es el número de *landmarks*.

El ajuste entre el espacio tangente y el espacio de la forma fue estimado utilizando el programa TpsSmall (Rohlf, 1998), que compara las distancias de Procrustes entre individuos, en el espacio de la forma, con las distancias Euclídeas, en el espacio tangente. Las componentes

uniformes (*Unix* y *Uniy*; Bookstein 1991) y no uniformes (*weight matrix*) de la forma se calcularon mediante el programa TpsRelw (Rohlf, 2002a). Estas componentes se combinaron para formar una *weight matrix* ampliada ( $W'$ ). A lo largo del capítulo se hará referencia a la *weight matrix* ampliada simplemente como *weight matrix*.

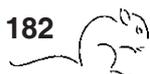
Para estudiar el dimorfismo sexual, los efectos de la edad y de la localidad de procedencia se utilizó el Modelo Linear General (MLG), de tres factores con interacción, con el que se estudió la significación de cada uno de estos factores y sus interacciones sobre un conjunto de *relative warps* (con  $\alpha=0$ ; Rohlf, 1993) que explicaron al menos un 70% de la varianza. Los *relative warps* se obtuvieron mediante TpsRelw (Rohlf, 2002a). Por los motivos expuestos en el apartado 4.2.2.3, las diferencias en edad, sexo y localidad se estudiaron sólo en animales estándar. Se utilizaron los RW y no la *weight matrix* con el objetivo de reducir el número de variables respecto al tamaño de muestra ya que el número de individuos pertenecientes al grupo de heterocigosidad estructural estándar fue bajo (del orden de 30). También se analizaron sobre las dos componentes uniformes, la variación de forma debida al sexo, a la edad y a la procedencia geográfica mediante ANOVAs de tres factores con interacción.

Se estudiaron los cambios de forma total, no uniforme y uniforme separadamente entre grupos de heterocigosidad estructural y rango cromosómico mediante análisis multivariante de la varianza (MANOVA). Las diferencias entre grupos de heterocigosidad estructural y cromosómicos fueron resumidas mediante pruebas  $T^2$  de Hotelling sobre las distancias de Mahalanobis al cuadrado no sesgadas ( $D^2$ ). En el caso de tamaños de muestra pequeños estos valores pueden ser negativos. Cuando esto ocurrió se substituyeron por un cero (Marcus, 1993). Se aplicó la corrección de Bonferroni en los niveles de significación de las distancias de Mahalanobis (Rice, 1989; Marcus, 1993). Se estudió la correlación, mediante la prueba de Mantel, entre la matriz de distancias de Mahalanobis entre grupos obtenida a partir de las componentes de forma total ( $W'$ ) y la obtenida a partir de las componentes no uniformes ( $W$ ). Una correlación significativa indicó que la mayor parte de los cambios de forma fueron de origen no uniforme, utilizándose entonces la  $W'$  para los análisis posteriores. Los cambios de forma relacionados con la heterocigosidad estructural y el número diploide se estudiaron mediante los *relative warps*. Cuando con el análisis de los *relative warps* no se consiguió una segregación satisfactoria, se utilizó la *weight matrix* para realizar un análisis

de variables canónicas (AVC). Éste último es aconsejado en estudios morfológicos entre grupos en los que la variabilidad individual es elevada, puesto que maximiza la cantidad de variabilidad existente entre grupos en relación con la existente dentro de los grupos (Albrecht, 1980).

Los cambios de forma total y uniforme se visualizaron mediante una regresión entre la  $W'$  y los vectores canónicos, y la  $W'$  y las componentes uniformes, respectivamente, utilizando el programa TpsRegr (Rohlf, 2000).

Para investigar las distancias fenéticas entre grupos, se realizaron dos tipos de análisis a partir de la matriz de la raíz cuadrada de las distancias de Mahalanobis ( $D$ ): 1) análisis jerárquico en el que se utilizó el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetic averages*; Sneath & Sokal, 1973) para la construcción del dendograma; 2) análisis de ordenación no métrica multidimensional (NMDS) basado en la ordenación de las distancias entre puntos (Shepard & Kruskal, 1964). El análisis de UPGMA se obtuvo por su común uso en estudios de distancias fenéticas y porque fue el método utilizado en estudios previos de morfología en animales de esta zona (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2003), lo que permitió comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Las técnicas de conglomerados fenéticos asumen que los datos están anidados jerárquicamente generando conglomerados aunque las unidades taxonómicas tengan que ser forzadas arbitrariamente para obtenerlos (Sneath & Sokal, 1973). Así, los procedimientos jerárquicos son inapropiados especialmente cuando el objetivo es resumir las relaciones entre UTOs (unidades taxonómicas operacionales), para las cuales no se ha hecho ninguna asunción inicial respecto a su estructura. El reconocimiento de diferentes nodos significa la formación de conglomerados jerárquicos basados en distancias distorsionadas entre UTOs (Queiroz & Good, 1997; Guiller *et al.*, 1998). Es por ello que se utilizó también el método de ordenación NMDS que optimiza y preserva las distancias entre UTOs, y tiene como único requisito que las distancias, en el nuevo espacio de  $k$  dimensiones (número de dimensiones determinadas por el usuario), presenten un buen ajuste con la función monotonica de las distancias originales. Una medida de esta relación la da el estrés ( $s$ ), que es una medida de la “maldad” de ajuste y se interpreta de la siguiente manera (Kruskal, 1964):  $s=0,4$  pobre;  $s=0,2$  aceptable;  $s=0,1$  bueno;  $s=0,05$  excelente y  $s=0,0$  perfecto. Los métodos de ordenación mostrarán un mejor ajuste que los



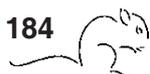
de conglomerados cuando la tendencia de las muestras a situarse en agrupaciones jerárquicas sea baja (Rohlf, 1970). Puesto que las distancias obtenidas después de una ordenación difieren de las originales, las relaciones entre los objetos pueden estar distorsionadas. Para reflejar la estructura subyacente de los datos y el grado de distorsión se superpusieron sobre los gráficos tridimensionales del NMDS las gráficas obtenidas mediante el método de *minimum-length spanning tree* (MST; Gower & Ross, 1969). Éstas muestran las distancias entre parejas de los objetos más cercanos. En ambos tipos de análisis se obtuvieron medidas del grado de ajuste o falta de distorsión (Rohlf, 1970) entre la matriz de distancias originales y el patrón de distancias obtenidas después de aplicar el método NMDS o UPGMA. Se utilizó el término de correlación cofenética (Sneath & Sokal, 1973) para la correlación entre las distancias originales y los valores cofenéticos. Los valores cofenéticos fueron distancias euclídeas obtenidas a partir del NMDS o distancias ultramétricas obtenidas a partir del UPGMA (Guiller *et al.*, 1998). La correlación cofenética correspondió al coeficiente  $r$  obtenido a partir de la correlación entre la matriz de distancias originales y la de valores cofenéticos. Este coeficiente es una buena medida de bondad de ajuste (Rohlf & Sokal, 1981). Una  $r \geq 0,9$  indica un nivel de ajuste muy bueno,  $0,8 \leq r < 0,9$  ajuste bueno,  $0,7 \leq r < 0,8$  ajuste pobre y  $r < 0,7$  ajuste muy pobre. En matrices de datos cuya estructura es altamente jerárquica el método NMDS puede dar lugar a una solución muy distorsionada con un valor de estrés cercano a cero (NTSYS, 1986-1997), por lo que es conveniente mostrar en este caso los valores de estrés y correlación cofenética. Los análisis de UPGMA y NMDS fueron llevados a cabo mediante el programa NTSYS-pc v2.01 (NTSYS Inc., 1986-1997).

Se estudiaron también los patrones de cambio de forma entre la visión dorsal y ventral del cráneo, y de esta última con la visión lingual de la mandíbula. Esto se llevó a cabo con el análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS, *partial least squares*; Streissguth *et al.*, 1993) mediante el programa TpsPls (Rohlf, 2002b). PLS es un análisis multivariante que utiliza la descomposición del valor singular de la matriz de covarianzas entre dos matrices de *partial warps* correspondientes a dos formas (A y B) que se comparan, donde el patrón de covariación entre las dos queda resumido por dos grupos de vectores latentes (combinaciones lineales), uno para cada bloque. Estos vectores están correlacionados dos a dos, de manera que el primer vector extraído de la matriz A se correlaciona sólo con el primer vector de la matriz B,

el segundo de A sólo con el segundo de B, etc. Este análisis es similar al método de correlación canónica, pero a diferencia de este último los vectores de un grupo no son ortogonales entre ellos (Rohlf & Corti, 2000). El tamaño muestral utilizado en el análisis PLS fue menor que el empleado en los análisis de variables canónicas o de clasificación, puesto que sólo se escogieron aquellos animales de los que se disponían las tres estructuras completas (normas dorsal y ventral del cráneo y visión lingual de la mandíbula), debido a que el análisis de PLS realiza correlaciones de conformación entre estructuras de un mismo individuo.

Adicionalmente, con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en el presente capítulo con los procedentes de otros estudios morfológicos de la zona de polimorfismo Robertsoniano Barcelona, se realizó un análisis NMDS a partir de las matrices de medidas medias de divergencia (MMDs), obtenidas a partir de caracteres epigenéticos, entre grupos de heterocigosidad estructural y rango cromosómico (tablas 2 y 4 de Muñoz-Muñoz *et al.*, 2003). Asimismo, se calcularon las distancias entre parejas de grupos más cercanos mediante MST. Se debe tener en cuenta que los grupos que definieron Muñoz-Muñoz *et al.* (2003) no son equivalentes a los definidos en el presente estudio. Para la heterocigosidad estructural, estos autores separaron los animales con un  $2n=28$ , y con las fusiones Rb(3.8), Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(9.11) y Rb(12.13) en homocigosis (HHI), del resto de homocigotos con  $2n<40$  (HHII). Para esta agrupación tampoco diferenciaron los ejemplares con  $2n=40$  procedentes de poblaciones estándar de los que presentaban la misma dotación cromosómica pero que procedían de poblaciones polimórficas. En el estudio del número diploide, los rangos cromosómicos que definieron fueron: 28, 29-32, 33-37, 38-39 y 40. En esta última agrupación, el grupo de 28 cromosomas es equivalente al grupo HHI definido para el estudio de la heterocigosidad estructural.

Se estudió la normalidad multivariante de las distribuciones de las variables independientes y la homogeneidad de las matrices de covarianza mediante diagramas cuantil-cuantil (basados en las distancias de Mahalanobis al cuadrado entre los centroides) y pruebas de M de Box, respectivamente. Todos los análisis de forma se realizaron separadamente para cada una de las estructuras analizadas, visiones dorsal y ventral del cráneo, visión lingual de la mandíbula y visión dorsal de la escápula y fueron computados con el paquete estadístico SAS v8.02 (SAS Institute Inc., 1999-2001).



### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Análisis de la dimensión

Puesto que las distribuciones de los datos fueron normales y se obtuvo homogeneidad de varianzas, se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas para el análisis de las muestras.

##### 4.3.1.1. Estudio de la edad, del dimorfismo sexual y efecto de la localidad

El estudio de la variación del tamaño entre sexos, clases de edad y localidad se realizó sólo con animales de 40 cromosomas procedentes de poblaciones estándar con la finalidad de reducir variabilidad debida al efecto de la presencia de fusiones Robertsonianas y de la reducción del número cromosómico. Los resultados obtenidos para las cuatro estructuras fueron similares. El ANOVA de tres factores mostró diferencias significativas entre clases de edad para la norma dorsal ( $F=73,42$ ;  $p<0,001$ ) y ventral ( $F=17,35$ ;  $p<0,001$ ) del cráneo, la visión lingual de la mandíbula ( $F=13,37$ ;  $p<0,001$ ) y la norma dorsal de la escápula ( $F=2,21$ ;  $p<0,001$ ). Los animales de la clase de edad III presentaron, en todos los casos, valores del *centroid size* mayores. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre sexos, localidades o efecto de la interacción.

Puesto que no se detectó dimorfismo sexual ni efecto de la localidad pero sí diferencias significativas entre clases de edad, el estudio de la variación de los valores *centroid size* respecto a la heterocigosidad estructural y número cromosómico se realizó independientemente para cada clase de edad agrupando sexos y localidades.

##### 4.3.1.2. Estudio del efecto de la heterocigosidad estructural y del número cromosómico en el tamaño de las estructuras óseas

Los ANOVAs realizados separadamente para el estudio de los efectos grupo de heterocigosidad estructural y rango cromosómico, en el *centroid size*, mostraron resultados diversos en las dos clases de edad analizadas. Mientras que en la clase de edad II el efecto de los dos factores fue significativo en todas las estructuras (tabla 4.3), en la clase de edad III no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos de heterocigosidad estructural o

### 4.3. RESULTADOS

**Tabla 4.3.** Resultados obtenidos de los ANOVAs de un factor para estudiar el efecto de la heterocigosidad estructural y rango cromosómico, en la clase de edad II, sobre el *centroid size*. Se muestran los valores de F a partir del procedimiento MLG Tipo III de SAS para modelos no balanceados en las normas dorsal y ventral de cráneo, en la visión lingual de la mandíbula y en la visión dorsal de la escápula. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

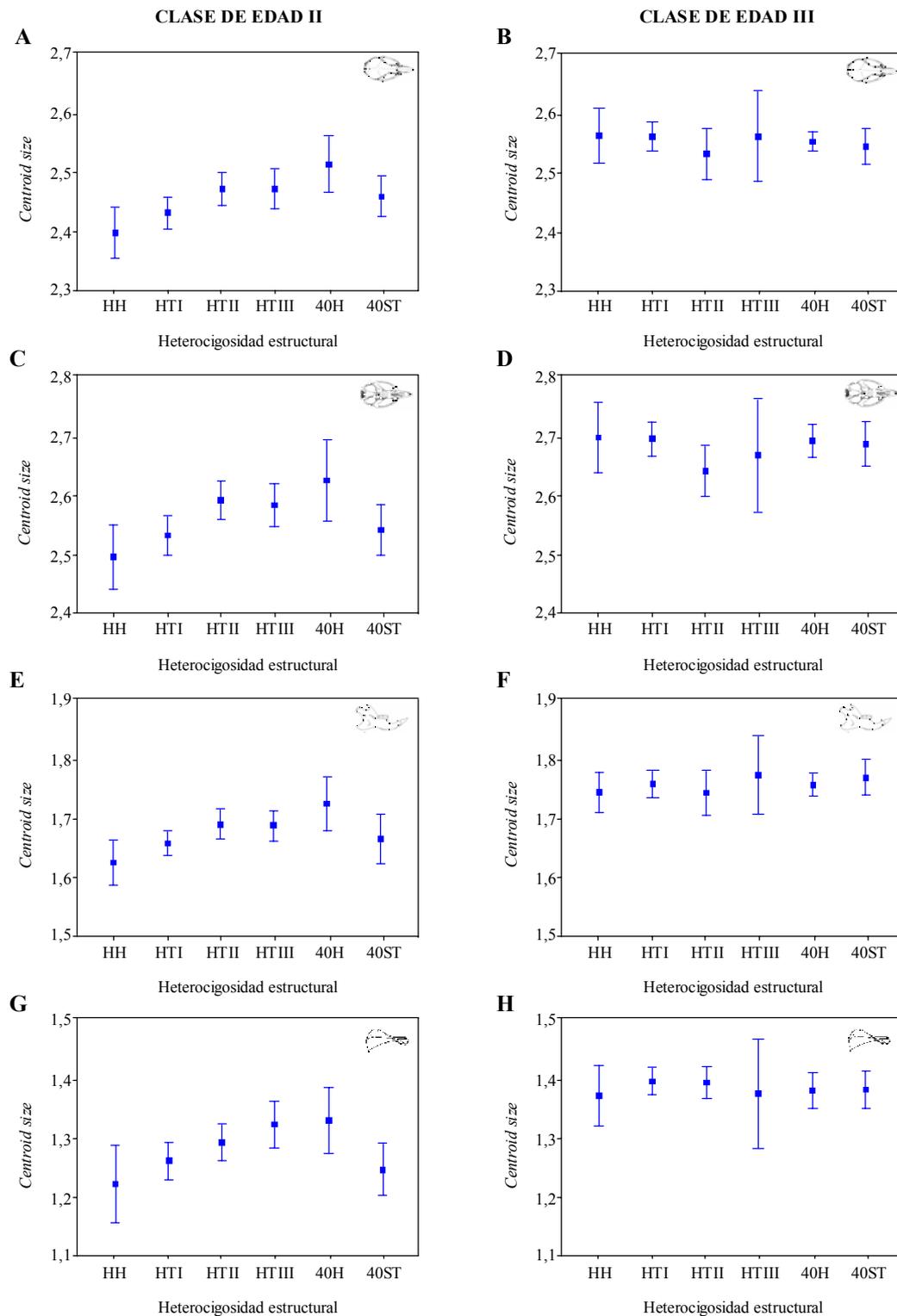
<i>Centroid Size</i>	Heterocigosidad estructural	Número cromosómico
Norma dorsal del cráneo	3,667**	2,752*
Norma ventral del cráneo	3,934**	3,109*
Norma lingual de la mandíbula	3,426**	3,864**
Norma dorsal de la escápula	2,696*	3,864**

número cromosómico en ninguna de las estructuras óseas analizadas. Un estudio más detallado de las diferencias encontradas en la clase de edad II, mediante las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey, mostró patrones similares en la mayor parte de las estructuras. Las pruebas de comparaciones múltiples realizadas entre los grupos de heterocigosidad estructural detectaron valores medios de *centroid size* significativamente menores de HH respecto a 40H (visión dorsal del cráneo:  $p < 0,01$ ; visión ventral del cráneo y mandíbula:  $p < 0,05$ ) y HTII (visiones dorsal y ventral del cráneo, mandíbula:  $p < 0,05$ ) en todas las estructuras excepto en la escápula (figura 4.3). La pruebas de comparaciones múltiples entre grupos de rango cromosómico, para las normas dorsal y ventral del cráneo y la mandíbula, mostraron diferencias significativas, entre los grupos 34-37 y 40H ( $p < 0,05$ ), estos últimos con valores más altos. En la mandíbula, se encontraron además valores significativamente menores del grupo 34-37 respecto a los animales de rango 38-39 ( $p < 0,05$ ). En la escápula sólo se encontraron diferencias significativas entre los rangos 28-30 y 31-33 ( $p < 0,05$ ), este último con valores mayores de *centroid size* (figura 4.4).

#### 4.3.2. Análisis de la conformación

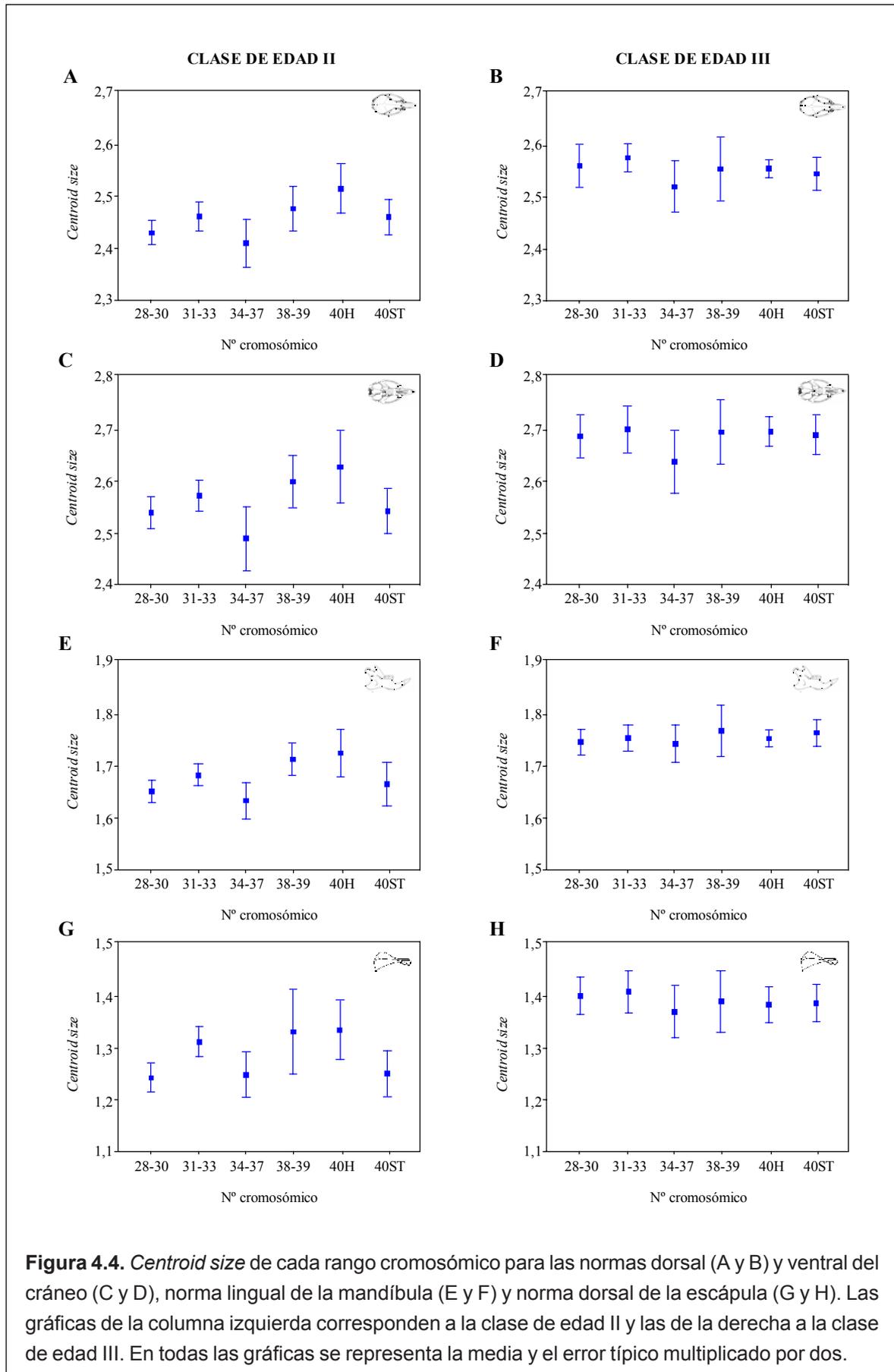
La aproximación del espacio de la forma al espacio tangente fue casi perfecta para el cráneo (visiones dorsal y ventral), la escápula y la mandíbula. La correlación entre las distancias Euclídea y de Procrustes fue  $r = 0,99$  haciendo todas las estimaciones estadísticas muy fidedignas. En todos los casos se obtuvo normalidad de las distribuciones multivariantes de las variables independientes y homogeneidad de las matrices de covarianza, por lo que se procedió a analizar los datos con pruebas estadísticas paramétricas.





