

CAPÍTULO 2

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL EN LA ZONA DE POLIMORFISMO ROBERTSONIANO DE BARCELONA

2.1. INTRODUCCIÓN

El ratón doméstico constituye un modelo fundamental para estudios de especiación cromosómica. Esto es debido a la multitud de razas cariotípicas de neo-formación que presenta y a que los reordenamientos cromosómicos que se producen en esta especie parecen estar asociados con una fertilidad reducida cuando se encuentran en estado heterocigoto (King, 1995). Sin embargo, los estudios teóricos sugieren que tales polimorfismos pueden fijarse en las poblaciones locales por una serie de factores que actúan independientemente o conjuntamente. El hallazgo de diferencias cromosómicas entre muchas especies cercanas sugiere que la fijación de variantes cromosómicas sucede frecuentemente en la evolución. En el caso de subdominancia existe una frecuencia de equilibrio inestable por debajo de la cual el mutante es eliminado, mientras que por encima de la misma progresa hasta la fijación (Wright, 1941). Cualquier factor que cause que la frecuencia de las distintas organizaciones cromosómicas fluctúe por encima del equilibrio puede provocar la fijación de estas mutaciones. La deriva genética y los eventos de extinción-recolonización son dos de estos factores (Hedrick, 1981; Lande, 1985). Bajo extinción-recolonización, la probabilidad de fijación en demos semi-aislados se maximiza para un flujo genético intermedio (Michalakis & Olivieri, 1993). Otros dos factores relevantes son la consanguinidad, que retrasa el progreso de la fijación bajo deriva genética, y el impulso meiótico que disminuye o elimina la frecuencia de equilibrio (Hedrick, 1981). Estas consideraciones teóricas se aplican principalmente en poblaciones subdivididas debido a que en poblaciones grandes y continuas la fijación es probable sólo cuando el mutante homocigoto tiene una ventaja selectiva substancial (Barton & Rouhani, 1991).

Como ya se ha descrito en el capítulo anterior, en el ratón doméstico es frecuente que se generen áreas de polimorfismo Robertsoniano, denominadas habitualmente “zonas híbridas”, entre razas cromosómicas y poblaciones estándar, o entre diferentes razas cromosómicas, caracterizadas por tener un número cromosómico comprendido entre las dos poblaciones que las han generado y por la presencia, en sus individuos, de cromosomas metacéntricos en heterocigosis. Las zonas híbridas son “regiones en las que individuos de dos poblaciones que se pueden diferenciar por uno o más caracteres heredables, se encuentran, se reproducen y dan lugar a híbridos” (Barton & Hewitt, 1989; Harrison, 1990). Este proceso

2.1. INTRODUCCIÓN

ocurre de forma natural y los híbridos generados son viables y al menos en parte fértiles (Arnold, 1997). En la mayoría de estas áreas se generan un amplio rango de genotipos sobre los que pueden actuar mecanismos selectivos que contrarrestan el flujo genético y mantienen las poblaciones como unidades diferenciadas a pesar de la hibridación.

Se han propuesto dos escenarios para explicar los patrones de variación en las zonas híbridas: contacto secundario e intergradación primaria (Mayr, 1942; 1963; Harrison, 1990). El primero sugiere que las zonas híbridas son el resultado del contacto entre poblaciones que estuvieron previamente aisladas geográficamente. Si el aislamiento reproductivo no se ha alcanzado completamente se puede producir hibridación. Según el escenario de intergradación primaria, las áreas aparecen *in situ*, es decir, en poblaciones que presentan una distribución continua en parapatría y que se diferencian a lo largo de un gradiente ecológico sin una separación inicial entre ellas. A pesar de que la explicación del contacto secundario ha sido tradicionalmente la más abogada por su consistencia con el extendido punto de vista de que la divergencia genética necesita aislamiento geográfico, Endler (1977) argumentó que es difícil inferir los orígenes de los patrones actuales de variación. Utilizando el análisis de clinas de loci individuales, y definiendo como clina un cambio geográfico más o menos continuo en la frecuencia de formas alternativas de un gen, cromosoma o carácter, este autor mostró que el contacto secundario y la intergradación primaria producen patrones no diferenciales, a no ser que se pueda observar una zona híbrida en los primeros centenares de generaciones desde que se ha producido el contacto secundario. Barton & Hewitt (1981) argumentaron que las clinas concordantes (similar amplitud y forma) y coincidentes (centros de las clinas en la misma posición) son evidencia de contacto secundario. Asimismo, estos autores destacan que tal evidencia será particularmente convincente si algunas de las clinas reflejan cambios en caracteres conocidos como neutrales. En este caso se espera que las poblaciones del centro de la zona híbrida actúen como una barrera genética, debido en parte a un fuerte desequilibrio gamético establecido a lo largo de todo el genoma (Barton & Hewitt, 1985). Pero si la presión de selección actúa de forma diferente en una variedad de caracteres y loci en la zona híbrida, es de esperar que la introgresión de cada carácter en esta área difiera dando como resultado múltiples clinas, siendo en algunos casos no coincidentes y no concordantes. Por otra parte, en la intergradación primaria no se esperan clinas



coincidentes, a no ser que diversos caracteres independientes respondan de manera similar a un gradiente o mosaico ambiental.

Muchas zonas híbridas parecen ser relativamente estables, manteniendo la posición y la amplitud de las clinas por un balance entre la dispersión y la selección en contra de los híbridos, independientemente del ambiente. Estas zonas reciben el nombre de zonas de tensión (*tension zones*; Key, 1968; Barton & Hewitt, 1985). Otras zonas híbridas se mantienen por selección exógena debida al ambiente, como por ejemplo una barrera climática (Haldane, 1948; Endler, 1977). En este caso, la selección diferencial a favor o en contra de un genotipo determinado a través de un ecotono podría causar que las clinas dieran lugar a una barrera entre ambientes. Las clinas también se pueden mantener por selección endógena, como por ejemplo la selección en contra de los heterocigotos, selección epistática o selección dependiente de la frecuencia en contra de genotipos raros. Para este tipo de selección, la posición de una clina en el ambiente es arbitraria. Cualquier asimetría de la selección o migración a través de la clina podrá ocasionar su desplazamiento (Bazykin, 1969; Barton, 1979; Mallet & Barton, 1989; Johnson *et al.*, 1990). Por otra parte, la amplitud de la clina se relaciona con la capacidad de dispersión de un organismo y con la fuerza de la selección (Harrison, 1993).

La existencia de contactos parapátricos ha atraído la atención de los investigadores por dos motivos. En primer lugar porque las zonas de hibridación son ventanas abiertas a los procesos evolutivos y, segundo, porque el mantenimiento de las discontinuidades en caracteres, a pesar de la continua hibridación, hace que las poblaciones sean difíciles de clasificar bajo los esquemas taxonómicos convencionales (Harrison, 1990). Es precisamente en este tipo de zonas en las que se encuentra un conflicto entre el flujo génico y la selección hacia un equilibrio estable alternativo y puede entonces proveer información de ambos procesos (Barton & Hewitt, 1985). Existe una vasta literatura que documenta casos de zonas híbridas en plantas y animales, pero el origen y el destino de tales zonas, incluyendo su papel en procesos de especiación, continúa estando fuertemente debatido. La mayor parte de las zonas híbridas que se han estudiado en detalle muestran cambios concordantes en las frecuencias alélicas o caracteres cuantitativos, los cuales separan poblaciones homogéneas.

2.1. INTRODUCCIÓN

El análisis de las zonas híbridas se ha centrado en los últimos años en la naturaleza y el papel de los reordenamientos cromosómicos. Existen diversos estudios detallados en zonas híbridas Robertsonianas del ratón doméstico en Bélgica (Bauchau *et al.*, 1990; Hübner & Koulischer, 1990), Dinamarca (Fel-Clair *et al.*, 1996), Italia central (Spirito *et al.*, 1980; Castiglia & Capanna, 1999), norte de Italia (Hauffe & Searle, 1998), norte de Escocia (Searle *et al.*, 1993) y Túnez (Saïd *et al.*, 1999).