**Figura 4.3.** Centroid size de cada grupo de heterocigosidad estructural para las normas dorsal (A y B) y ventral del cráneo (C y D), norma lingual de la mandíbula (E y F) y norma dorsal de la escápula (G y H). Las gráficas de la columna izquierda corresponden a la clase de edad II y las de la derecha a la clase de edad III. En todas las gráficas se representa la media y el error típico multiplicado por dos.

### 4.3. RESULTADOS



#### 4.3.2.1. Estudio de la edad, del dimorfismo sexual y del efecto de la localidad

El análisis de la varianza (MANOVA) de tres factores con interacción (sexo, edad y localidad) realizado utilizando como variables los 6 primeros *relative warps* (RW) no reveló efecto del sexo, clase de edad o localidad en ninguna de las estructuras analizadas. Los 6 primeros RW explicaron un 74,6% de la varianza para la norma dorsal del cráneo, 78,8% para la norma ventral del cráneo, un 74,95% para la norma lingual de la mandíbula y un 89,63% para norma dorsal de la escápula. Los análisis posteriores se realizaron agrupando clases de edad, sexos y localidades. Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se analizaron las componentes uniformes. En consecuencia, en los análisis posteriores se agruparon sexos, clases de edad y localidad de procedencia.

#### 4.3.2.2. Estudio del efecto de la heterocigosidad estructural y número cromosómico en el cambio de conformación de las estructuras óseas

##### Norma dorsal del cráneo

Los MANOVAs realizados para estudiar los cambios de forma total y no uniforme entre grupos de heterocigosidad estructural y rango cromosómico fueron significativos. Los cambios de forma uniforme sólo mostraron diferencias significativas entre rangos cromosómicos (tabla 4.4). Puesto que el estudio de los *relative warps* no ofreció una buena

**Tabla 4.4.** Análisis multivariante de la varianza para determinar los efectos de la heterocigosidad estructural y número cromosómico sobre la forma total ( $W'$ ), no uniforme y uniforme en las normas dorsal y ventral de cráneo, visión lingual de la mandíbula y visión dorsal de la escápula. Se muestran los valores F de la  $\lambda$  de Wilks a partir del procedimiento GLM Tipo III de SAS para modelos no balanceados. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

		Norma dorsal del cráneo	Norma ventral del cráneo	Norma lingual de la mandíbula	Norma dorsal de la escápula
Heterocigosidad estructural	$W'$	1,542***	1,750***	1,982***	1,808***
	Componentes no uniformes	1,594***	1,717***	1,963***	1,968***
	Componentes uniformes	1,136	1,672	4,688***	1,234
Número cromosómico	$W'$	1,683***	2,620***	2,730***	2,444***
	Componentes no uniformes	1,551***	2,620***	2,669***	2,523***
	Componentes uniformes	2,893**	1,949*	6,551***	2,088*

### 4.3. RESULTADOS

resolución para la separación entre los grupos de heterocigosidad estructural o rangos cromosómicos, se realizaron análisis de variables canónicas (AVC) para estudiar la diferenciación morfológica relacionada con cada uno de estos factores.

*Factor heterocigosidad estructural:* un análisis más detallado de las diferencias encontradas entre grupos para la forma total y no uniforme mediante pruebas  $T^2$  de Hotelling sobre las distancias de Mahalanobis al cuadrado mostró que todas las distancias fueron significativas a un nivel de  $p < 0,001$  (tabla 4.5).

El análisis de variables canónicas en el caso de la heterocigosidad estructural mostró dos vectores canónicos significativos que explicaron un 60,83% de la varianza. La probabilidad media de casos bien clasificados fue baja, 44,12%, con un valor mínimo de 34,78% y un máximo de 63,89% (tabla 4.6). El porcentaje mínimo correspondió a los animales HH, en los que un 39,13% se clasificó como HTI, un 21,74% como HTII y un 4,35% como 40ST. El

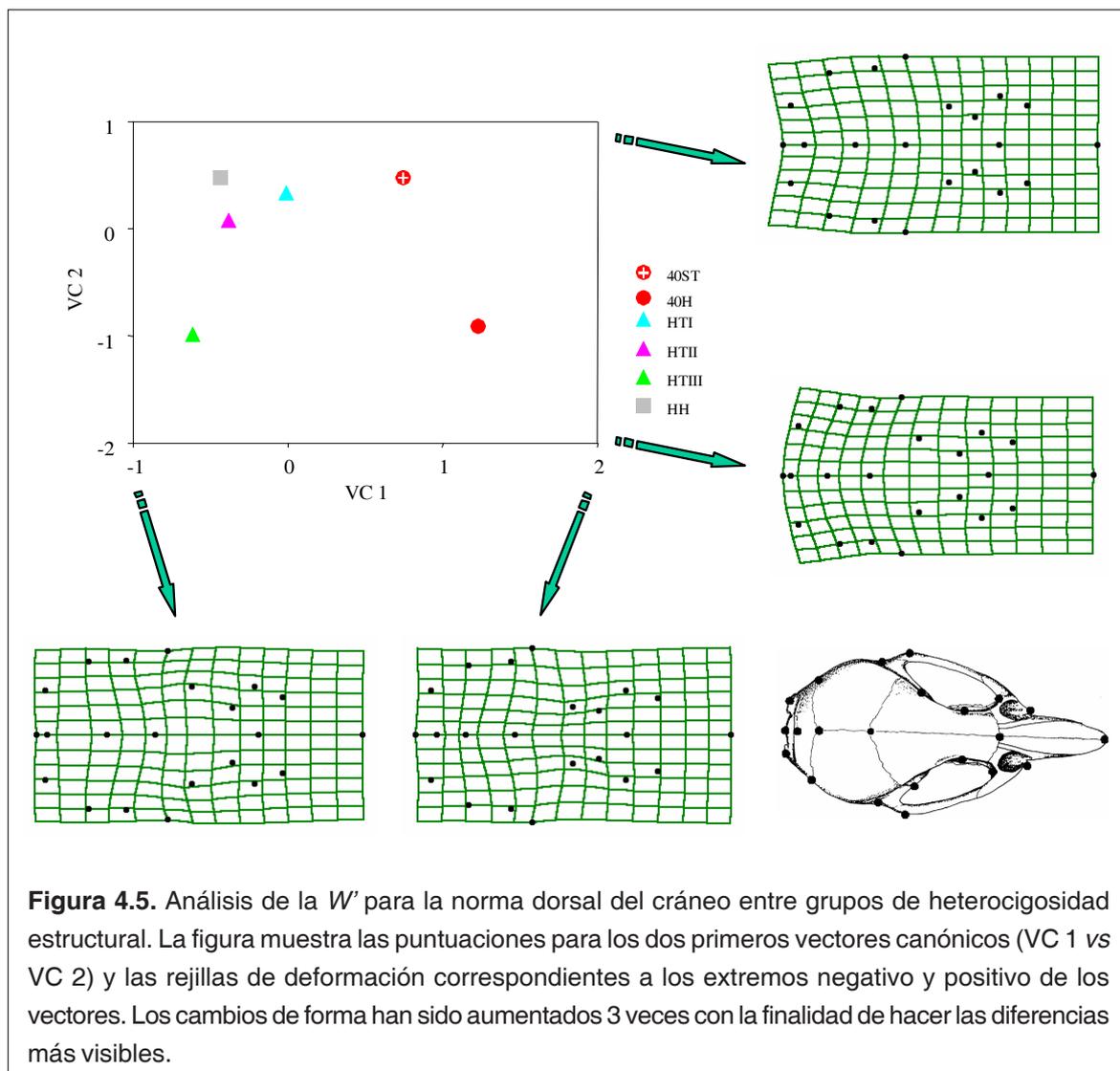
**Tabla 4.5.** Distancias de Mahalanobis al cuadrado no sesgadas entre grupos de heterocigosidad estructural para la norma dorsal del cráneo. La línea superior corresponde a la forma total, la segunda línea a la forma no uniforme y línea inferior a la uniforme. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , después de la corrección secuencial de Bonferroni. Las distancias no significativas están resaltadas en negrita.

	HH	HTI	HTII	HTIII	40H
HTI	1,87*** 1,74*** <b>0,18</b>				
HTII	1,51*** 1,44*** <b>0,17</b>	0,68*** 0,65*** <b>0,00</b>			
HTIII	3,24*** 3,03*** <b>0,38</b>	2,17*** 2,16*** <b>0,00</b>	1,47*** 1,41*** <b>0,00</b>		
40H	4,79*** 4,41*** <b>0,45</b>	3,29*** 2,87*** <b>0,00</b>	3,67*** 3,15*** <b>0,05</b>	3,84*** 3,37*** <b>0,00</b>	
40ST	2,80*** 2,50*** <b>0,02</b>	1,36*** 1,29*** <b>0,00</b>	1,71*** 1,52*** <b>0,00</b>	3,42*** 3,37*** <b>0,00</b>	2,93*** 2,65*** <b>0,10</b>

**Tabla 4.6.** Porcentajes de clasificación correcta (resaltado en negrita) e incorrecta entre los grupos de heterocigosidad estructural para las normas dorsal (CD) y ventral (CV) del cráneo, visión lingual de la mandíbula (MD) y visión dorsal de la escápula (ES).

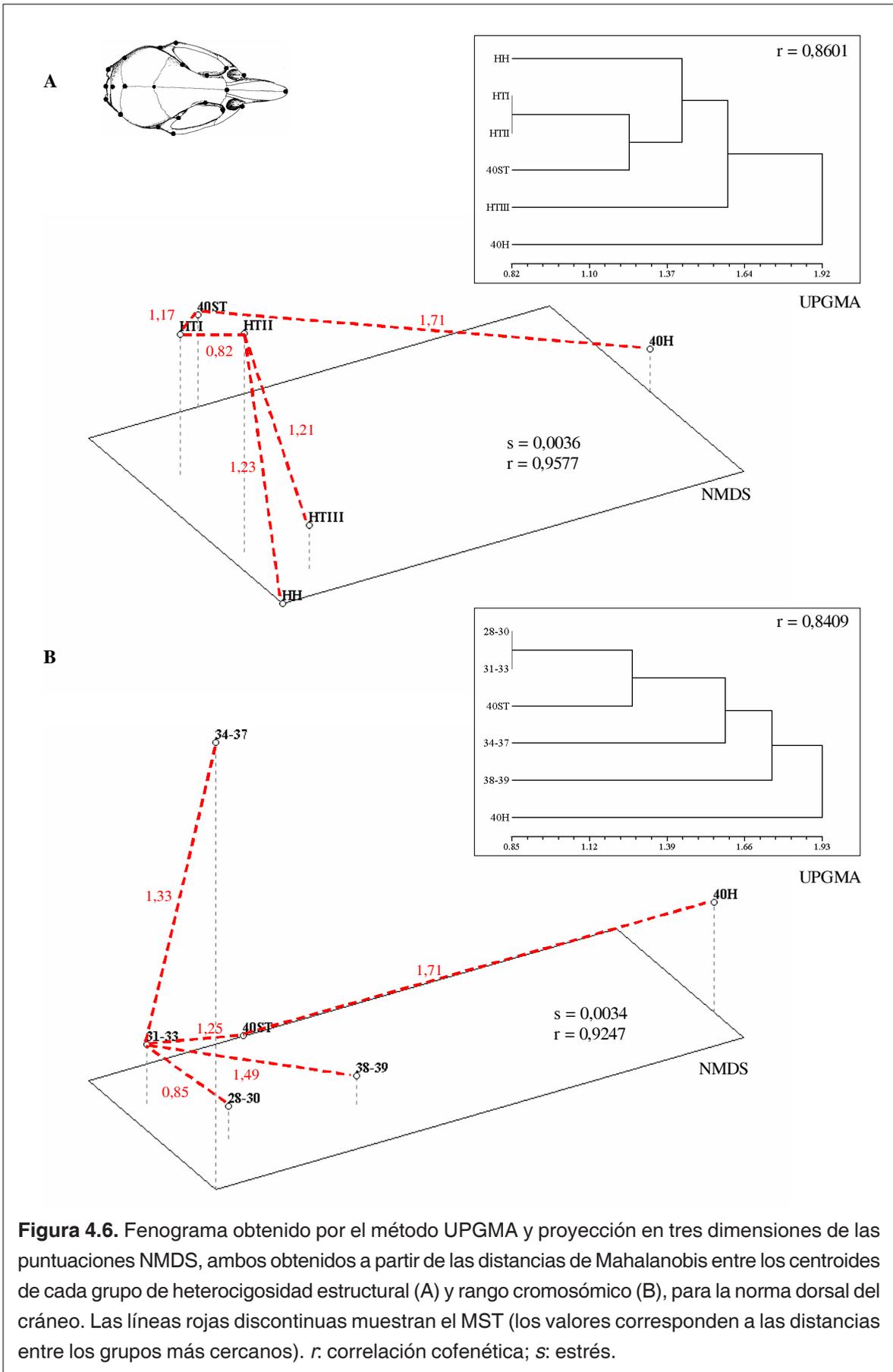
		HH	HTI	HTII	HTIII	40H	40ST
HH	CD	<b>34,78</b>	39,13	21,74	0,00	0,00	4,35
	CV	<b>54,17</b>	29,17	8,33	4,17	4,17	0,00
	MD	<b>31,82</b>	36,36	18,18	4,55	4,55	4,55
	ES	<b>21,43</b>	42,86	21,43	14,29	0,00	0,00
HTI	CD	5,56	<b>63,89</b>	11,11	5,56	4,17	9,72
	CV	4,17	<b>63,89</b>	18,06	6,94	4,17	2,78
	MD	5,41	<b>64,86</b>	16,22	6,76	2,70	4,05
	ES	1,54	<b>70,77</b>	12,31	7,69	1,54	6,15
HTII	CD	4,65	34,88	<b>37,21</b>	9,30	4,65	9,3
	CV	2,22	35,56	<b>51,11</b>	6,67	0,00	4,44
	MD	6,38	25,53	<b>48,94</b>	10,64	4,26	4,26
	ES	5,00	27,50	<b>57,50</b>	5,00	0,00	5,00
HTIII	CD	0,00	33,33	16,67	<b>43,33</b>	3,33	3,33
	CV	0,00	37,50	9,38	<b>43,74</b>	0,00	9,38
	MD	0,00	29,03	16,13	<b>41,94</b>	3,23	9,68
	ES	7,41	48,15	7,41	<b>18,52</b>	3,70	14,81
40H	CD	0,00	33,33	5,56	11,11	<b>50,00</b>	0,00
	CV	0,00	43,75	0,00	0,00	<b>43,75</b>	12,50
	MD	0,00	33,33	0,00	11,11	<b>44,44</b>	11,11
	ES	0,00	46,67	0,00	6,67	<b>40,00</b>	6,67
40ST	CD	3,23	35,48	9,68	3,23	12,9	<b>35,48</b>
	CV	3,23	12,90	9,68	3,23	0,00	<b>70,97</b>
	MD	0,00	11,76	2,94	8,82	2,94	<b>73,53</b>
	ES	0,00	32,14	17,86	0,00	0,00	<b>50,00</b>

porcentaje más elevado de casos bien clasificados lo mostraron los animales pertenecientes al grupo HTI. En la figura 4.5 están representados los dos primeros vectores canónicos con sus correspondientes rejillas de deformación. El primer vector canónico (31,59%) separó los individuos de 40 cromosomas (40ST y 40H), y el segundo vector (29,24%) separó los animales de 40 cromosomas no estándar y los HTIII del resto. En relación al primer eje canónico, las principales diferencias morfológicas de los ejemplares 40H y 40ST respecto a los otros grupos se centraron en la región interparietal y en la sutura interparietal. Estos animales presentaron un interparietal más estrecho en sentido ántero-posterior y el margen externo de la sutura frontoparietal situado más próximo a la línea media del cráneo y ligeramente desplazado hacia la parte anterior del cráneo. Respecto al segundo eje canónico,



los animales 40H y HTIII presentaron un alargamiento sagital del frontal, en sentido ántero-posterior, que conllevó a un desplazamiento en el mismo sentido de la línea media de la caja craneana respecto a los landmarks que delimitan su margen. También se observó, en estos dos últimos grupos, un ligero desplazamiento hacia la parte posterior de la sutura frontoparietal.

El fenograma obtenido con el algoritmo UPGMA a partir de las distancias de Mahalanobis entre los centroides de cada grupo de heterocigosidad estructural mostró que el grupo más diferenciado fue 40H, seguido por el HTIII. Los animales HTI y HTII quedaron próximos y unidos seguidamente a los 40ST y, en menor medida, a los HH (figura 4.6 A). El nivel de correlación cofenética mostró un ajuste “bueno” respecto a la matriz de distancias originales



### 4.3. RESULTADOS

( $r=0,8601$ ). El análisis NMDS, con una medida de estrés baja ( $s=0,0036$ ) y una correlación cofenética alta, algo mayor que para el UPGMA ( $r=0,9577$ , ajuste “muy bueno”), mostró resultados algo diferentes (figura 4.6 A). Los animales 40H quedaron claramente separados del resto. El análisis de MST mostró que el grupo más próximo a 40H fue el 40ST, y que HTII presentó más similitud con HTI, HTIII y HH que con 40ST, factor diferencial con el UPGMA.

*Factor número cromosómico:* las pruebas  $T^2$  de Hotelling sobre las distancias de Mahalanobis al cuadrado, para la forma total y no uniforme, mostraron diferencias significativas entre todos los grupos a nivel  $p<0,001$  (tabla 4.7). Las componentes uniformes sólo presentaron diferencias entre los animales de 34-37 cromosomas respecto a los de 28-30 ( $p<0,001$ ), 31-33 ( $p<0,05$ ), 38-39 ( $p<0,05$ ) y 40ST ( $p<0,05$ ). La prueba de Mantel realizada entre la matriz de distancias de Mahalanobis entre rangos cromosómicos obtenida a partir de la  $W'$  y la obtenida a partir de la  $W$  fue significativa ( $r=0,96$ ;  $p<0,001$ ), indicando que las diferencias observadas se deben especialmente a cambios de forma no uniforme.

**Tabla 4.7.** Distancias de Mahalanobis al cuadrado no sesgadas entre rangos cromosómicos para la norma dorsal del cráneo. La línea superior corresponde a la forma total, la segunda línea a la forma no uniforme y línea inferior a la uniforme. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ , después de la corrección secuencial de Bonferroni. Las distancias no significativas están resaltadas en negrita.

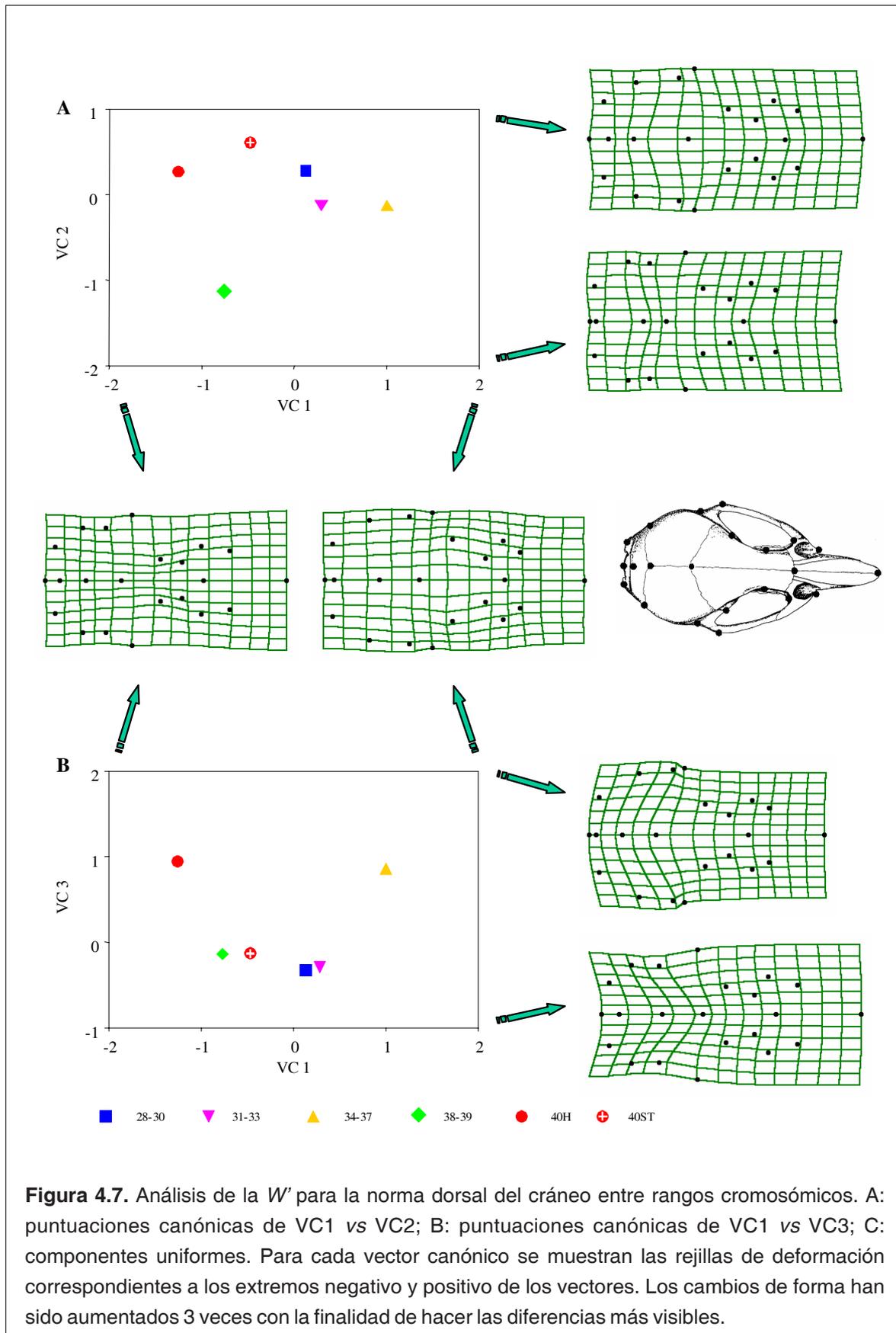
	28-30	31-33	34-37	38-39	40H
31-33	0,72*** 0,62*** <b>0,01</b>				
34-37	2,40*** 1,71*** 1,04***	1,78*** 1,36*** 0,56*			
38-39	2,77*** 1,78*** <b>0,11</b>	2,24*** 1,73*** <b>0,02</b>	4,53*** 3,59*** 0,90*		
40H	3,37*** 2,43*** <b>0,29</b>	3,75*** 3,26*** <b>0,07</b>	5,31*** 5,19*** <b>0,00</b>	3,49*** 2,96*** <b>0,40</b>	
40ST	1,65*** 1,41*** <b>0,00</b>	1,57*** 1,44*** <b>0,00</b>	3,56*** 3,44*** 0,63*	2,98*** 2,15*** <b>0,00</b>	2,92*** 2,61*** <b>0,12</b>

Se obtuvieron tres vectores canónicos significativos que explicaron un 77,32% de la varianza. El porcentaje medio de casos bien clasificados fue de 46,76% (mín. 29,03%; máx. 63,24%). El valor mínimo correspondió a los animales 40ST, que presentaron morfologías más similares a los ejemplares de número cromosómico bajo (un 35,48% se clasificaron como 31-33). El valor máximo lo obtuvieron los especímenes del grupo 31-33. De hecho, un porcentaje alto de animales de todos los grupos se clasificaron como 31-33 (tabla 4.8).

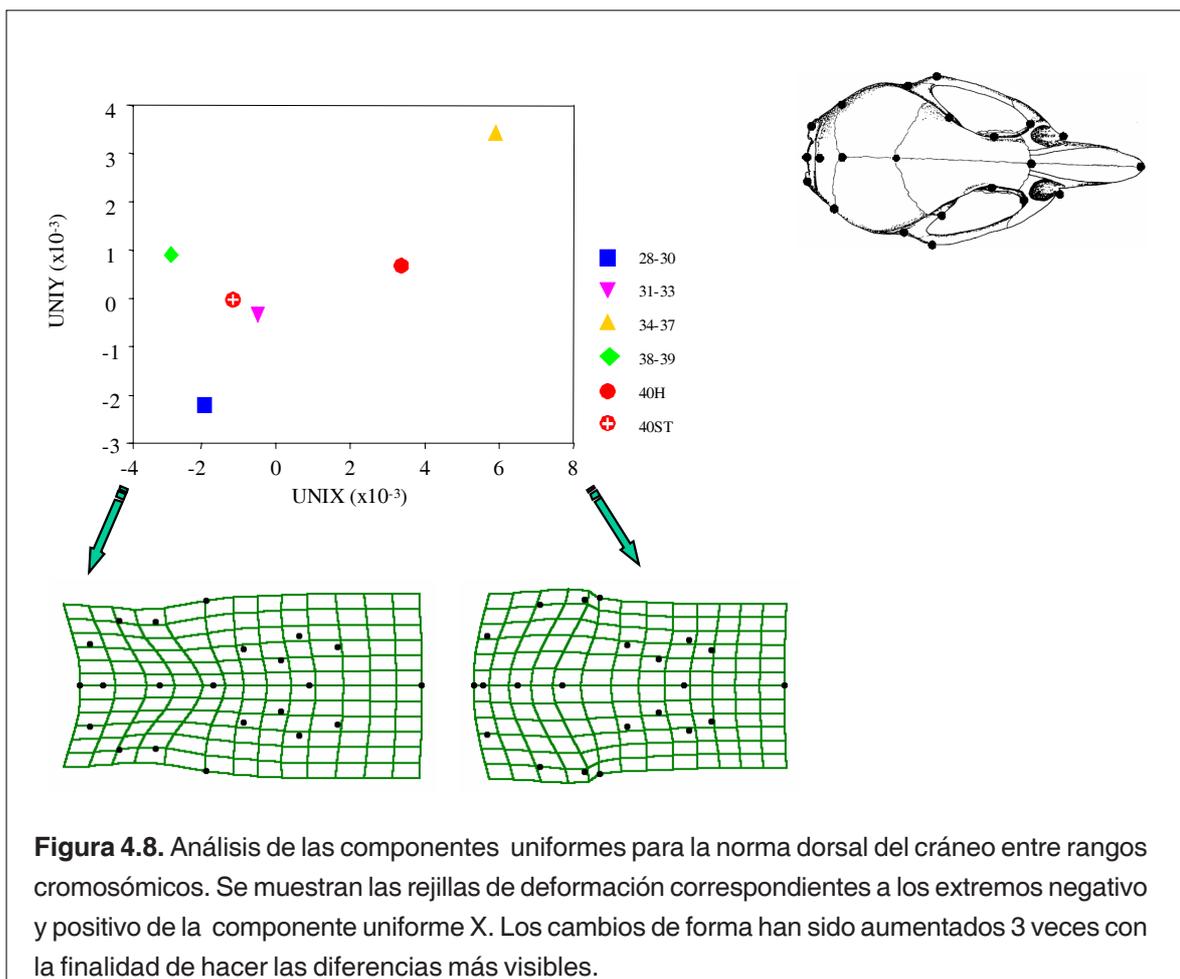
En las figuras 4.7 A y B están representados los tres primeros vectores canónicos para el cambio de forma total con sus respectivas rejillas de deformación. El primer vector canónico (36,24%) presentó valores negativos para los animales con un número diploide comprendido

**Tabla 4.8.** Probabilidades de clasificación correcta (resaltada en negrita) e incorrecta, expresadas en %, entre los rangos del número cromosómico para las normas dorsal (CD) y ventral (CV) del cráneo, la visión lingual de la mandíbula (MD) y visión dorsal de la escápula (ES).

		28-30	31-33	34-37	38-39	40H	40ST
28-30	CD	<b>40,82</b>	30,61	6,12	6,12	4,08	12,24
	CV	<b>71,70</b>	18,87	3,77	3,77	0,00	1,89
	MD	<b>67,86</b>	26,79	3,57	0,00	1,79	0,00
	ES	<b>68,29</b>	21,95	0,00	4,88	0,00	4,88
31-33	CD	17,65	<b>63,24</b>	4,41	4,41	2,94	7,35
	CV	15,71	<b>70,00</b>	4,29	1,43	2,86	5,71
	MD	17,39	<b>71,01</b>	4,35	0,00	4,35	2,90
	ES	14,75	<b>65,57</b>	4,92	8,20	1,64	4,92
34-37	CD	7,14	32,14	<b>57,14</b>	0,00	0,00	3,57
	CV	22,22	33,33	<b>40,74</b>	0,00	0,00	3,70
	MD	10,71	21,43	<b>53,57</b>	14,29	0,00	0,00
	ES	4,00	24,00	<b>44,00</b>	20,00	0,00	8,00
38-39	CD	4,35	34,78	0,00	<b>34,78</b>	17,39	8,70
	CV	4,35	17,39	0,00	<b>69,57</b>	4,35	4,35
	MD	9,52	23,81	0,00	<b>52,38</b>	4,76	9,52
	ES	10,53	42,11	5,26	<b>36,84</b>	0,00	5,26
40H	CD	16,67	16,67	0,00	11,11	<b>55,56</b>	0,00
	CV	6,25	25,00	0,00	12,50	<b>43,75</b>	12,50
	MD	0,00	22,22	5,56	16,67	<b>44,44</b>	11,11
	ES	0,00	26,67	0,00	13,33	<b>53,33</b>	6,67
40ST	CD	9,68	35,48	6,45	6,45	12,90	<b>29,03</b>
	CV	6,45	16,13	0,00	0,00	0,00	<b>77,42</b>
	MD	0,00	11,76	5,88	5,88	2,94	<b>73,53</b>
	ES	10,71	25,00	7,14	0,00	0,00	<b>57,14</b>



entre 38 y 40 cromosomas y valores positivos para los ejemplares con un número cromosómico menor. Estos últimos presentaron un interparietal más ancho en sentido ántero-posterior, un desplazamiento de la inserción del proceso zigomático del escamoso hacia la parte anterior y un ensanchamiento del cráneo localizado en esta inserción y en la sutura frontoparietal. El segundo vector canónico (20,70%) separó los animales de 38-39 cromosomas del resto. Estos mostraron un interparietal más ancho, en dirección sagital, y una reducción de la sutura interparietal y de la distancia entre el opistion y la sutura parietal-occipital. También se observó un desplazamiento hacia la parte posterior de la inserción del proceso zigomático del escamoso. El tercer vector (20,38%) separó los animales de 40 cromosomas no estándar y los de 34-37 cromosomas de los otros grupos. Este mismo patrón es el que mostraron las componentes uniformes (figura 4.8). Las deformaciones asociadas a este vector correspondieron a cambios de forma uniforme situados principalmente en la caja craneana que, en los animales pertenecientes a los grupos 34-37



### 4.3. RESULTADOS

---

y 40, fue más ancha y más corta. También se observó un desplazamiento de la línea media de la caja craneana hacia la parte anterior del cráneo.

El fenograma obtenido por el método UPGMA para las distancias de Mahalanobis entre rangos cromosómicos correspondientes a la forma total está representado en la figura 4.6 B. La correlación cofenética mostró una bondad de ajuste “buena” ( $r=0,8409$ ). Los animales 40H, de manera similar a lo que sucedió para la heterocigosidad estructural, fueron los animales más diferenciados morfológicamente. Los animales 40ST presentaron una forma próxima a los animales con un rango cromosómico bajo (28-30 y 31-33). El análisis de NMDS mostró una medida de estrés baja ( $s=0,0034$ ) y una correlación con las distancias originales alta, mostrando una bondad de ajuste “muy buena” respecto la matriz original, ( $r=0,9247$ ). El grupo más separado morfológicamente del resto fueron también los animales 40H siendo, según la representación mediante MST, el grupo más próximo a éste el formado por los individuos 40ST. Los animales de número diploide 28-30 y 34-39, tuvieron como grupo más cercano el formado por los individuos con  $2n=31-33$  (figura 4.6 B).

#### Norma ventral del cráneo

Los MANOVAs realizados separadamente para los cambios de forma total y no uniforme entre grupos de heterocigosidad estructural y número cromosómico fueron significativos ( $p<0,001$ ). Las componentes afines presentaron diferencias significativas entre rangos cromosómicos ( $p<0,05$ ), pero no entre grupos de heterocigosidad (tabla 4.4). El análisis de los *relative warps* en esta estructura tampoco ofreció una buena resolución para la separación entre grupos de heterocigosidad estructural o rangos cromosómicos, por lo que se realizaron análisis de variables canónicas para estudiar la diferenciación morfológica relacionada con cada uno de estos factores.

*Factor heterocigosidad estructural:* las pruebas  $T^2$  de Hotelling sobre las distancias de Mahalanobis al cuadrado para el cambio de forma total y no uniforme, fueron significativas en todos los casos ( $p<0,001$ ; tabla 4.9).

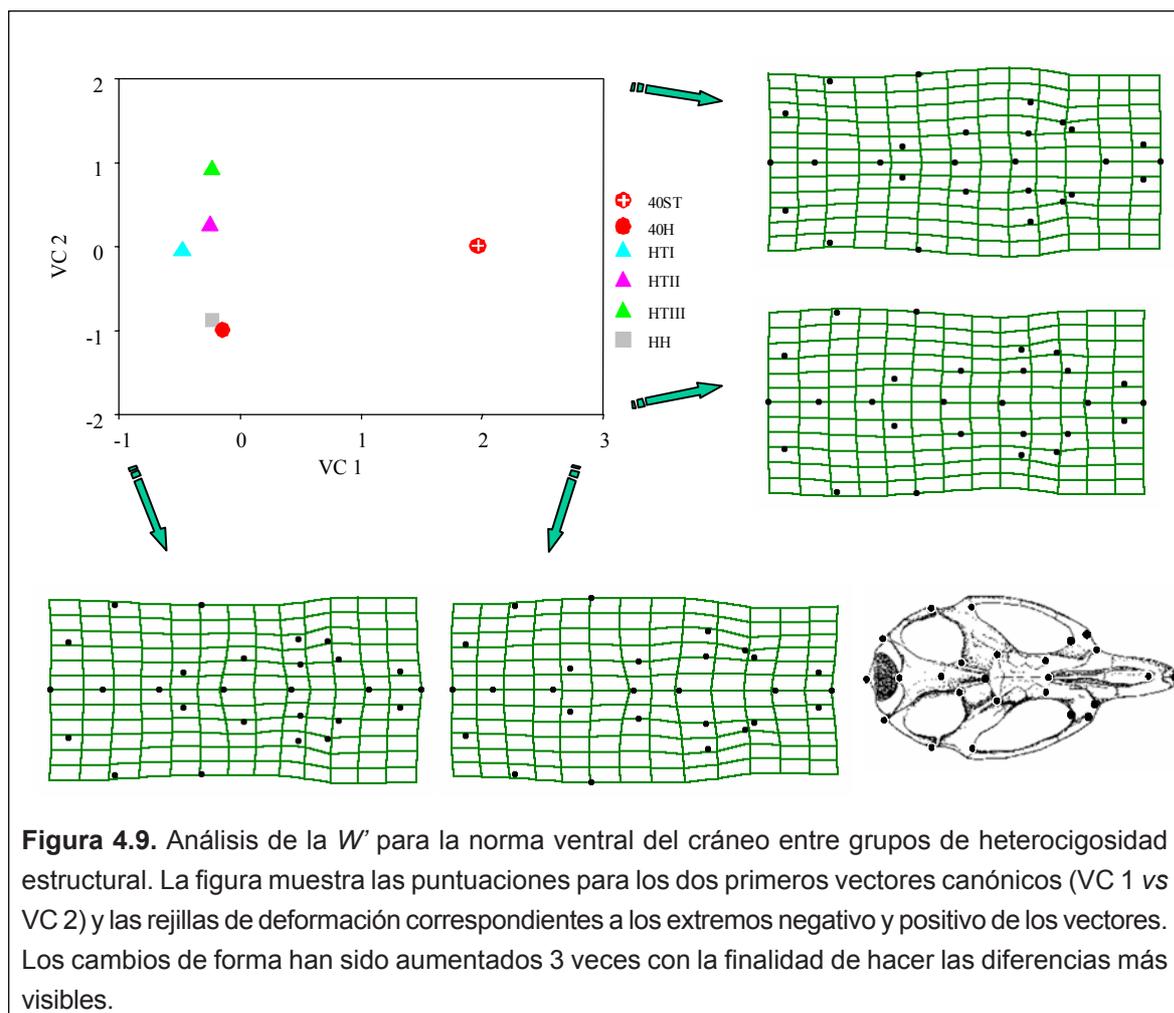
**Tabla 4.9.** Distancias de Mahalanobis al cuadrado no sesgadas entre grupos de heterocigosidad estructural para la norma ventral del cráneo. La línea superior corresponde a la forma total, la segunda línea a la forma no uniforme y línea inferior a la uniforme. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , después de la corrección secuencial de Bonferroni. Las distancias no significativas están resaltadas en negrita.

	HH	HTI	HTII	HTIII	40H
HTI	2,21*** 1,98*** <b>0,24</b>				
HTII	2,51*** 2,04*** <b>0,26</b>	1,13*** 1,05*** <b>0,00</b>			
HTIII	3,66*** 3,03*** <b>0,81</b>	1,65*** 1,55*** <b>0,08</b>	1,52*** 1,48*** <b>0,02</b>		
40H	3,90*** 3,42*** <b>0,46</b>	2,75*** 2,66*** <b>0,00</b>	3,21*** 3,21*** <b>0,00</b>	4,62*** 4,57*** <b>0,00</b>	
40ST	6,22*** 5,89*** <b>0,19</b>	5,73*** 5,24*** <b>0,00</b>	5,18*** 4,23*** <b>0,00</b>	5,65*** 4,74*** <b>0,23</b>	6,61*** 5,63*** <b>0,00</b>

El análisis de variables canónicas mostró dos vectores significativos que explicaron un 65,52% de la varianza. El porcentaje medio de casos bien clasificados fue de 54,61% (mín. 43,74%, máx. 70,97%; tabla 4.6). El porcentaje mínimo correspondió a los animales HTIII, de los que un 37,50% se clasificó como HTI, un 9,38% como HTII y un 9,38% como 40ST. El mejor porcentaje de clasificación correspondió a los animales 40ST. Ninguno de los casos mal clasificados de los animales 40ST se ubicó en el grupo 40H.

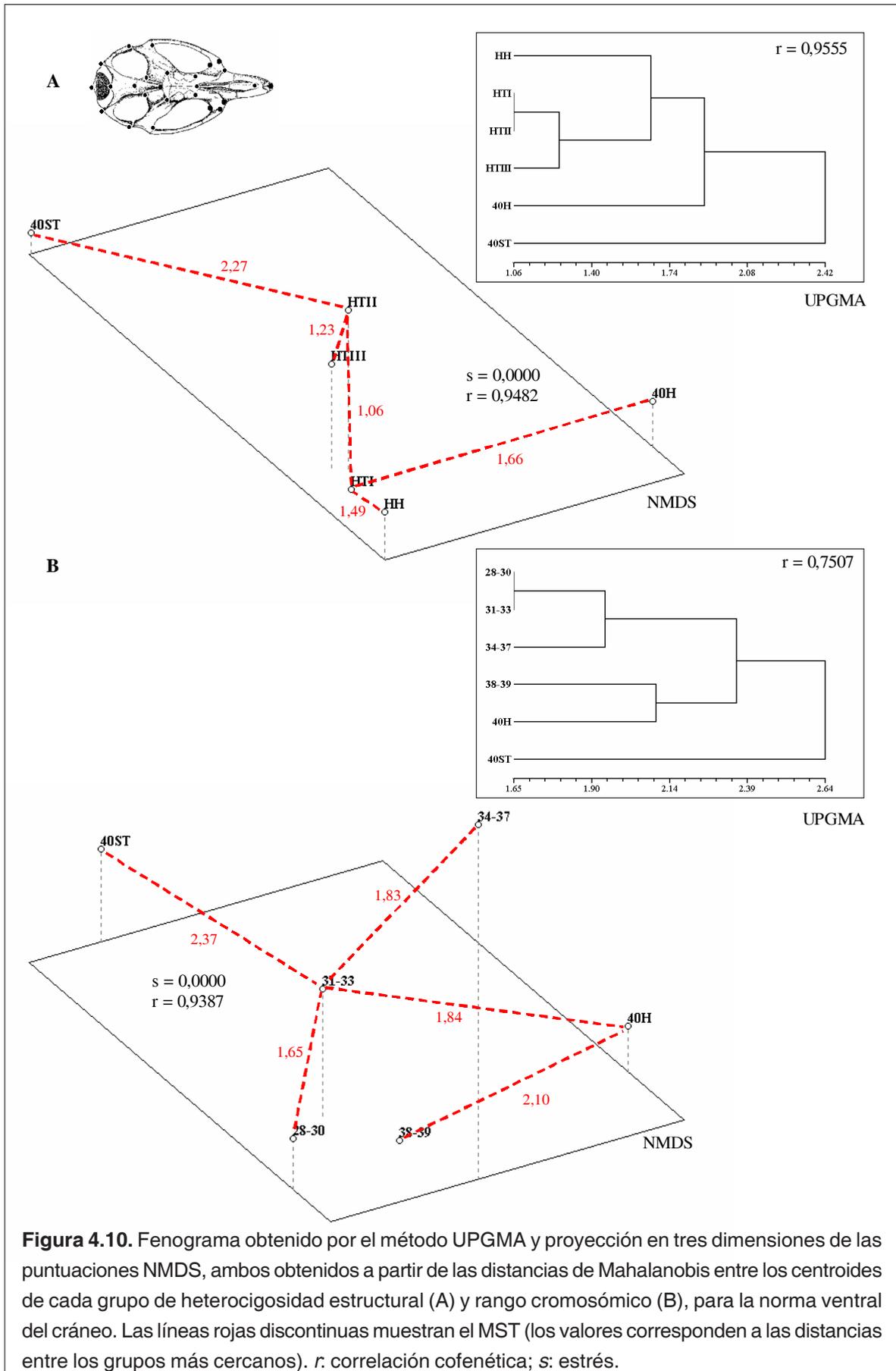
La representación gráfica de los dos primeros vectores canónicos, con sus rejillas de deformación asociadas, se encuentra en la figura 4.9. El primer vector canónico (45,21%) separó los animales estándar. Éstos mostraron desplazamiento hacia el exterior, respecto a la línea media del cráneo, de los márgenes internos de los procesos zigomáticos del escamoso y del maxilar. Esta situación podría estar relacionada con una mayor amplitud zigomática. También se observó el foramen infraorbital más estrecho y la sutura interpalatina más corta debido a un foramen incisivo más largo. El segundo vector canónico (20,31%) separó los animales de 40 cromosomas no estándar y los homocigotos estructurales del

### 4.3. RESULTADOS



resto de grupos de heterocigosidad estructural. Estos dos grupos mostraron un ensanchamiento de la parte posterior del cráneo, el rostro ligeramente más corto y un foramen infraorbital más estrecho.

El fenograma obtenido para el cambio de forma total a partir de las distancias de Mahalanobis entre los centroides de los grupos de heterocigosidad estructural está representado en la figura 4.10 A. La correlación cofenética obtenida ( $r=0,9555$ ) mostró un nivel de ajuste “muy bueno” de las distancias ultramétricas respecto las distancias originales. Los grupos formados por animales de 40 cromosomas (40H y 40ST) fueron los más diferenciados morfológicamente. Los ejemplares heterocigotos (HTI, HTII y HTIII) quedaron agrupados en un mismo conglomerado al cual se unieron los homocigotos estructurales. El análisis de NMDS mostró una medida de estrés muy baja ( $s=0,0000$ ) y una correlación con la matriz original alta ( $r=0,9482$ ). Los resultados obtenidos mediante este análisis, junto la representación



**Figura 4.10.** Fenograma obtenido por el método UPGMA y proyección en tres dimensiones de las puntuaciones NMDS, ambos obtenidos a partir de las distancias de Mahalanobis entre los centroides de cada grupo de heterocigosidad estructural (A) y rango cromosómico (B), para la norma ventral del cráneo. Las líneas rojas discontinuas muestran el MST (los valores corresponden a las distancias entre los grupos más cercanos). *r*: correlación cofenética; *s*: estrés.

### 4.3. RESULTADOS

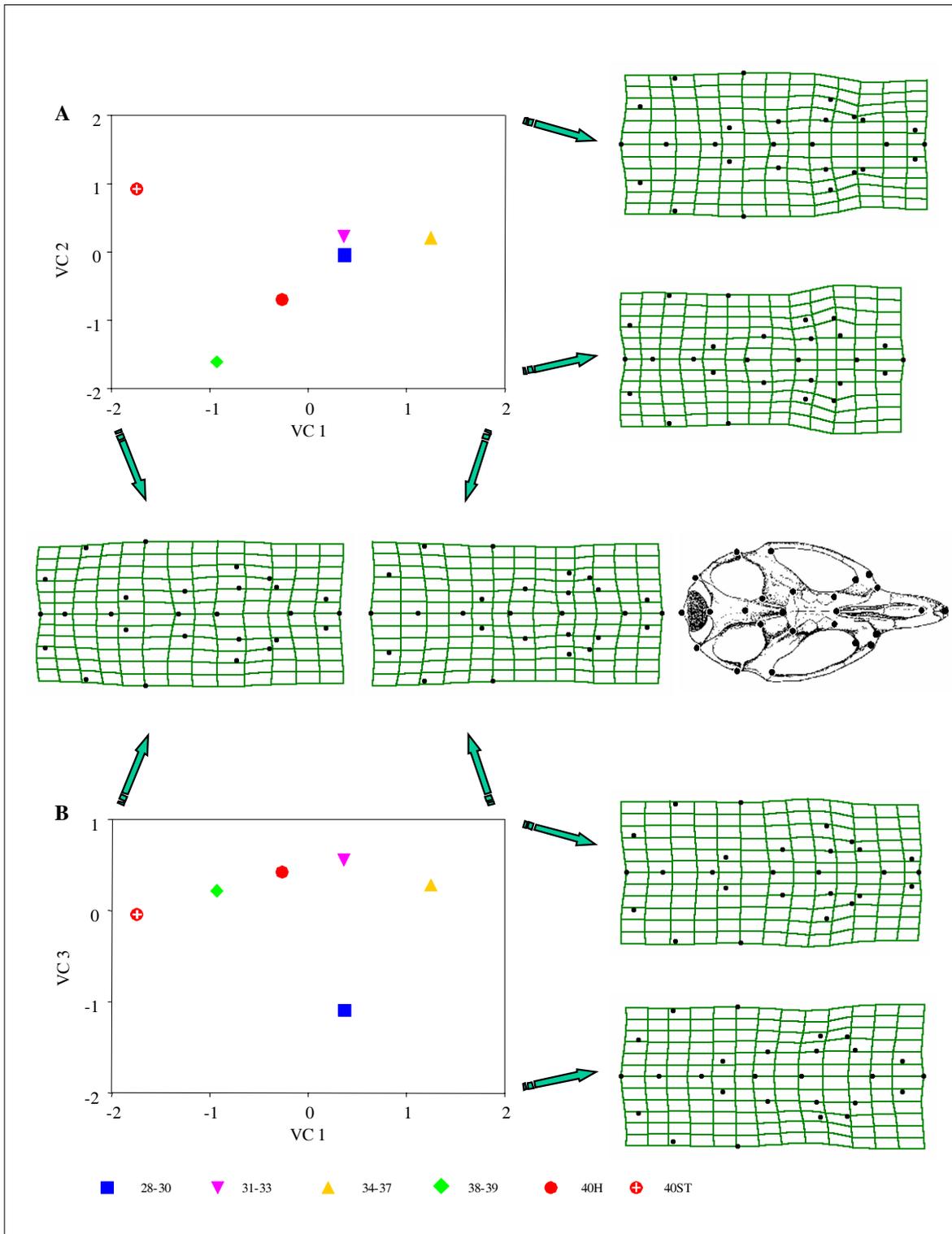
mediante MST, fueron muy similares a los del UPGMA. Se observaron tres grupos claramente diferenciados, 40ST, 40H e individuos con un 2n menor a 40 cromosomas (figura 4.10 A).

*Factor número cromosómico:* las pruebas  $T^2$  de Hotelling para las distancias de Mahalanobis al cuadrado entre rangos cromosómicos mostró diferencias similares entre todos los grupos para el cambio de forma total y no uniforme ( $p < 0,001$ ; tabla 4.10). No se encontraron diferencias significativas en las componentes uniformes. Puesto que las diferencias detectadas en el MANOVA para las componentes uniformes fueron muy débiles ( $p = 0,037$ ; tabla 4.4) y las pruebas de  $T^2$  Hotelling no dieron diferencias significativas se consideró la inexistencia de un cambio de forma afín debido al número cromosómico.

Se obtuvieron cuatro vectores canónicos significativos, que explicaron en su conjunto el 91,76% de la varianza total entre grupos relativa a la varianza dentro del grupo. Los tres primeros vectores asociados a las rejillas de deformación están representados en la figura 4.11. El cuarto vector canónico se muestra en la figura 4.12. El porcentaje medio de casos

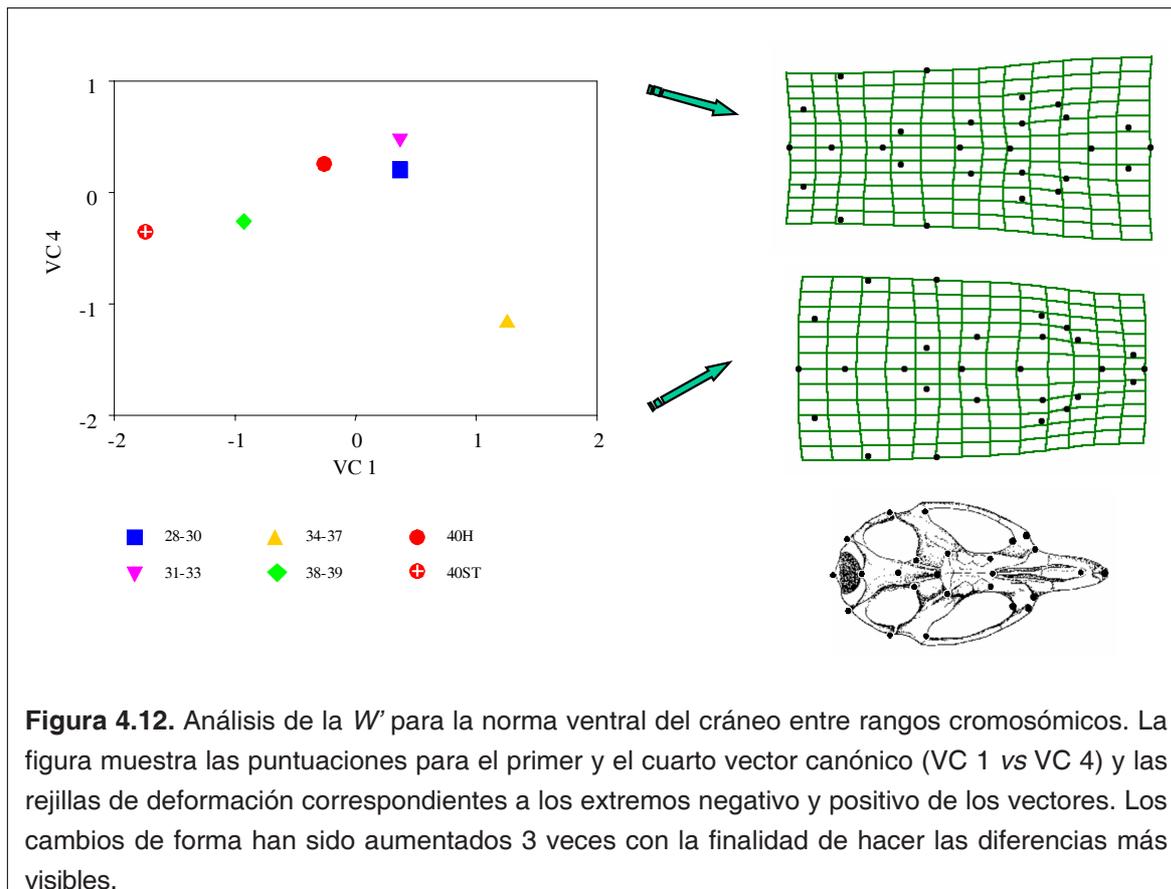
**Tabla 4.10.** Distancias de Mahalanobis al cuadrado no sesgadas entre rangos cromosómicos para la norma ventral del cráneo. La línea superior corresponde a la forma total, la segunda línea a la forma no uniforme y línea inferior a la uniforme. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , después de la corrección secuencial de Bonferroni. Las distancias no significativas están resaltadas en negrita.

	28-30	31-33	34-37	38-39	40H
31-33	2,73*** 2,50*** <b>0,22</b>				
34-37	4,21*** 4,06*** <b>0,22</b>	3,35*** 3,34*** <b>0,16</b>			
38-39	5,82*** 5,24*** <b>0,00</b>	5,57*** 4,93*** <b>0,25</b>	8,47*** 7,89*** <b>0,12</b>		
40H	4,49*** 4,17*** <b>0,00</b>	3,38*** 3,34*** <b>0,00</b>	6,24*** 6,19*** <b>0,15</b>	4,42*** 4,01*** <b>0,03</b>	
40ST	6,27*** 6,04*** <b>0,00</b>	5,63*** 4,71*** <b>0,17</b>	9,68*** 8,92*** <b>0,26</b>	6,92*** 5,83*** <b>0,00</b>	6,57*** 5,50*** <b>0,00</b>



**Figura 4.11.** Análisis de la  $W'$  para la norma ventral del cráneo entre números cromosómicos. A: puntuaciones canónicas VC1 vs VC2; B: puntuaciones canónicas VC1 vs VC3. Para cada vector canónico se muestran las rejillas de deformación correspondientes a los extremos negativo y positivo de los vectores. Los cambios de forma han sido aumentados 3 veces con la finalidad de hacer las diferencias más visibles.

### 4.3. RESULTADOS



**Figura 4.12.** Análisis de la  $W'$  para la norma ventral del cráneo entre rangos cromosómicos. La figura muestra las puntuaciones para el primer y el cuarto vector canónico (VC 1 vs VC 4) y las rejillas de deformación correspondientes a los extremos negativo y positivo de los vectores. Los cambios de forma han sido aumentados 3 veces con la finalidad de hacer las diferencias más visibles.

bien clasificados fue 62,20% (mín. 40,74%, máx. 77,42%; tabla 4.8). El porcentaje más bajo de clasificación correspondió a los animales del grupo 34-37, de los cuales, el 22,22% y el 33,33% se clasificaron como pertenecientes a los grupos 28-30 y 31-33, respectivamente. Los ejemplares del grupo 40H también mostraron un porcentaje bajo de casos bien clasificados (43,75%). El 25% de los individuos de este grupo se repartió equitativamente entre los grupos 40ST y 38-39. El mayor número de casos bien clasificados correspondió a los ejemplares 40ST, de los que ninguno se clasificó como 40H. El primer vector canónico (37,09%) mostró un patrón similar al que se obtuvo para la norma dorsal del cráneo: los animales de 38-39 y 40 cromosomas presentaron valores negativos para este vector, mientras que los restantes grupos se situaron en los valores positivos del vector. La forma asociada al primer vector canónico indicó un aumento del tamaño del foramen magnum relacionado con la reducción del número cromosómico, así como un acortamiento del basiesfenoides, un incremento de la sutura interpalatina y un ensanchamiento del foramen infraorbital. El segundo vector canónico (21,56%) por sí sólo no mostró un patrón de discriminación claro, pero combinado con el primero separó los animales estándar del resto. El vector canónico tres (19,69%)

separó los ejemplares de 28-30 cromosomas que presentaron un prostion desplazado hacia la parte anterior y una posición más proximal a la línea media del cráneo del margen interior del proceso zigomático del maxilar (figura 4.11). El cuarto vector canónico (13,41%) separó el grupo 34-37, caracterizado por la caja craneana más ancha y un acortamiento en sentido ántero-posterior del pterigoides y el rostro (figura 4.12).

El fenograma obtenido por el método UPGMA sobre la matriz de distancias de Mahalanobis de la forma total entre los centroides de los rangos cromosómicos se muestra en la figura 4.10 B. Se obtuvo una bondad de ajuste “pobre” de la matriz de distancias ultramétricas del UPGMA respecto a las distancias originales ( $r=0,7507$ ). Se pudieron diferenciar tres agrupaciones, una formada por los individuos con bajo número cromosómico (28-30, 31-33 y 34-37), otra formada por los animales de 38-39 cromosomas y 40H y finalmente los individuos 40ST, que fueron los más diferenciados morfológicamente. La representación de NMDS mostró poca distorsión de los datos originales ( $s=0,0000$  y  $r=0,9387$ ). Este método junto con el MST mostró también tres agrupaciones: 40ST, 28-37 y 28-39-40H. Cabe destacar que aunque el NMDS situó al grupo 38-39 espacialmente cercano a los grupos 28-30, 31-33 y 34-37, la representación mediante MST situó como vecino más próximo a éste el grupo formado por los individuos 40H (figura 4.10 B).

#### Norma lingual de la mandíbula

Los MANOVAs realizados independientemente para la  $W'$  y las componentes no uniformes y uniformes, en el estudio de las diferencias entre grupos de heterocigosidad estructural y número cromosómico, mostraron diferencias significativas ( $p<0,001$ ; tabla 4.4). El análisis de los *relative warps* no ofreció una buena resolución para la separación entre las diferentes localidades, grupos de heterocigosidad estructural o de rangos cromosómicos. Así, para estudiar la diferenciación morfológica relacionada con cada uno de estos factores se realizaron análisis de variables canónicas.

*Factor heterocigosidad estructural:* las pruebas  $T^2$  de Hotelling realizadas sobre las distancias de Mahalanobis al cuadrado entre los centroides de los grupos de heterocigosidad estructural,

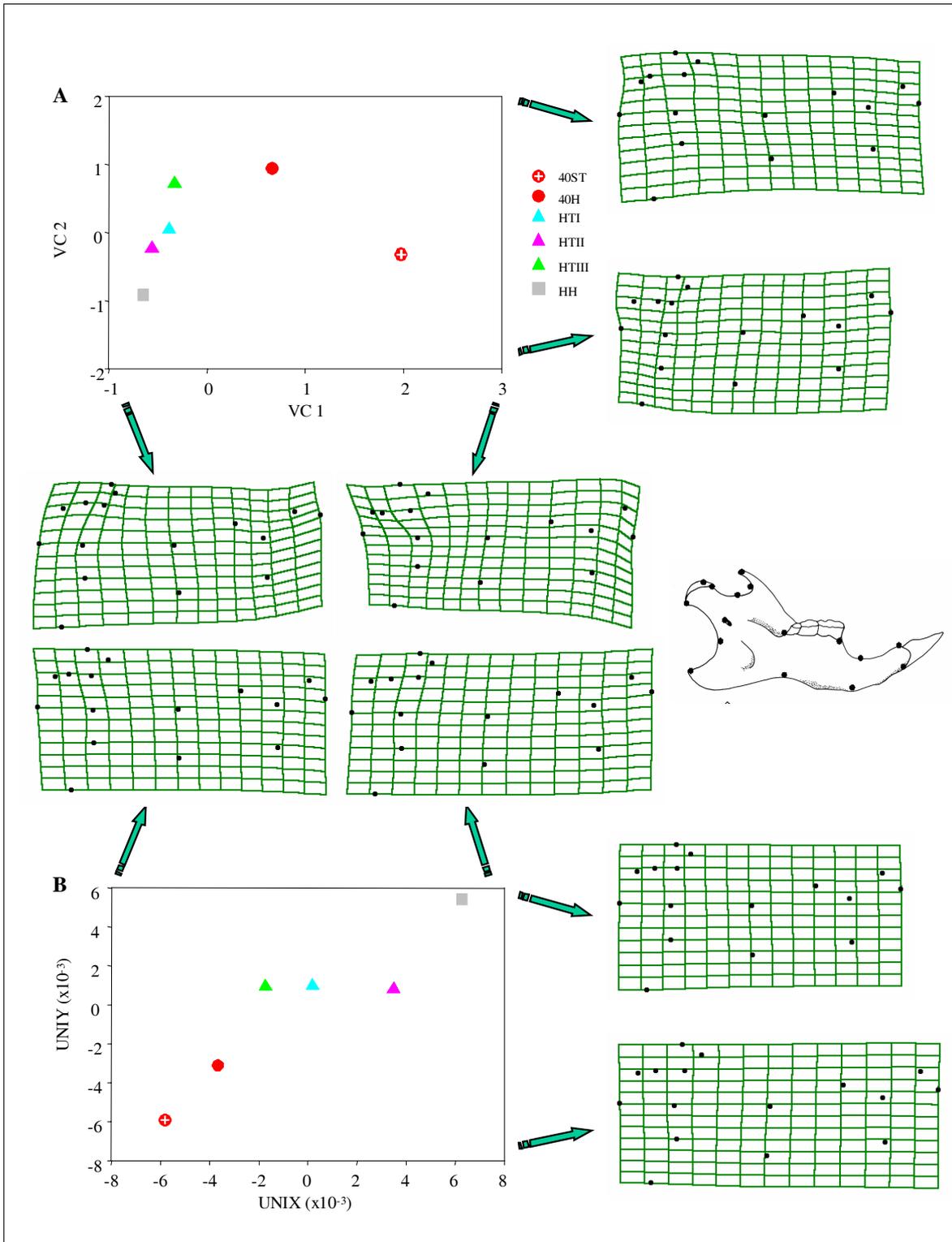
### 4.3. RESULTADOS

para la forma total y no uniforme, fueron significativas ( $p < 0,001$ ; tabla 4.11). En las componentes uniformes se obtuvieron diferencias entre los animales estándar respecto HH, HTI y HTII con un nivel de significación de  $p < 0,001$ , y respecto a HTIII con un nivel de  $p < 0,05$  (tabla 4.11). También se obtuvieron diferencias entre los animales 40H y los HH ( $p < 0,01$ ). La prueba de Mantel entre la matriz de distancias de Mahalanobis entre grupos derivada de la W y la derivada de W' fue significativa ( $r = 0,97$ ;  $p < 0,01$ ), por lo que la mayor parte de la variación de forma se explicó por las componentes no uniformes.

En el análisis de variables canónicas la probabilidad media de casos bien clasificados fue del 50,92% (mín. 31,82%; máx. 73,53%; tabla 4.6). El valor mínimo correspondió a los animales HH, que se clasificaron la mayoría como HTI (36,36%) o como HTII (18,18%). El valor máximo correspondió a los animales 40ST, y de éstos ninguno se clasificó como HH. Se obtuvieron dos vectores significativos que acumularon un 69,67% de la varianza (figura 13 A). El primer vector canónico (53,20%) separó los animales estándar del resto de grupos de

**Tabla 4.11.** Distancias de Mahalanobis al cuadrado no sesgadas entre grupos de heterocigidad estructural para la norma lingual de la mandíbula. La línea superior corresponde a la forma total, la segunda línea a la forma no uniforme y línea inferior a la uniforme. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , después de la corrección secuencial de Bonferroni. Las distancias no significativas están resaltadas en negrita.

	HH	HTI	HTII	HTIII	40H
HTI	1,49*** 1,07*** <b>0,39</b>				
HTII	1,48*** 1,10*** <b>0,21</b>	1,13*** 1,09*** <b>0,01</b>			
HTIII	3,67*** 2,99*** <b>0,53</b>	1,63*** 1,60*** <b>0,00</b>	1,54*** 1,43*** <b>0,09</b>		
40H	5,39*** 3,59*** 1,42**	3,17*** 2,67*** <b>0,19</b>	4,39*** 3,70*** <b>0,39</b>	4,31*** 4,03*** <b>0,08</b>	
40ST	7,48*** 5,92*** 2,53***	5,79*** 5,43*** 0,79***	6,47*** 5,99*** 1,07***	6,36*** 6,18*** 0,63*	4,87*** 4,84*** <b>0,00</b>



**Figura 4.13.** Análisis de la  $W'$  para la norma lingual de la mandíbula entre grupos de heterocigosidad estructural. A: puntuaciones canónicas de VC1 vs VC2. B: Componentes uniformes. Para cada vector canónico y cada componente uniforme se muestran las rejillas de deformación correspondientes a los extremos negativo y positivo de los vectores. Los cambios de forma han sido aumentados 3 veces con la finalidad de hacer las diferencias más visibles.

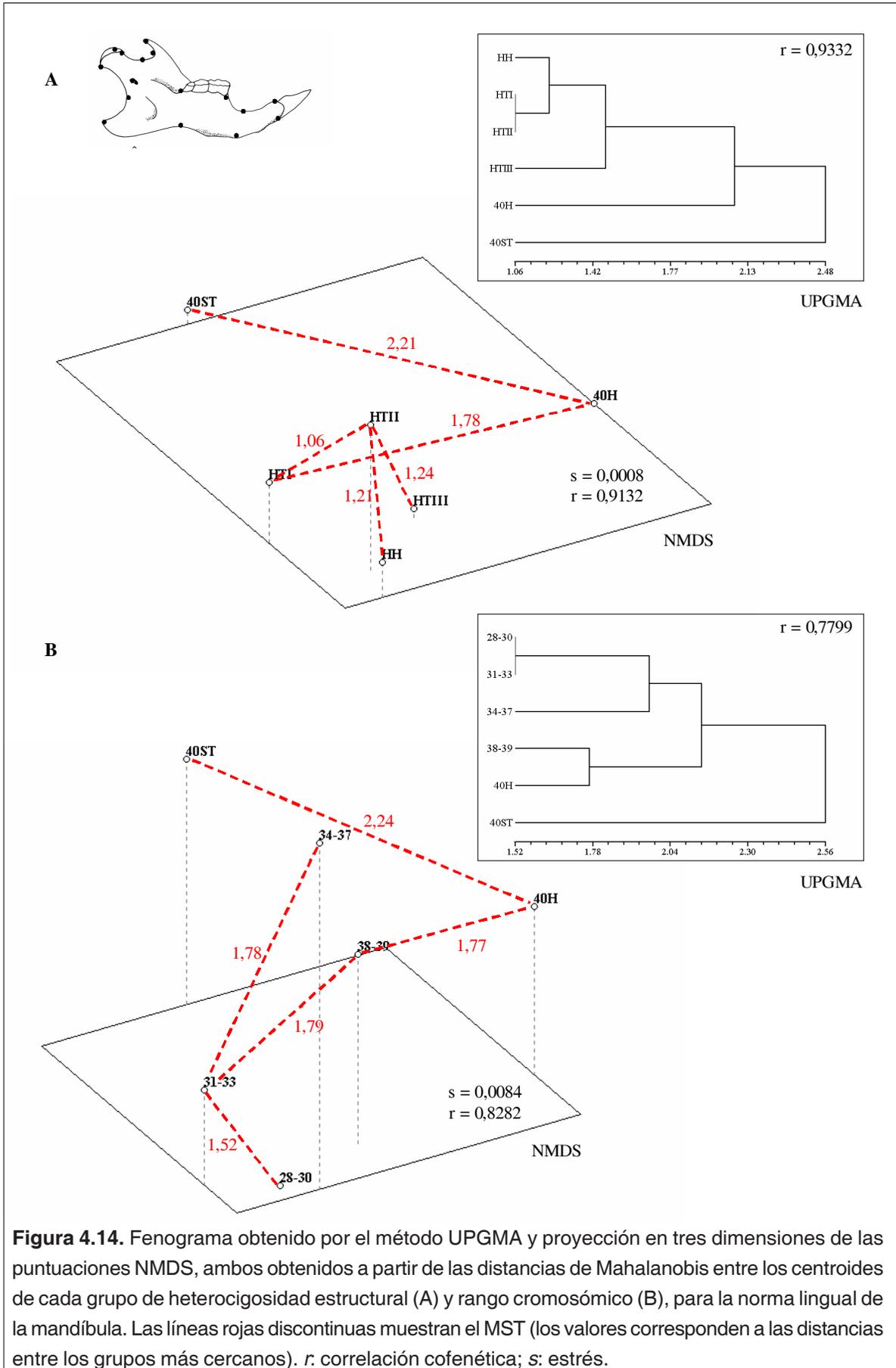
### 4.3. RESULTADOS

---

heterocigosidad, quedando con valores intermedios los animales de 40 cromosomas no estándar. Los animales estándar presentaron el proceso coronoide mayor, el proceso articular más estrecho y una menor curvatura del diastema. El segundo vector (16,46%) no mostró un patrón claro de discriminación. La representación gráfica de las componentes uniformes se encuentra en la figura 4.13 B. La combinación de ambas componentes separó tres grupos gráficamente: uno formado por los animales de 40 cromosomas con valores negativos en ambas componentes, otro formado por los animales heterocigotos estructurales, con valores intermedios, y por último el compuesto por los animales homocigotos estructurales, con puntuaciones positivas y elevadas. Las rejillas de deformación asociadas mostraron cómo la componente *UniX* correspondió a un cambio de forma por deslizamiento o *shear*, principalmente en la zona del proceso coronoide y articular. Esta área se desplaza hacia la parte posterior de la mandíbula en los animales de 40 cromosomas (40H y 40ST), patrón que también se visualizó en el VC 1. La componente *UniY* correspondió al cambio de forma por dilatación o *dilation*, en la que los animales de 40 cromosomas (40H y 40ST) presentaron una mandíbula más alargada (figura 4.13B).

El fenograma obtenido por el método de UPGMA a partir de las distancias de Mahalanobis, entre los centroides de cada grupo de heterocigosidad estructural, mostró un nivel de ajuste “muy bueno” respecto a la matriz de distancias originales ( $r=0,9332$ ). Los grupos más diferenciados fueron, al igual que sucedió para la visión ventral del cráneo, los que presentaron un  $2n=40$  (40H y 40ST; figura 4.14 A). Los grupos HTI, HTII y HH se agruparon en un mismo conglomerado, al que se unieron los individuos HTIII. El método de análisis NMDS mostró una baja distorsión de los datos originales ( $s=0,0008$  y  $r=0,9132$ ) y los resultados obtenidos por este análisis de ordenación fueron similares a los mostrados por el UPGMA. Se observaron tres grupos diferenciados, uno formado por los animales 40ST, otro por los 40H y un tercer grupo que incluyó todos los heterocigotos y homocigotos estructurales (HTI, HTII, HTIII y HH). El vecino más próximo de 40ST, según el análisis MST, fue 40H (figura 4.14 A).

*Factor número cromosómico:* las pruebas  $T^2$  de Hotelling para las matrices de distancias de Mahalanobis al cuadrado obtenidas a partir de la  $W'$  y  $W$  fueron significativas ( $p<0,001$ ) para todas las comparaciones. Para los cambios de forma afín (tabla 4.12) sólo se encontraron



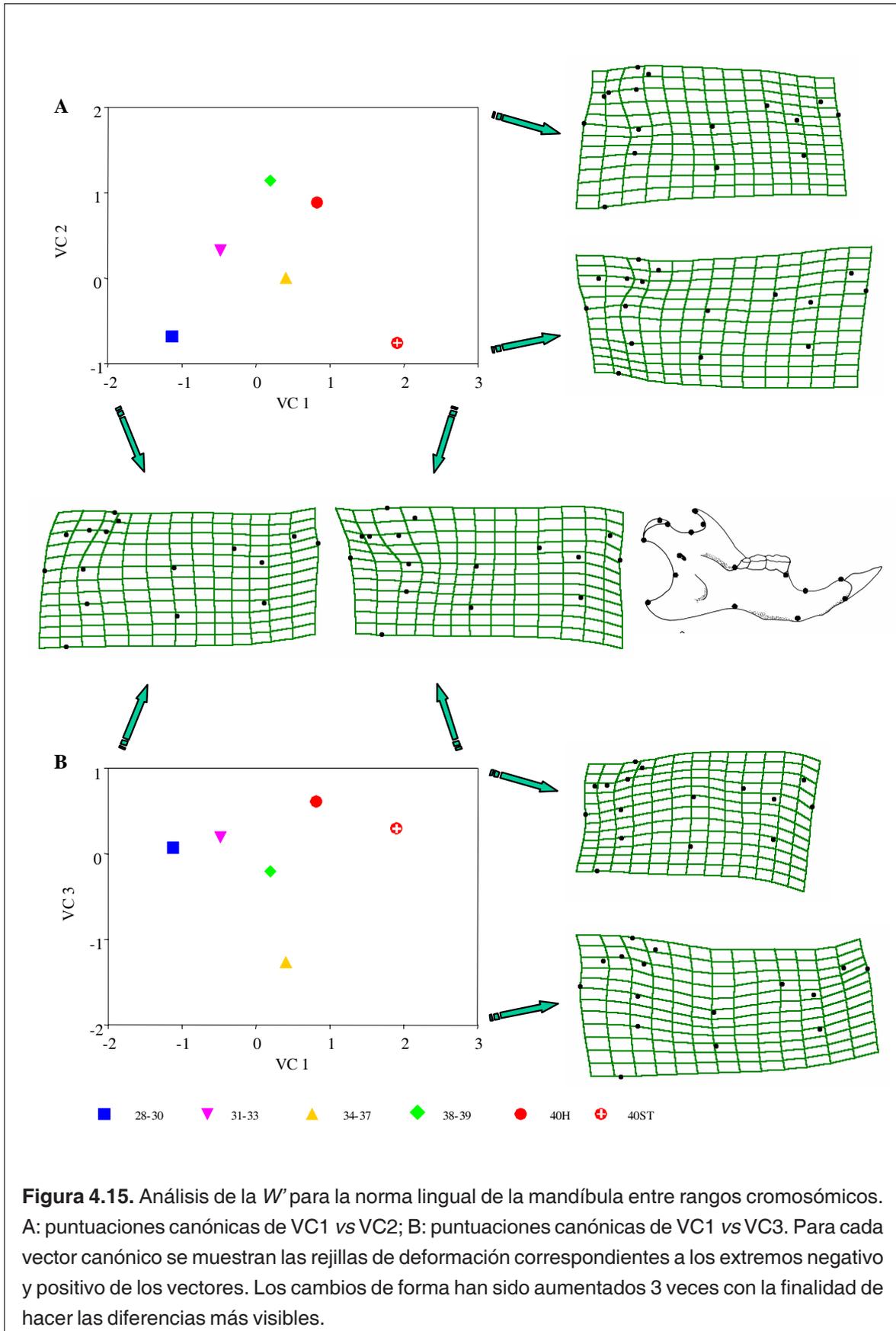
### 4.3. RESULTADOS

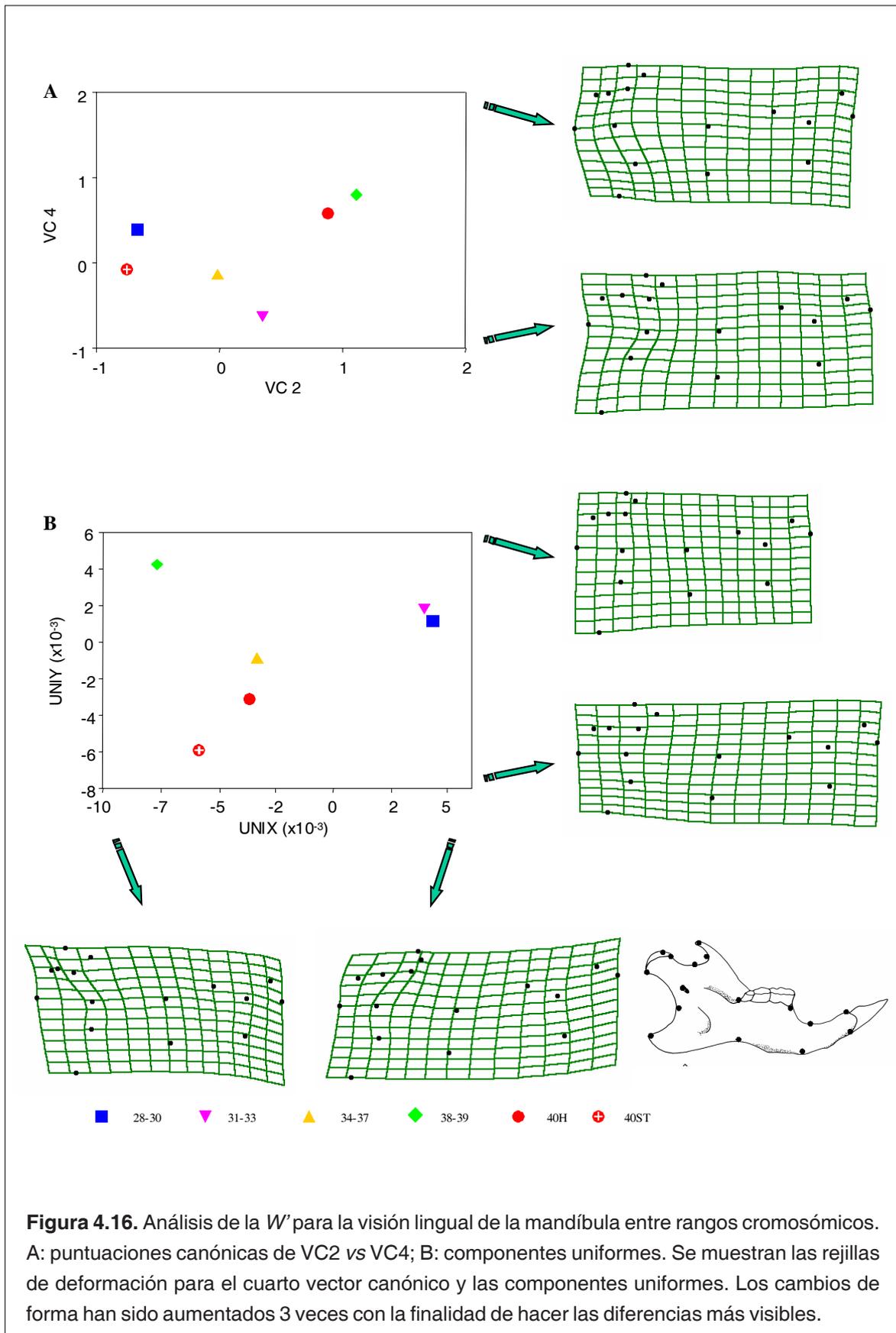
diferencias significativas entre los animales de 40 cromosomas estándar y los rangos 28-30, 31-33 y 38-39 ( $p < 0,001$ ), y entre el rango 38-39 respecto 28-30 ( $p < 0,001$ ) y 31-33 ( $p < 0,01$ ). La correlación entre la matrices de distancias de Mahalanobis obtenidas a partir de la  $W'$  y  $W$  para los rangos cromosómicos fue significativa ( $r = 0,9785$ ;  $p < 0,01$ ), lo que indicó que el mayor cambio de forma se debe a las componentes no uniformes.

Se obtuvieron cuatro vectores canónicos significativos en el análisis de variables canónicas (figura 4.15 y 4.16 A), que acumularon un 93,79% de la varianza. La probabilidad media de casos bien clasificados fue de 60,47% (mín. 44,44%; máx. 73,53%). El valor mínimo correspondió a los animales del grupo 40H, en los que un 22,22% se clasificaron como 31-33. El valor máximo de clasificación lo obtuvieron los animales 40ST (tabla 4.8). El primer vector canónico explicó el 49,17% de la varianza y tendió a ordenar, en sentido negativo-positivo, los rangos en número creciente. El patrón de cambio de forma para este vector fue el mismo que el encontrado en el primer vector canónico del análisis para los grupos de

**Tabla 4.12.** Distancias de Mahalanobis al cuadrado no sesgadas entre rangos cromosómicos para la norma lingual de la mandíbula. La línea superior corresponde a la forma total, la segunda línea a la forma no uniforme y línea inferior a la uniforme. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , después de la corrección secuencial de Bonferroni. Las distancias no significativas están resaltadas en negrita.

	28-30	31-33	34-37	38-39	40H
31-33	2,30*** 2,22*** <b>0,00</b>				
34-37	4,65*** 4,16*** <b>0,37</b>	3,16*** 2,80*** <b>0,37</b>			
38-39	5,36*** 4,64*** 1,20***	3,22*** 2,25*** 1,07**	3,80*** 3,29*** <b>0,43</b>		
40H	6,74*** 5,65*** <b>0,53</b>	3,95*** 3,17*** <b>0,58</b>	4,86*** 4,72*** <b>0,00</b>	3,12*** 2,10*** <b>0,78</b>	
40ST	9,12*** 8,19*** 1,26***	6,81*** 6,20*** 1,35***	5,05*** 4,92*** <b>0,25</b>	7,09*** 5,97*** 1,42***	5,05*** 5,02*** <b>0,00</b>





heterocigosidad estructural. El segundo vector canónico (20,23%) separó los grupos 40ST y 28-30 del resto de rangos. Estos ejemplares mostraron una depresión de la mandíbula localizada en la zona posterior y el proceso angular, y una separación entre el margen posterior del cóndilo articular respecto al incisivo. El tercer vector canónico (12,91%) separó los animales de 34-37 cromosomas, que presentaron una mandíbula más alargada y estrecha que el resto. Entre los vectores canónicos segundo y cuarto, que acumularon conjuntamente el 31,70% de la varianza, determinaron tres grupos: uno formado por los animales 40ST y 28-30, otro constituido por los grupos 38-39 y 40H, y finalmente el integrado por los ejemplares pertenecientes a los rangos 31-33 y 34-37 (figura 4.16 A). La representación gráfica de ambas componentes uniformes mostró la separación de tres grupos: 28-30 y 31-33; 38-39; y finalmente 40H, 40ST y 34-37 (figura 4.16 B). La componente *UniX* aportó información sobre el deslizamiento de la parte dorsal de la mandíbula respecto a la ventral. La componente *UniY* dio información sobre la compresión ántero-posterior de la estructura.

En la figura 4.14 B se muestra el fenograma obtenido a partir de las distancias de Mahalanobis calculadas entre los centroides de los rangos cromosómicos para el cambio de forma total. La correlación cofenética ( $r=0,7799$ ) mostró un nivel de ajuste “pobre” respecto a la matriz de distancias originales. Se obtuvo el mismo patrón de agrupación que para la norma ventral del cráneo. Los animales entre 28 y 37 cromosomas quedaron agrupados en un conglomerado, al cual se le unió el formado por los grupos 38-39 y 40H. Los ejemplares 40ST fueron los más diferenciados morfológicamente. El NMDS presentó poca distorsión respecto a los datos originales ( $s=0,0084$ ;  $r=0,8282$ ). Se observó una clara diferenciación del grupo 40ST respecto el resto (figura 4.14 B). Cabe destacar que el grupo más próximo de los individuos 40H, según la representación MST, fue el formado por los individuos con un  $2n$  comprendido entre 38 y 39 cromosomas.

#### Norma dorsal de la escápula

Los MANOVAs para los cambios de forma total y no uniforme mostraron diferencias significativas entre grupos de heterocigosidad estructural y rangos cromosómicos ( $p<0,001$ ; tabla 4.4). El cambio de forma afín sólo mostró diferencias significativas entre rangos

### 4.3. RESULTADOS

cromosómicos ( $p < 0,05$ ). Al igual que en el resto de estructuras, el análisis de los *relative warps* no ofreció una buena resolución para la separación entre grupos de heterocigosidad estructural o de rangos cromosómicos, por lo que se realizaron análisis de variables canónicas para estudiar la diferenciación morfológica relacionada con cada uno de estos factores.

*Factor heterocigosidad estructural:* las pruebas  $T^2$  de Hotelling sobre las distancias de Mahalanobis al cuadrado entre grupos, para la forma total y no uniforme, mostraron diferencias significativas en todos los casos (tabla 4.13).

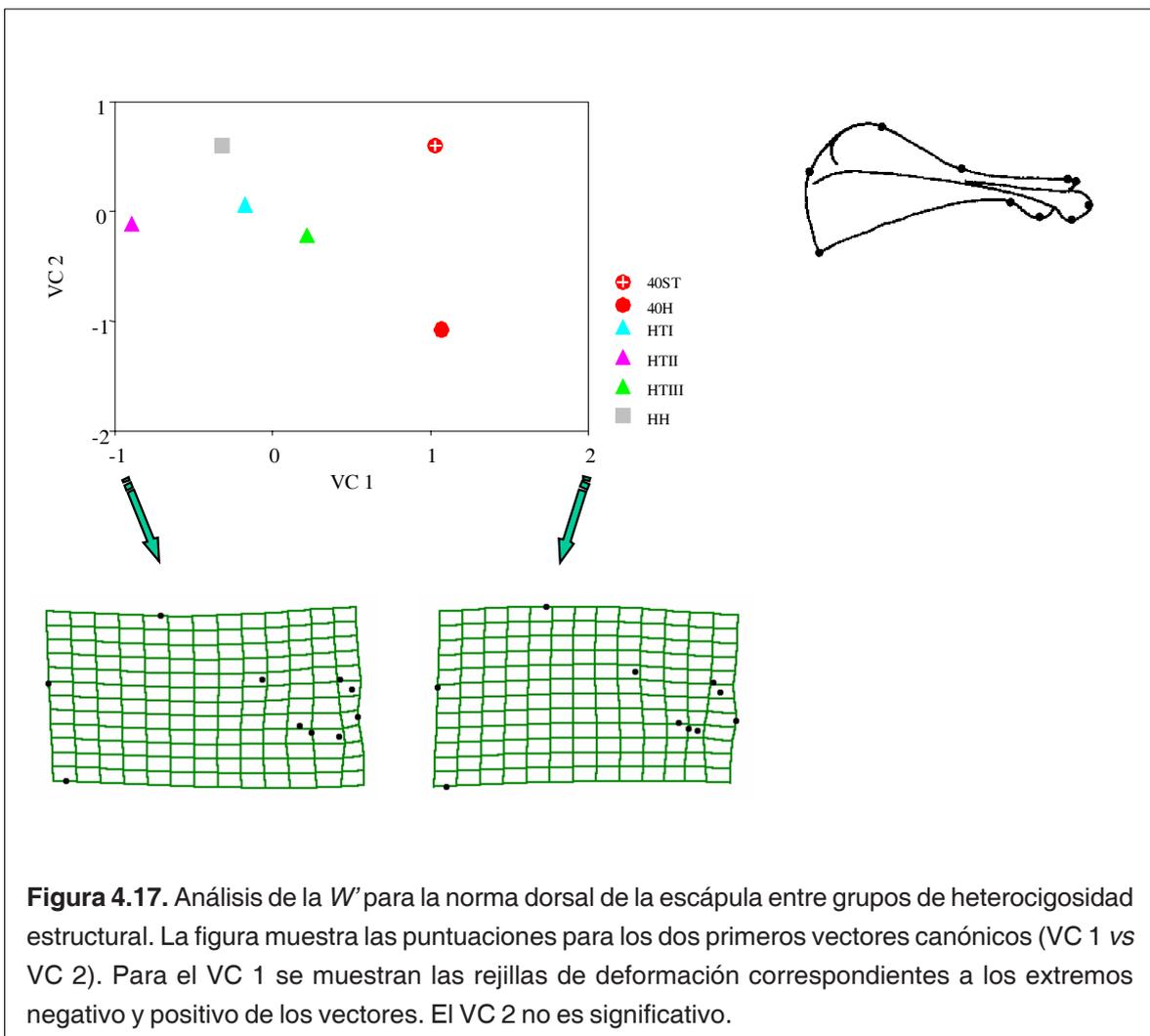
Se obtuvo un vector canónico significativo que acumuló el 50,65% de la varianza. La probabilidad media de clasificación fue de 43,04% (mín. 18,52%; máx. 70,77%; tabla 4.6). Los porcentajes más bajos de clasificación correspondieron a los grupos HH y HTIII, con 21,23% y 18,52%, respectivamente. Ambos tuvieron un porcentaje de confusión con los HTI elevado: 42,86% para HH y 48,15% para HTI. Los animales 40H presentaron también una

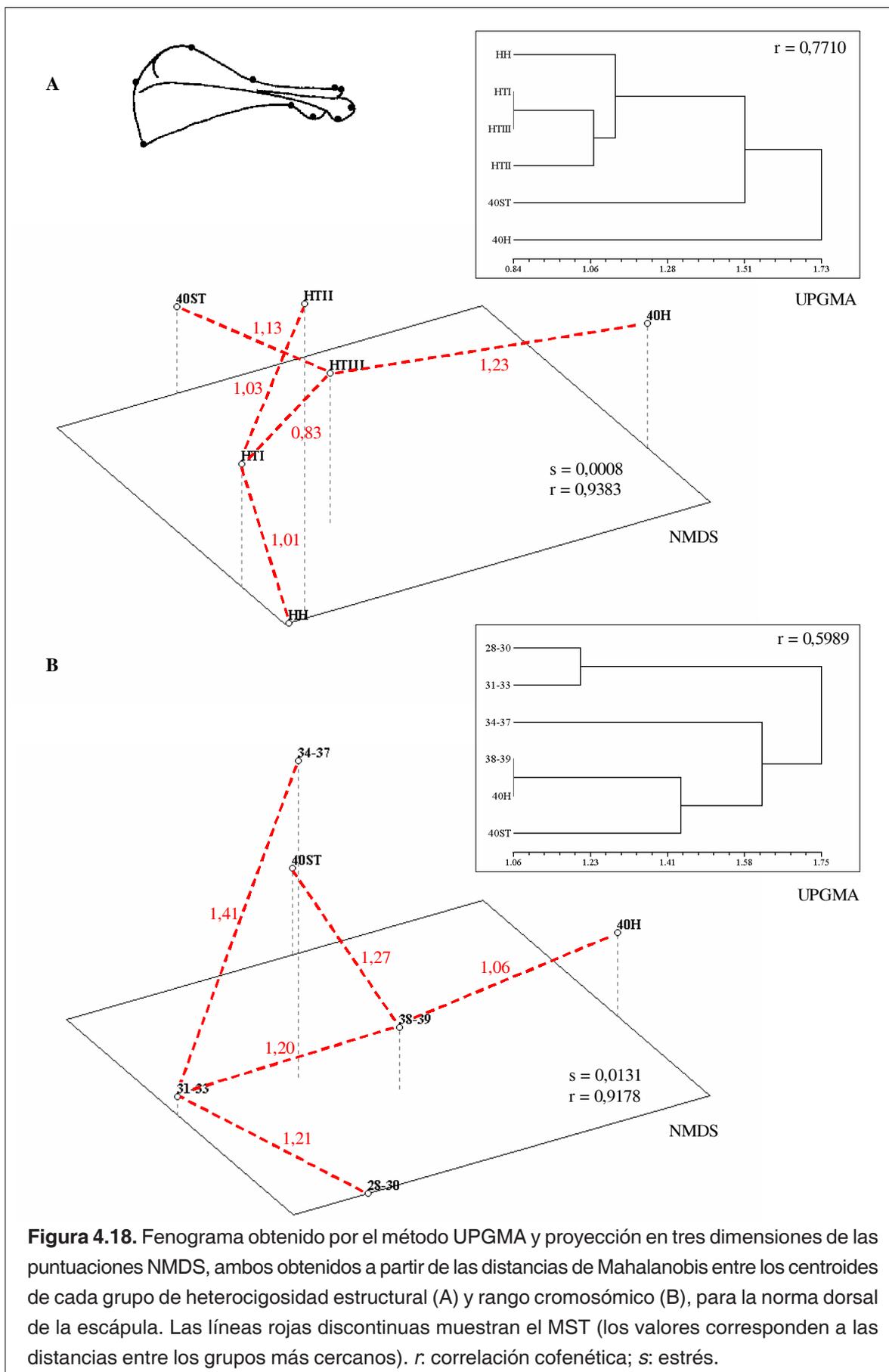
**Tabla 4.13.** Distancias de Mahalanobis al cuadrado no sesgadas entre grupos de heterocigosidad estructural para la norma dorsal de la escápula. La línea superior corresponde a la forma total, la segunda línea a la forma no uniforme y línea inferior a la uniforme. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , después de la corrección secuencial de Bonferroni. Las distancias no significativas están resaltadas en negrita.

	HH	HTI	HTII	HTIII	40H
HTI	1,03** 0,87* <b>0,16</b>				
HTII	1,41** 1,10* <b>0,25</b>	1,07*** 0,99*** <b>0,00</b>			
HTIII	1,44** 1,25* <b>0,25</b>	0,70** 0,63* <b>0,00</b>	1,22** 0,92* <b>0,00</b>		
40H	4,32*** 4,08*** <b>0,64</b>	2,69*** 2,68*** <b>0,06</b>	4,44*** 4,35*** <b>0,09</b>	1,52** 1,44* <b>0,00</b>	
40ST	2,38*** 2,35*** <b>0,46</b>	2,00*** 1,92*** <b>0,04</b>	3,80*** 3,54*** <b>0,09</b>	1,27** 1,20** <b>0,00</b>	2,54*** 2,41*** <b>0,00</b>

proporción alta de animales clasificados como HTI (46,67%). El porcentaje máximo de casos bien clasificados correspondió al grupo HTI. En la figura 4.17 está representado el primer vector canónico respecto al segundo, que acumularon un 71,99% de la varianza. Los animales de 40 cromosomas (40ST y 40H) fueron los que mostraron mayores diferencias morfológicas concentradas en la zona de la articulación, presentado el ángulo de acromion más cercano al ángulo externo y un acromion más largo.

El fenograma, obtenido a partir de las distancias de Mahalanobis entre los centroides de cada grupo de heterocigosidad estructural por el método UPGMA (figura 4.18 A). La correlación cofenética obtenida indicó un nivel de ajuste “pobre” de las distancias ultramétricas respecto las distancias originales ( $r=0,7710$ ). Los animales más diferenciados morfológicamente fueron los 40H, seguidos por los 40ST que se unieron al conglomerado formado por los heterocigotos





y homocigotos estructurales (HTI, HTII, HTIII y HH). El método de ordenación de NMDS presentó una medida baja de estrés ( $s=0,0008$ ) y una correlación con los datos originales elevada ( $r=0,9383$ ), lo que indicó una baja distorsión de la matriz de distancias originales. Con este tipo de análisis se obtuvieron resultados similares a los mostrados por el UPGMA (figura 4.18 A). Los animales más diferenciados (según NMDS y MST) fueron los 40H seguidos por los 40ST, mostrando ambos HTIII como grupo más próximo.

*Factor número cromosómico:* las pruebas  $T^2$  de Hotelling para las distancias de Mahalanobis al cuadrado entre los centroides de los rangos cromosómicos calculados a partir de  $W'$  y  $W$ , mostraron diferencias significativas (tabla 4.14). No se encontraron diferencias significativas para las componentes uniformes (tabla 4.14). Puesto que, para estas componentes, el MANOVA presentó efecto significativo del número cromosómico pero con un p-valor elevado ( $p=0,027$ ) y las comparaciones múltiples no mostraron diferencias significativas, se consideró que las componentes afines no divergieron entre grupos.

**Tabla 4.14.** Distancias de Mahalanobis al cuadrado no sesgadas entre rangos cromosómicos para la norma dorsal de la escápula. La línea superior corresponde a la forma total, la segunda línea a la forma no uniforme y línea inferior a la uniforme. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ , después de la corrección secuencial de Bonferroni. Las distancias no significativas están resaltadas en negrita.

	28-30	31-33	34-37	38-39	40H
31-33	1,47*** 1,00*** <b>0,17</b>				
34-37	3,69*** 2,98*** <b>0,00</b>	2,00*** 1,60*** <b>0,38</b>			
38-39	2,71*** 2,50*** <b>0,19</b>	1,44*** 1,21** <b>0,00</b>	2,39*** 2,24*** <b>0,47</b>		
40H	5,88*** 5,45*** <b>0,35</b>	3,24*** 3,14*** <b>0,00</b>	3,17*** 3,07*** <b>0,68</b>	1,12* 1,06*	<b>0,00</b>
40ST	4,57*** 4,42*** <b>0,25</b>	2,21*** 2,12*** <b>0,00</b>	2,35*** 1,94*** <b>0,54</b>	1,63*** 1,53** <b>0,00</b>	2,55*** 2,43*** <b>0,00</b>

### 4.3. RESULTADOS

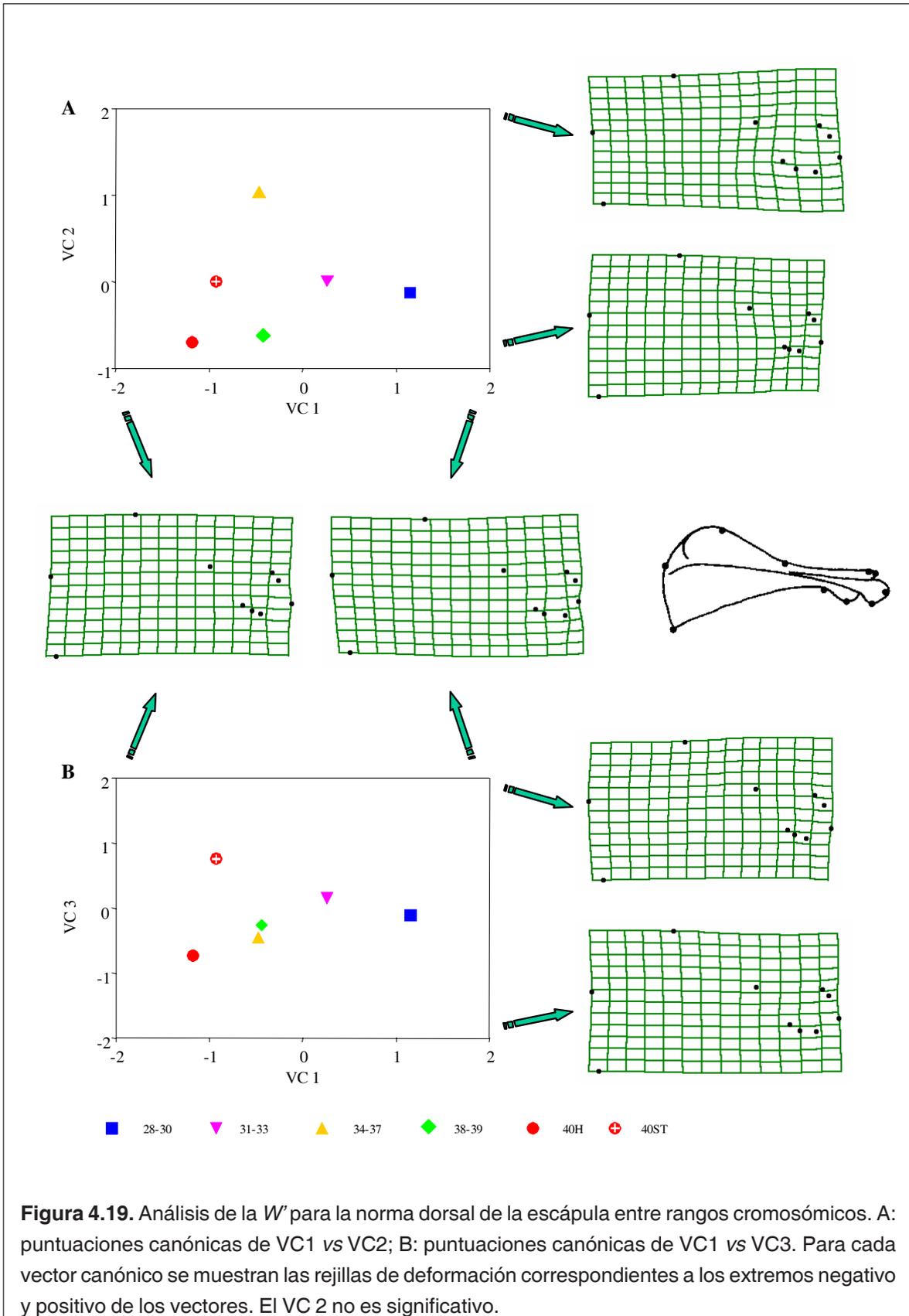
---

El análisis de variables canónicas mostró tres vectores significativos que acumularon el 83,57% de la varianza (figura 4.19). Se obtuvo una probabilidad media de clasificación de 54,20% (mín. 36,84%; máx. 68,29%; tabla 4.8). El grupo 38-39 cromosomas fue el que presentó un menor número de casos bien clasificados. El 42,11% de los animales de este grupo se clasificaron como 31-33. El grupo con mayor número de casos bien clasificados fue el de rango cromosómico 28-30. Éste presentó un porcentaje elevado (21,95%) de animales clasificados como 31-33. El primer vector canónico (50,10%) ordenó, a lo largo del eje en sentido negativo-positivo, los rangos cromosómicos de forma descendiente. Los especímenes con un número cromosómico elevado presentaron el ángulo de acromion más cercano al ángulo externo y un acromion más largo. El segundo vector canónico (18,48%) separó los animales de rango 34-37 que mostraron un ligero estrechamiento de la *facies dorsalis*. El tercer vector canónico (14,99%) no mostró un patrón claro de clasificación.

El fenograma obtenido a partir de las distancias de Mahalanobis entre los centroides de los rangos cromosómicos (figura 4.18 B) mostró una bondad de ajuste “muy pobre” ( $r=0,5989$ ). Se obtuvo un orden de agrupación en sentido inverso al encontrado para la visión lingual de la mandíbula. Los animales más diferenciados morfológicamente fueron los de 28-30 y 31-33 cromosomas respecto a los de número cromosómico comprendido entre 38 y 40. Los individuos de 34-37 cromosomas presentaron un fenotipo intermedio. Los animales de 40 cromosomas no estándar fueron más similares a los de 38-39 cromosomas que a los de 40 cromosomas estándar. La representación mediante NMDS mostró baja distorsión de las distancias originales ( $s=0,0131$ ;  $r=0,9178$ ). Los grupos más diferenciados, según el MST, fueron 34-37 y 40ST. El grupo más próximo de 40ST y 40H fue 38-39. (figura 4.18 B).

#### Comparación de cambios de forma entre estructuras

Para las normas dorsal y ventral del cráneo, la primera pareja de vectores (V1 dorsal y V1 ventral) obtenidas por PLS explicó el 71,68% de la covarianza, mientras que la segunda (V2 dorsal y V2 ventral) sólo explicó el 9,89%. Las correlaciones entre los vectores V1 de las normas dorsal y ventral del cráneo, y entre los vectores V2 de dichas normas fueron 0,8 y 0,76, respectivamente. En las figuras 4.20 A y 4.20 B están representados los centroides de los grupos de heterocigosidad estructural ordenados según los dos primeros vectores latentes



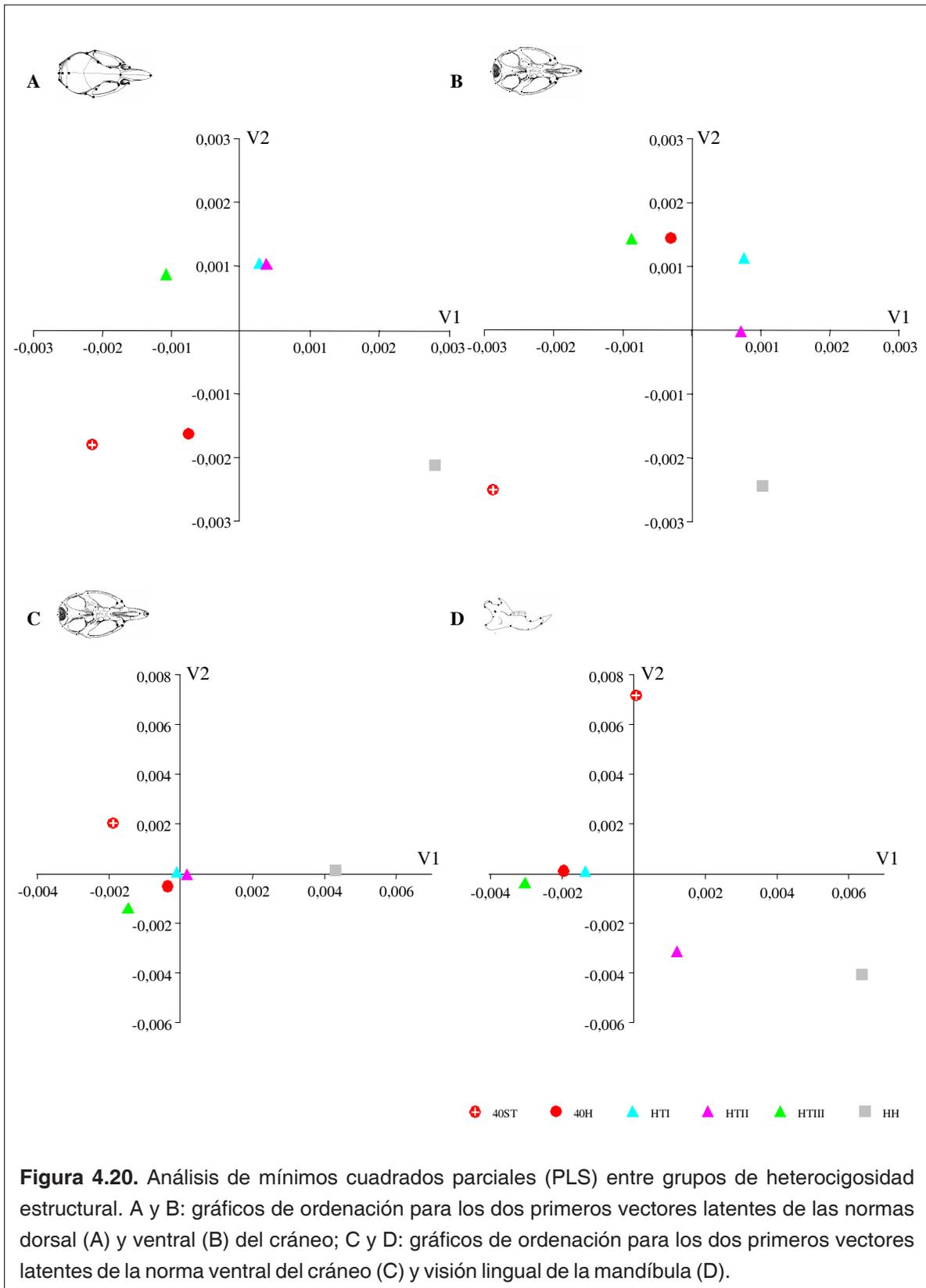
extraídos para las normas dorsal y ventral del cráneo, respectivamente. En las figuras 4.21 A y 4.21 B se muestran la ordenación de los centroides de los grupos establecidos por rangos cromosómicos sobre los dos primeros vectores latentes de las visiones dorsal y ventral del cráneo.

Las dos primeras parejas de vectores, determinadas por PLS para la covariación de forma entre la norma ventral del cráneo y visión lingual de la mandíbula explicaron el 76,51% y el 10,49% de la covarianza total. Las correlaciones entre los vectores V1 de las normas ventral del cráneo y lingual de la mandíbula, y entre los vectores V2 de dichas estructuras fueron 0,78 y 0,58 respectivamente. En las figuras 4.20 y 4.21 están representadas las ordenaciones de los centroides determinados para los grupos de heterocigosidad estructural y rango cromosómico, respectivamente, sobre los dos primeros vectores latentes de la visión ventral del cráneo (C en figuras 4.20 y 4.21) y visión lingual de la escápula (D en figuras 4.20 y 4.21).

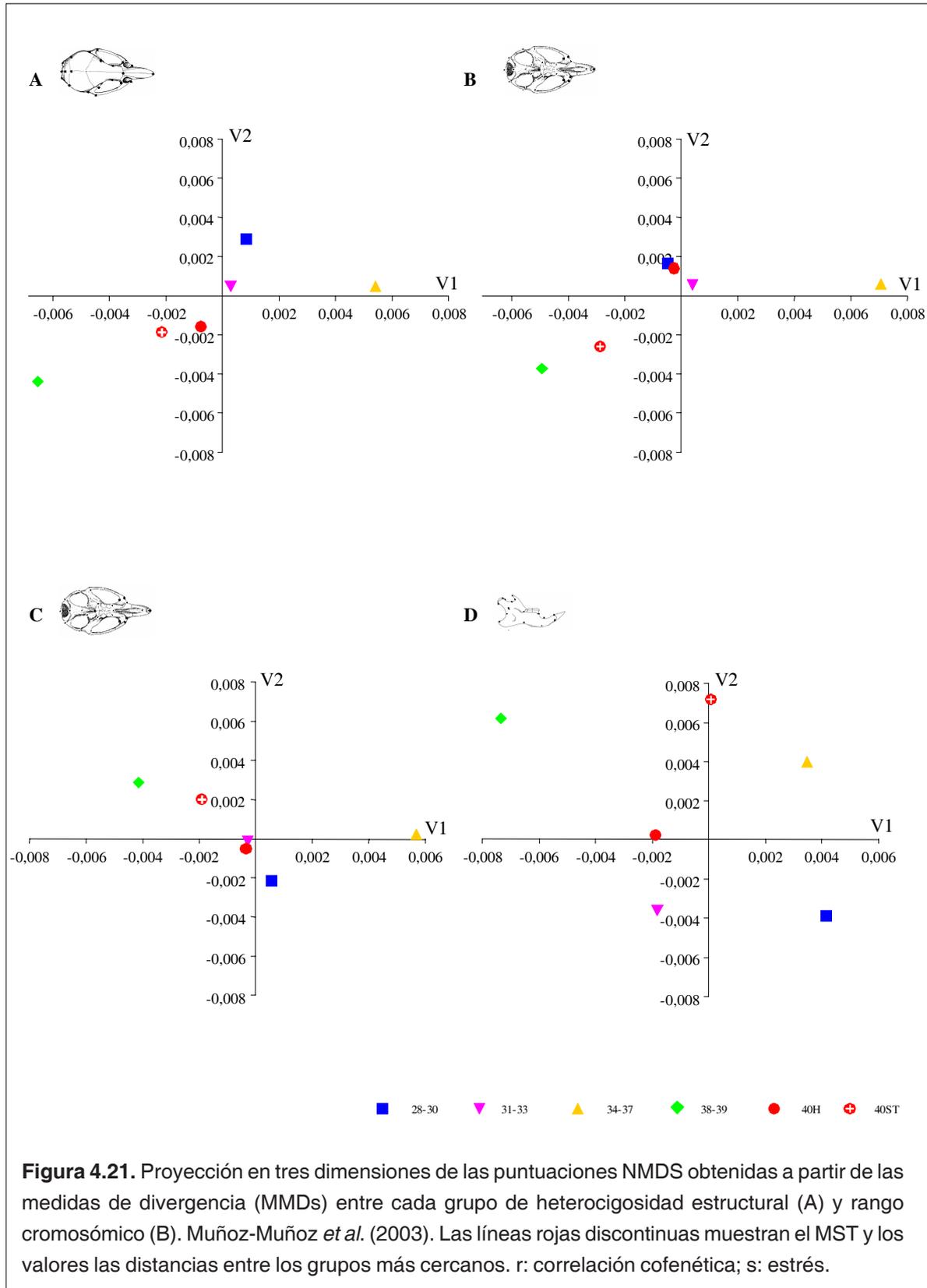
Puesto que los dos primeros pares de vectores de las normas dorsal y ventral del cráneo mostraron una alta correlación, las ordenaciones de los grupos analizados a lo largo de estos vectores fueron muy similares, hecho esperable pues pertenecen a una misma unidad estructural. El grupo que varió más en su posición fue el correspondiente a los animales 40H. La ordenación de los centroides fue también similar para la norma ventral del cráneo y la visión lingual de la mandíbula, exceptuando la posición de los animales estándar que presentan, respecto al primer vector latente, valores negativos en la visión ventral del cráneo y valores positivos en la visión lingual de la mandíbula respecto al V1.

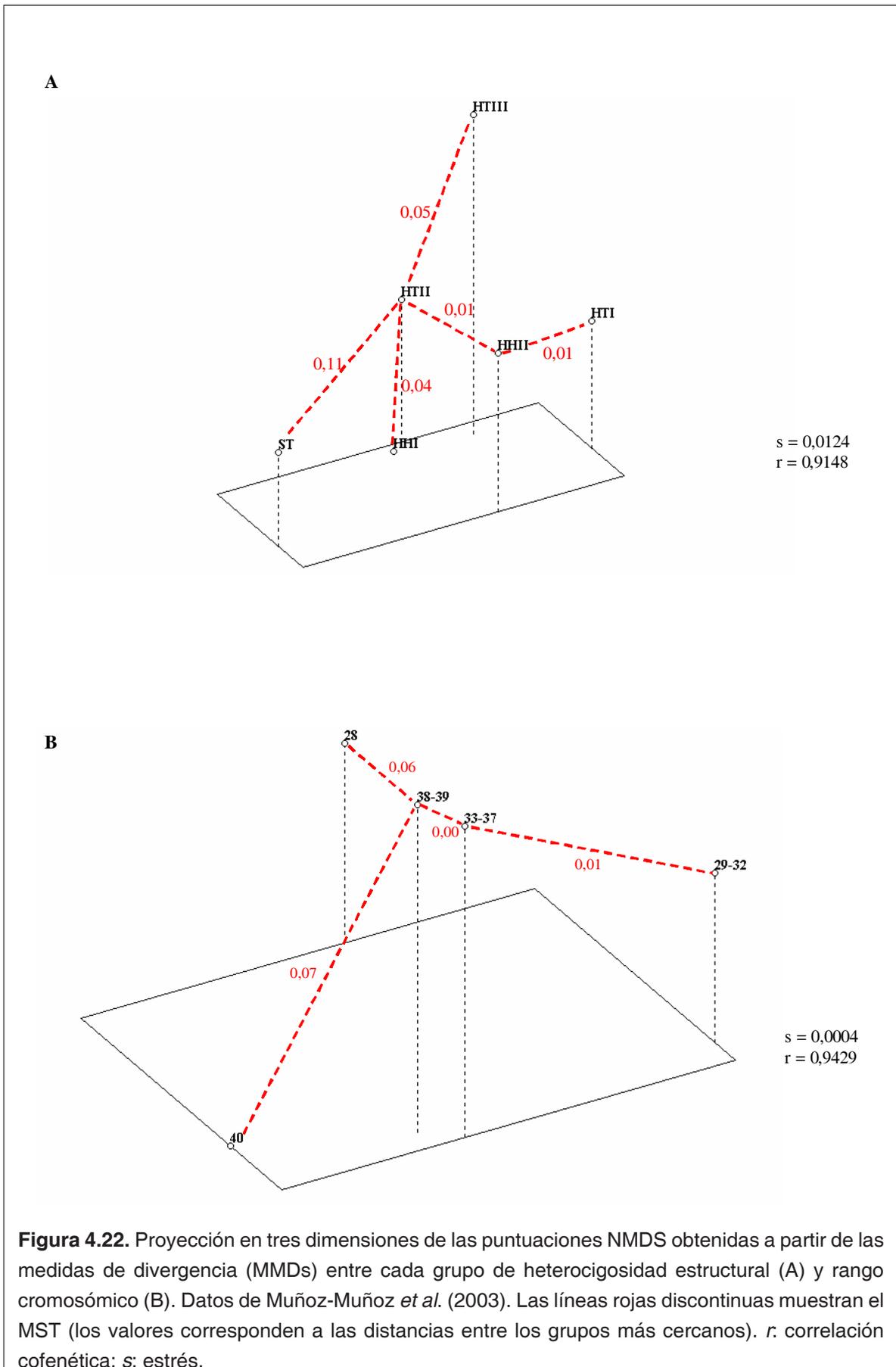
#### Análisis NMDS y MST de las matrices de las medidas medias de divergencia (MMDs)

A partir de los datos de MMDs entre grupos cromosómicos calculados para caracteres epigenéticos del cráneo y de la mandíbula (véase tablas 2 y 4 en Muñoz-Muñoz *et al.*, 2003) se obtuvo las divergencias fenéticas mediante NMDS y MST. La bondad de ajuste de los datos para este análisis fue “muy buena” (heterocigosidad estructural:  $s=0,0107$  y  $r=0,9164$ ; número cromosómico:  $s=0,0006$  y  $r=0,9092$ ; figura 4.22), a diferencia de lo que sucedió para el análisis UPGMA (heterocigosidad estructural:  $r= 0,7288$ ; número cromosómico:



### 4.3. RESULTADOS





#### 4.4. DISCUSIÓN

---

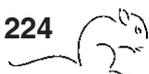
$r=0,7288$ ). Con este método de ordenación se observó que para la heterocigosidad estructural, al igual que para el análisis mediante UPGMA, el grupo más diferenciado fue el formado por animales de 40 cromosomas. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por el análisis jerárquico, se obtuvo mayor divergencia entre los grupos HTII y HTIII que entre los animales homocigotos de 28 cromosomas y HTII. No obstante, para el número diploide se obtuvieron con ambos métodos (UPGMA y NMDS) dos grupos diferenciados, 40ST y HHI.

#### 4.4. DISCUSIÓN

El presente estudio constituye el primer análisis de la variación de forma y tamaño realizado mediante técnicas de morfometría geométrica, en función de la reducción cromosómica y heterocigosidad estructural en una zona de polimorfismo Robertsoniano de *Mus domesticus* en la que no se ha descrito ninguna raza cromosómica.

Todas las poblaciones analizadas son comensales y comparten el mismo tipo de hábitat, por lo que no se relacionó las diferencias encontradas en forma y tamaño con cambios en la adaptación a diferentes ambientes. Este hecho queda corroborado al no haberse detectado diferencias morfológicas entre localidades con la misma composición cromosómica. Así, las divergencias encontradas en la morfología se asocian a cambios en la estructura de los cromosomas.

Tampoco se hallaron diferencias entre sexos, lo que coincide con diversos estudios de morfología realizados sobre poblaciones naturales de esta especie, tanto con técnicas de morfometría geométrica (Auffray *et al.*, 1996; Corti & Rohlf, 2001) como con morfometría tradicional (Hauffe *et al.*, 2002). Sin embargo, este resultado difiere de los obtenidos en otros estudios tradicionales de morfometría, en los que se muestra un dimorfismo sexual acusado en cepas de ratón doméstico de laboratorio (Lovell *et al.*, 1984; Leamy, 1982a; Leamy & Thorpe, 1984). Estas discrepancias podrían deberse a que las poblaciones naturales presentan mayor variabilidad genética que se traduce en un aumento de la diversidad fenotípica, tamponándose así las diferencias morfológicas entre sexos.



Las diferencias entre las clases de edad estuvieron relacionadas con el *centroid size* y no con la forma. Esto fue debido a que los ejemplares analizados de ambas clases de edad presentaban estructuras óseas que habían adquirido ya la forma adulta y sólo respondían a un incremento en tamaño. Según Lovell (comunicación personal citada en Davis, 1983) el ratón doméstico muestra poca variación de forma después de las seis semanas de edad, con lo que los animales analizados en este estudio corresponderían a una edad igual o superior a ésta.

La variación observada del tamaño entre los grupos de heterocigosidad estructural para la clase de edad II, mostró un patrón particularmente repetitivo en todas las estructuras, presentando los animales HH valores menores que los heterocigotos y el grupo 40H. Este patrón, que no se apreció en la clase de edad III, fue muy marcado en las normas dorsal y ventral del cráneo y en la visión lingual de la mandíbula, donde se encontraron diferencias significativas. En la escápula, aunque los resultados de la ANOVA fueron significativos, las pruebas de comparaciones múltiples no mostraron diferencias entre grupos, posiblemente debido a la escasa magnitud de las divergencias. Aún así, la representación gráfica de los valores medios de *centroid size* (figura 4.3 G) indicaron también la existencia del patrón seguido por el resto de estructuras. En principio es posible atribuir esta pauta de variación a dos circunstancias: 1) el crecimiento más tardío en los homocigotos estructurales respecto a los 40H y HTII; 2) la existencia de un sesgo en el muestreo debido a que el grupo HH estaría formado por animales más jóvenes dentro de la clase de edad II. Decantarse por una de estas dos opciones es difícil puesto que se utilizaron clases de edad relativas, las cuales no se corresponden con la edad real de los individuos. Si se comparan las agrupaciones que se han realizado en el presente estudio con las efectuadas en función del desgaste dentario definido por Lidicker (1966) se observa que los animales clasificados como subadultos corresponden a las clases de edad 3-6, y que estas edades se distribuyen con frecuencias similares en todos los grupos de heterocigosidad estructural (datos no mostrados en el presente trabajo). Asumiendo que todos los animales están sometidos al mismo nivel de desgaste dentario, esto indicaría que los grupos cromosómicos establecidos presentan una edad media similar. Según esto se podría deducir que realmente existe un efecto de la heterocigosidad estructural durante el crecimiento. De todas formas esta hipótesis debería

#### 4.4. DISCUSIÓN

---

ser comprobada a partir de estudios detallados de crecimiento de la especie. Atendiendo a los rangos cromosómicos, en individuos de la clase de edad II, se observó también un patrón repetitivo en todas las estructuras, que no aparece en la clase de edad III. Los *centroid size* más pequeños correspondieron a animales de 34-37 cromosomas. Los valores de este grupo no parecieron estar relacionados con los encontrados anteriormente para los grupos de heterocigosidad, puesto que dentro del rango de 34-37 el porcentaje de animales correspondiente a HH y HTI (grupos que presentaron valores bajos de *centroid size*) fue de 10,71% y 42,86% respectivamente, mientras que, por ejemplo, en el grupo de 38-39, con valores más altos de *centroid size*, estas proporciones fueron de 26,09% para HH y 56,52% para HTI. Las mismas hipótesis que las comentadas para los grupos de heterocigosidad estructural se podrían plantear en este caso: los valores menores de *centroid size* encontrados en el rango cromosómico 34-37 se podrían deber a un crecimiento más tardío de estos individuos o bien a un sesgo de la muestra. Como en el caso anterior las frecuencias de individuos de clases de edad 3-6, atendiendo al desgaste dentario, son similares en todos los grupos.

La búsqueda bibliográfica ha permitido encontrar sólo un trabajo en el que se analizan diferencias en tamaño entre razas cromosómicas de *M. domesticus* mediante morfometría geométrica (Corti & Rohlf, 2001). En dicho estudio, realizado sobre poblaciones de los Alpes Réticos, no se encontraron diferencias de *centroid size* entre las clases de edad que se definen, pero sí entre los adultos de poblaciones cromosómicas diversas: el tamaño de cráneo fue mayor en los animales estándar que en las razas con reducción del número diploide ( $2n=22$  y  $2n=26$ ). Estos resultados son poco comparables con los expuestos en el presente capítulo para los animales adultos puesto que, en el área aquí estudiada, no se ha encontrado ninguna raza cromosómica a excepción de la estándar.

En el estudio de la forma, se encontraron diferencias entre grupos de heterocigosidad estructural y rango cromosómico. El análisis de los *relative warps* no permitió determinar la existencia de una variación morfológica respecto a ninguno de los dos factores mencionados. Un estudio más detallado mediante análisis de variables canónicas (AVC) sobre la matriz conjunta de las puntuaciones de los *partial warps* y las componentes uniformes mostró la

existencia de un patrón general en el cambio de forma relacionado con la heterocigosidad estructural y el número cromosómico. Si bien la mayoría de las distancias de Mahalanobis fueron altamente significativas, estas distancias proceden de un tipo de análisis que aumenta la variabilidad entre grupos (AVC), por lo que no se puede hablar de grandes diferencias morfológicas entre los grupos analizados. Esto es lógico si pensamos que se está analizando la variabilidad morfológica entre grupos de animales pertenecientes a la misma especie, en los que las diferencias existentes son a nivel de estructura cromosómica, y entre los que no se ha encontrado un aislamiento reproductivo completo (véase capítulos 2 y 3).

Resultó difícil separar los efectos de la heterocigosidad cromosómica del número diploide, puesto que son factores correlacionados debido a la propia estructura de la zona de polimorfismo Robertsoniana aquí estudiada. La discriminación significativa obtenida mediante el AVC para los grupos de heterocigosidad estructural y número cromosómico, así como unas distancias de Mahalanobis altamente significativas en la mayoría de las comparaciones entre grupos en cada una de las dos clasificaciones, sugiere que parte de la diferenciación morfológica encontrada se debe a una combinación de ambos factores. En todas las estructuras óseas analizadas se obtuvo una mejor discriminación y un porcentaje mayor de casos bien clasificados entre los grupos establecidos según el número cromosómico que entre los definidos en función de heterocigosidad estructural, de lo que se desprende que la reducción en el  $2n$  resulta ser un factor más determinante en la variación morfológica que la heterocigosidad estructural.

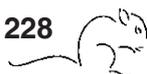
Los cambios morfológicos de tipo no uniforme describieron la mayor parte de la variación fenotípica entre grupos, sugiriendo que las subunidades funcionales que componen cada estructura estudiada (normas dorsal y ventral del cráneo, lingual de la mandíbula y dorsal de la escápula) han evolucionado de forma diversa. Esto es debido a que las fuerzas evolutivas que actúan sobre estas estructuras pueden diferir dependiendo del papel que juegan en las funciones auditivas, alimenticias, respiratorias y olfatorias, en el caso del cráneo y de la mandíbula, o en la locomoción en el caso de la escápula. Es esperable que las variaciones morfológicas entre las normas dorsal y ventral del cráneo, así como entre la norma ventral del cráneo y la mandíbula estén correlacionadas puesto que la forma global del cráneo

#### 4.4. DISCUSIÓN

---

depende del desarrollo coordinado de diferentes elementos óseos, dentarios y cartilagosos, y del desarrollo de los tejidos blandos (Richtsmeier *et al*, 2002). En general se obtuvo una correlación elevada entre las estructuras craneanas analizadas mediante el análisis de PLS. Sin embargo, estudiando los gráficos de ordenación para los dos primeros vectores latentes derivados de este análisis, se observó que para algunos grupos, sobre todo el 40H, la forma de la visión ventral del cráneo no fue la que se esperaría según la forma apreciada en la norma dorsal del cráneo. Lo mismo sucedió, aunque en menor grado, entre la norma ventral del cráneo y la mandíbula de los animales estándar (figuras 4.20 y 4.21). Estas observaciones, junto con las extraídas de las matrices de distancias de Mahalanobis entre grupos para cada estructura (tablas 4.5, 4.7, 4.9-4.14), donde se pudo apreciar que los valores más altos de divergencia se obtuvieron para la norma ventral del cráneo y la mandíbula, mostraron que la tasa de cambio entre los diversos componentes esqueléticos varía. La diferenciación morfológica entre los grupos cromosómicos tampoco fue igual para todas las estructuras estudiadas (figuras 4.20 y 4.21, tablas 4.5, 4.7, 4.9-4.14). Mientras que en la norma ventral del cráneo y en la mandíbula las mayores distancias se obtuvieron entre los animales estándar y el resto de grupos cromosómicos, para la norma dorsal del cráneo y la escápula fue el grupo 40H el que más divergió del resto. Estas variaciones morfológicas no correlacionadas entre las estructuras estudiadas son debidas a los cambios de origen no uniforme que pueden modificar la integración morfológica (Corti & Rohlf, 2001).

En el estudio de las distancias fenéticas entre grupos, en general se obtuvo una mayor bondad de ajuste mediante el análisis NMDS que mediante UPGMA, con lo que cabe esperar que las relaciones entre los grupos obtenidas a partir del análisis NMDS estén menos distorsionadas respecto a las distancias originales. Es por ello que en caso de discrepancia de resultados entre los dos métodos cabe dar mayor relevancia a las relaciones entre grupos obtenidas mediante el método no jerárquico de ordenación. En estos análisis, la diferenciación clara de los animales 40ST, respecto al resto de grupos con polimorfismo Robertsoniano, encontrada en la norma ventral del cráneo y en la visión lingual de la mandíbula, sugiere un aislamiento genético de estos animales respecto al resto de las poblaciones Robertsonianas, incluso de las formadas por animales 40H. La fertilidad reducida o la baja eficacia biológica de los heterocigotos en las zonas híbridas cromosómicas han sido consideradas una barrera



importante al flujo genético entre poblaciones bien diferenciadas cromosómicamente (Searle, 1993; Hauffe & Searle, 1998). La zona de estudio, aunque no puede considerarse estrictamente como una zona híbrida, puesto que no ha sido encontrada ninguna raza cromosómica, presenta una estructura similar a una zona híbrida escalonada (véase capítulo 2). Los estudios de fertilidad realizados en machos (capítulo 3) muestran una reducción de fertilidad en los animales pertenecientes a poblaciones Robertsonianas, lo que puede ser un indicador de una barrera de flujo genético entre estos animales y las poblaciones estándar. Este hecho, conjuntamente con la reducción en recombinación derivada de la presencia de fusiones Robertsonianas (Davisson & Akeson, 1993), podría ser el responsable de la diferenciación morfológica de los animales 40ST respecto al resto. La divergencia fenética de los animales 40H, en este caso no producida por una reducción en el número cromosómico, podría estar indicando una diferenciación por aislamiento local, o bien una procedencia diferente de estos animales. Los animales 40H podrían derivar de apareamientos entre animales heterocigotos próximos a la zona de la raza estándar, con un  $2n=37-39$ , o bien proceder de cruces entre estos heterocigotos y animales 40ST. El hecho de que los ratones sean animales de baja vagilidad y que las distancias de Mahalanobis sean mayores entre 40H y 40ST que entre 40H y 38-39 abogan por la primera hipótesis. Los resultados obtenidos apoyan la clasificación realizada, separando los animales de 40 cromosomas en dos grupos, 40ST y 40H. Aún habiéndose encontrado distancias estadísticamente significativas entre los grupos con un  $2n$  menor a 40, tanto en la clasificación realizada en función de la heterocigosidad estructural y el número cromosómico, éstas no son muy grandes.

Los resultados obtenidos sobre la variabilidad de caracteres morfológicos no métricos de la zona de polimorfismo Robertsoniano Barcelona (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2003) fueron concordantes con los obtenidos en el presente capítulo. Concretamente, en dicho estudio, se analizaron las relaciones fenéticas, entre diversos grupos cromosómicos, a partir de medidas de divergencia basadas en caracteres epigenéticos (MMDs). Para ello los autores utilizaron el método de agrupación jerárquico UPGMA. El análisis de las relaciones fenéticas se realizó, al igual que en el presente capítulo, atendiendo a dos clasificaciones, la heterocigosidad estructural y el número cromosómico, aunque el criterio de agrupación

divergió ligeramente. En ambas clasificaciones no se separaron los animales 40H de los 40ST, pero debido a que sólo tres de los 30 animales con  $2n=40$  correspondieron a los clasificados aquí como 40H, se puede considerar la agrupación establecida como representante del cariotipo estándar (40ST). A su vez, en dicho estudio se separaron los animales con  $2n=28$  homocigotos para las fusiones Rb(3.8), Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(9.11) y Rb(12.12), del resto de homocigotos con un  $2n<40$ . Estos ejemplares con  $2n=28$ , denominados HHI, fueron considerados como los más cercanos a la hipotética “raza Barcelona” [homocigotos de 26 cromosomas para las fusiones Rb(3.8), Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(7.17), Rb(9.11) y Rb(12.12), véase capítulo 2]. En la investigación presentada en este capítulo el número de animales homocigotos con  $2n=28$  fue pequeño (visiones dorsal y ventral de cráneo y perfil lingual de la mandíbula:  $n=6$ ; visión dorsal de la escápula:  $n=4$ ), por lo que no se analizó como un grupo diferenciado, sino que se agruparon con el resto de homocigotos con  $2n<40$ , en el análisis para la heterocigosidad estructural, y con los individuos de  $2n=28-31$ , en el estudio por rango cromosómico. Muñoz-Muñoz *et al.* (2003) encontraron las mayores diferencias, en la incidencia de caracteres no métricos, entre los animales estándar y el resto de grupos que presentaron fusiones Robertsonianas. Dentro de los animales con un  $2n<40$  cromosomas, los ejemplares HHI fueron los que más divergieron del resto seguidos por los heterocigotos para más de tres fusiones. Puesto que la bondad de ajuste obtenida para el análisis UPGMA realizado por estos autores fue “pobre”, en el presente capítulo se volvieron a analizar estas distancias fenéticas utilizando el método NMDS. Con este tipo de análisis, la separación de los animales HHI respecto al resto de grupos con un  $2n<40$  sólo se observó en el análisis para el número diploide. Pero tanto para la heterocigosidad estructural como para el número cromosómico, el NMDS mostró que el grupo más diferenciado fue el formado por animales estándar. El hecho de que bajo dos criterios de clasificación diferentes el grupo HHI muestre diversos patrones de divergencia puede deberse al bajo número de individuos que lo componen ( $n=7$ ). Es por ello que pensamos que la diferenciación encontrada para este grupo no debería ser tomada en cuenta y que los resultados que se derivan de la investigación de Muñoz-Muñoz *et al.* (2003) deberían centrarse únicamente en la separación encontrada entre los animales estándar y los de un  $2n<40$  cromosomas. Cabe mencionar que en el análisis realizado sobre caracteres no métricos de Muñoz-Muñoz *et al.* (2003), para obtener las distancias fenéticas se reúnen los resultados



obtenidos en las visiones dorsal y ventral del cráneo con los de la mandíbula, y como ya se ha comentado previamente estas estructuras pueden evolucionar de forma diversa (Corti & Rohlf, 2001). Así, cabe esperar que los resultados obtenidos en Muñoz-Muñoz *et al.* (2003) coincidan con los expuestos en el presente capítulo sólo en aquellos puntos en que todos los grupos se comportan igual en todas las estructuras analizadas, en este caso la separación de los animales de 40 cromosomas del resto. Estos resultados junto con los obtenidos en el presente capítulo sugieren que la principal diferenciación morfológica se da entre los animales de 40 cromosomas y los de un  $2n < 40$ . Asimismo, se muestra que la utilización de métodos de ordenación como NMDS, en análisis de relaciones morfológicas en los que no está determinada una estructura jerárquica de los grupos que se estudian, es más apropiada que los métodos de conglomerados como UPGMA.

Los resultados obtenidos en el presente capítulo concuerdan con los referidos por otros autores en estudios realizados en otros sistemas Robertsonianos de *Mus domesticus*. La mayoría de investigaciones muestran la existencia de una relación entre el cambio morfológico y la reducción evolutiva del número cromosómico. Thorpe *et al.* (1982) encuentran este patrón en la escápula y la mandíbula, con técnicas de morfometría multivariante, en tres poblaciones de los Alpes con números diploides de 22, 24 y 26. Posteriormente, Corti & Rohlf (2001) hallan un patrón similar entre las mismas localidades utilizando técnicas de geometría morfométrica. Estos trabajos no contemplan ejemplares híbridos en los análisis. Por el contrario, Corti & Thorpe (1989) sí que los incluyen en su estudio sobre poblaciones procedentes del centro de Italia, en el que encuentran diferenciación morfológica entre las razas de  $2n=22$  y  $2n=40$ , pero las atribuyen a una divergencia geográfica, aunque no descartan completamente una causa filogenética. Estos resultados fueron posteriormente comparados con los obtenidos en una zona híbrida descrita en Túnez entre animales de  $2n=22$  y  $2n=40$  (Saïd *et al.*, 1999) donde se encontró una clara diferenciación fenotípica debida a la divergencia cromosómica y al aislamiento reproductivo. El estudio de Hauffe *et al.* (2002), también sobre razas Robertsonianas de los Alpes, y en el que se incluyen híbridos, no mostró diferencias entre los animales estándar y los híbridos con un número cromosómico próximo a 40, pero sí entre los animales de 40 e híbridos entre razas de 24 y 26 cromosomas. También se ha encontrado relación entre el cambio de forma y la presencia de fusiones Robertsonianas en

#### 4.4. DISCUSIÓN

---

una zona híbrida entre *M. musculus* y *M. domesticus* (Nance *et al.*, 1990; Auffray *et al.*, 1996; Fel-Clair *et al.*, 1996).

Según lo expuesto, los diferentes estudios realizados en zonas híbridas cromosómicas muestran resultados diversos y poco coincidentes entre las diferentes áreas, aunque todo apunta a que los principales factores que intervienen en la diferenciación morfológica entre poblaciones Robertsonianas son dos: la reducción cromosómica y el aislamiento geográfico. Resulta difícil establecer un patrón común de evolución para todas las zonas híbridas Robertsonianas de *Mus domesticus* puesto que los factores históricos, ecológicos y antropogénicos difieren de un lugar a otro y están muy ligados a la evolución de las poblaciones.

No existe interpretación para los cambios de forma fuera de la observación de una congruencia general con la divergencia cromosómica. Por ejemplo, a partir de los resultados derivados del análisis de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona se podría describir que los animales 40ST presentaron mayor amplitud zigomática, un proceso coronoide mayor y un proceso articular más estrecho. Pero la interpretación funcional de estos patrones de alometría evolutiva es difícil en el contexto de los procesos microevolutivos que se pueden estar dando en esta zona de polimorfismo Robertsoniano (Klingenberg, 1996). Estos patrones aparecen muy probablemente como subproductos de las divergencias genéticas derivadas de la aparición de fusiones cromosómicas.

Los resultados aquí obtenidos muestran un efecto del número diploide y de la heterocigosidad estructural en la reducción del flujo genético. Esta reducción del flujo genético se pone de manifiesto, especialmente, entre las poblaciones estándar y las que presentan polimorfismo Robertsoniano. Las poblaciones con un  $2n$  comprendido entre 38 y 40 (40H) actúan como una barrera a la introgresión. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en los estudios de reproducción (véase capítulo 3), en los que se detectó una disminución en la producción de espermatozoides en los animales con fusiones Robertsonianas.

#### 4.5. BIBLIOGRAFÍA

Albrecht, G. H. (1980). Multivariate analysis and the study of form with special reference to canonical variate analysis. *American Zoology*, 20: 679-693.

Alibert, P., Fel-Clair, F., Manolakou, K., Britton-Davidian, J. & J. C. Auffray (1997). Developmental stability, fitness, and trait size in laboratory hybrids between european subspecies of the house mouse. *Evolution*, 51: 1284-1295.

Auffray, J.-C., Alibert, P. & C. Latieule (1996). Relative warp analysis of skull shape across the hybrid zone of the house mouse (*Mus musculus*) in Denmark. *Journal of Zoology*, 240: 441-455.

Bookstein, F. L. (1984). A statistical method for biological shape comparisons. *Journal of Theoretical Biology*, 107: 475-520.

Bookstein, F. L. (1989). Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations. *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intelligence*, 11: 567-585.

Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Bookstein, F. L. (1993). A brief history of the morphometric synthesis. En L. F. Marcus, E. Bello & A. García-Valdecasas (eds.) *Contributions to morphometrics. Monografías del Museo Nacional de Ciencias Naturales 8*. Pp. 15-40. CSIC, Madrid.

Bookstein, F. L. (1996). Combining the tools of geometric morphometrics. En Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G. J. P. & D. Slice (eds.): *Advances in morphometrics*. Pp. 131-151. Plenum Press, New York.

Castiglia, R. & E. Capanna (2000). Contact zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 2. Fertility and segregation in the laboratory-reared and wild mice heterozygous for multiple Robertsonian rearrangements. *Heredity*, 85: 147-156.

Choo, K. H. A. (1998). Why is the centromere so cold?. *Genome Research*, 8: 81-82.

Corti, M & F. J. Rohlf (2001). Chromosomal speciation and phenotypic evolution in the house mouse. *Biological Journal of Linnean Society*, 73: 99-112.

Corti, M. & R. S. Thorpe (1989). Morphological clines across a karyotypic zone of house mice in Central Italy. *Journal of Evolutionary Biology*, 2: 253-264.

#### 4.5. BIBLIOGRAFÍA

---

Davis, S. J. M. (1983). Morphometric variation of populations of House mice *Mus domesticus* in Britain and Faroe. *Journal of Zoology*, 199: 521-534.

Davissón M. T. & E. C. Akesson (1993). Recombination suppression by heterozygous Robertsonian chromosomes in the mouse. *Genetics*, 133: 649-667.

Fel-Clair, F., Lenormand, T., Catalan, J., Grobert, J., Orth, A., Boursot, P., Viroux, M.-C. & J. Britton-Davidian (1996). Genomic incompatibilities in the hybrid zone between house mice in Denmark: evidence from steep and non-coincident chromosomal clines for Robertsonian fusions. *Genetical Research*, 67: 123-134.

Festing, M. F. W. (1972). Mouse strain identification. *Nature*, 238: 351-352.

Festing, M. F. W., & T. H. Roderick (1989). Correlation between genetic distances based on single loci and on skeletal morphology in inbred mice. *Genetical Research*, 53: 45-55.

Goodall, C. (1983). *The statistical analysis of growth in two dimensions*. Tesis de Doctorado, Department of Statistics, Harvard University.

Gower, J. C. & J. S. Ross (1969). Minimum spanning trees and single linkage cluster analysis. *Journal of Applied Statistics*, 18: 54-64.

Guiller, A., Bellido, A. & L. Madec (1998). Genetic distances and ordination: the land snail *Helix aspersa* in North Africa as a test case. *Systematic Biology*, 47: 208-227.

Harrison, R. G. (1998). Linking evolutionary pattern and process. En Howard, D. J. & S. H. Berlocher (eds.): *Species and speciation*. Pp. 19-31. Oxford University Press, New York.

Hauffe, H. C., Fragedakis-Tsolis, S., Mirol, P. M. & J. B. Searle (2002). Studies of mitochondrial DNA, allozyme and morphometric variation in a house mouse hybrid zone. *Genetical Research*, 80: 117-129.

Hauffe, H. C. & J. B. Searle (1998). Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from northern Italy. *Genetics*, 150: 1143-1154.

Kendall, D. G. (1984). Shape-manifolds, procrustean metrics, and complex projective spaces. *Bulletin of London Mathematical Society*, 16: 81-121.

Kendall, D. G. (1986). Comment on F. L Bookstein, Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistical Science*, 1: 222-226.

- Klingenberg, C. P. (1996). Multivariate allometry. *En* Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G. J. P. & D. Slice (eds.): *Advances in morphometrics*. Pp. 23-49. Plenum Press, New York.
- Kruskal, J. B. (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, 29: 1-17.
- Leamy, L. (1982a). Morphometric studies in inbred and hybrid house mice. I. Patterns in the mean values. *The Journal of Heredity*, 73: 171-176.
- Leamy, L. (1982b). Morphometric studies in inbred and hybrid house mice. II. Patterns in the variances. *The Journal of Heredity*, 73: 267-272.
- Leamy, L. (1990). Heritability of directional and fluctuating asymmetry for mandibular characters in random-bred mice. *Journal of Evolutionary Biology*, 12: 146-155.
- Leamy, L. & R. S. Thorpe (1984). Morphometric studies in inbred and hybrid house mice. Heterosis, homeostasis and heritability of size and shape. *Biological Journal of Linnean Society*, 22: 233-241.
- Lidicker, W. Z. (1966). Ecological observations on a feral house mouse population declining to extinction. *Ecological Monographs*, 36: 27-50.
- Lovell, D. P., Totman, P. & F. M. Johnson (1984). Variation in the shape of the mouse mandible. 1. Effect of age and sex on the results obtained from the discriminant functions used for genetic monitoring. *Genetical Research*, 43: 65-73.
- Loy, A. 1996. An introduction to geometric morphometrics and intraspecific variation. *En* Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G. J. P. & D. Slice (eds.): *Advances in morphometrics*. Pp. 131-151. Plenum Press, New York.
- Marcus, L. F. (1993). Some aspects of multivariate statistics for morphometrics. *En* Marcus, L. F., Bello, E. & A. García-Valdecasas (eds.): *Contributions to morfometrics. Monografías del Museo Nacional de Ciencias Naturales 8*. Pp. 95-130. CSIC, Madrid.
- Marcus, L. F. E., Hingst-Zaher & H. Zaher. 2000. Application of landmark morphometrics to skulls representing the orders of living mammals. *Hystrix*, 11: 27-47.
- Muñoz-Muñoz, F., Sans-Fuentes, M. A., López-Fuster, M. J. & J. Ventura (2003). Non-metric morphological divergence in the western house mouse, *Mus musculus domesticus*, from Barcelona chromosomal hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80: 313-322.

#### 4.5. BIBLIOGRAFÍA

---

Nance, V., Vanlerberghe, F., Nielsen, J. T., Bonhomme, F. & J. Britton-Davidian (1990). Chromosomal introgression in house mice from the hybrid zone between *M. m. domesticus* and *M. m. musculus* in Denmark. *Biological Journal of Linnean Society*, 41: 215-227.

Perfectti, F. (2002). Especiación: modos y mecanismos. En Soler, M. (ed.): *Evolución. La base de la biología*. Pp. 307-321. Proyecto Sur de Ediciones, S.L, Madrid.

Queiroz, K. & D. A. Good (1997). Phenetic clustering in biology: a critique. *The Quarterly Review of Biology*, 72: 3-30.

Richtsmeier, J. T., Zumwalt, A., Carlson, E. J., Epstein, C. J. & R. H. Reeves (2002). Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down Syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 107: 317-324.

Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.

Rohlf, F. J. (1970). Adaptive hierarchical clustering schemes. *Systematic Zoology*, 19: 58-82.

Rohlf, F. J. (1993). Relative warps analysis and an example of its application to mosquito wings. En Marcus, L. F., Bello, E. & A. García-Vallderas (eds.): *Contributions to morfometrics. Monografías del Museo Nacional de Ciencias Naturales 8*. Pp. 131-159. CSIC, Madrid.

Rohlf F. J. (1996a). TpsDig. Versión 1.31. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>

Rohlf, F. J. (1996b). Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. En Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G. J. P. & Slice, D. (eds.): *Advances in morphometrics*. Pp. 117-129. Plenum Press, New York.

Rohlf F. J. (1998). TpsSmall. Versión 1.19. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>

Rohlf F. J. (2000). TpsRegr. Versión 1.25. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>

Rohlf F. J. (2002a). TpsRlew. Versión 1.25. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>

Rohlf F. J. (2002b). TpsPls. Versión 1.10. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>

- Rohlf, F. J. & M. Corti (2000). Use of two-block least-square to study covariation in shape. *Systematic Biology*, 49: 740-753.
- Rohlf, F. J., Loy, A. & M. Corti. (1996) Morphometric analysis of Old World Talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial-warp scores. *Systematic Biology*, 45: 344-362.
- Rohlf, F. J. & D. Slice (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39: 40-52.
- Rohlf, F. J. & R. R. Sokal (1981). Comparing numerical taxonomic studies. *Systematic Zoology*, 30: 459-490.
- Saïd K., Auffray, J. C., Boursot, P. & J. Britton-Davidian (1999). Is chromosomal speciation occurring in house mice in Tunisia?. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 387-399.
- Searle, J. B., 1993 Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. *In* Harrison, R. G. (ed.): *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Pp. 309-353. Oxford University Press, New York.
- Shepard, R. N. & J. B. Kruskal (1964). Non-metric methods for scaling and factor analysis. *American Psychologist*, 19: 557-558.
- Sneath, P. H. A. & R. R. Sokal (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Streissguth, A.P., Bookstein, F.L., Sampson, P.D. & H. M. Barr (1993) The enduring effects of prenatal alcohol exposure on child development: birth through seven years, a partial least squares solution. University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.
- Thompson, D'Arcy W. (1917). *On growth and form*. Macmillan, London.
- Thorpe, R. S., Corti, M. & E. Capanna (1982). Morphometric divergence of Robertsonian populations/species of *Mus*: A multivariate analysis of size and shape. *Experientia*, 38: 920-923.
- Thorpe, R. S. & L. Leamy (1983). Morphometric studies in inbred and hybrid House mice (*Mus sp.*): multivariate analysis of size and shape. *Journal of Zoology*, 199: 421-432.
- Wallace, B. M. N., Searle, J. B. & C. A. Everett (1992). Male meiosis and gametogenesis in wild house mice (*Mus musculus domesticus*) from a chromosomal hybrid zone; a comparison between "simple" Robertsonian heterozygotes and homozygotes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 61: 211-220.

#### 4.5. BIBLIOGRAFÍA

---

Yamamoto, M., & G. L. G. Miklos (1978). Genetic studies on heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and their implications for the functions of satellite DNA. *Chromosoma*, 66: 71–98.