En las cercanías de Barcelona Adolph & Klein (1981) describieron por primera vez la existencia de fusiones Robertsonianas en poblaciones de *Mus domesticus*. En el trayecto que une las localidades de Badalona, Barcelona, Avinyonet y Sant Martí Sarroca encontraron una variación cromosómica entre $2n=40$ y $2n=31$. Los animales con menor número cromosómico fueron hallados en Avinyonet (localidad situada en el noroeste de Barcelona). Su determinación cariológica reveló la presencia de las fusiones Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(9.11) y Rb(12.13) en homocigosis y la Rb(6.10) en estado heterocigoto. Estos autores sugirieron que esta área era un sistema de variación Robertsoniana que apareció independientemente del Alpino-Apenino y del de Escocia. Posteriormente Nachman *et al.* (1994), encontraron en esta misma localidad animales con un $2n=30$ y con las fusiones Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(9.11) y Rb(12.13) en estado homocigoto. Más tarde, un estudio más exhaustivo de la zona (Gündüz, 2000; Gündüz *et al.*, 2001), en el que se incluyeron 20 localidades de muestreo, detectó una nueva translocación, Rb(3.8), sugiriendo la existencia de una raza cromosómica, denominada raza Barcelona con 28 cromosomas, y con las translocaciones Rb(3.8), Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(9.11) y Rb(12.13) en estado homocigoto. Estos autores ubicaron la hipotética raza en un punto intermedio entre las localidades de Garraf y Viladecans, que denominaron centro de la raza Barcelona. Describieron también una zona de polimorfismo Robertsoniano, que abarcaba una distancia de 30 km a partir del centro de la raza, y que clasificaron como zona híbrida entre la raza Barcelona y las poblaciones con cariotipo estándar. Además, Gündüz (2000) analizó las variaciones de alozimas y de haplotipos de ADNmt en esta zona de polimorfismo Robertsoniano, no encontrando un patrón concordante entre éstas y la variación cromosómica. Existen otros estudios que muestran datos referentes a variación de ADNmt y alozimas en algunas poblaciones de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona, pero éstos forman parte de investigaciones más amplias que se centran en la



evolución de las razas cromosómicas Robertsonianas de ratón doméstico en Europa y norte de África (Nachman *et al.*, 1994; Britton-Davidian *et al.*, 1989).

El presente estudio pretende ser una ampliación de estos trabajos en la caracterización de esta zona de polimorfismo Robertsoniano, en el que se aportan nuevos datos sobre la distribución y extensión de las fusiones encontradas. Se examina la estructura de la zona de polimorfismo Robertsoniano Barcelona, basándose en la identificación de las bandas G de los cromosomas metacéntricos en ratones colectados entre 1998 y 2000, y de datos procedentes de la bibliografía (Adolph & Klein, 1981; Nachman *et al.*, 1994; Gündüz, 2000; Gündüz *et al.*, 2001). A partir de dicho material se realiza un análisis comparativo entre poblaciones con diverso grado de polimorfismo Robertsoniano y se estudia la fragmentación de la metapoblación para profundizar en el conocimiento del sistema complejo de variación Robertsoniana en esta zona.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Área de estudio y muestra analizada

El área de estudio se localiza en el nordeste de la península Ibérica. Concretamente, comprendió la provincia de Barcelona, el sur de la provincia Lleida y el nordeste de la provincia de Tarragona. Se prospectaron un total de 15 granjas en las cercanías de Barcelona entre febrero de 1998 y octubre del 2000 (figura 2.1; tabla 2.1). Las zonas de muestreo fueron seleccionadas siguiendo estudios previos realizados sobre esta zona por otros autores (figura 2.1; tabla 2.1; Adolph & Klein, 1981; Nachman *et al.*, 1994, Gündüz, 2000; Gündüz *et al.*, 2001). Todos los animales se capturaron mediante trampas de vivo Scherman, que se colocaron en las granjas a última hora de la tarde y se recogieron a primera hora de la mañana del día siguiente. Los animales capturados fueron transportados inmediatamente al laboratorio donde estuvieron estabulados durante un máximo de tres días hasta el momento de su estudio.

Se obtuvieron preparaciones cromosómicas a partir de la médula ósea del fémur (Ford, 1966). Los portaobjetos con las extensiones se mantuvieron 12 horas en la estufa a

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

temperatura constante de 37°C. Pasado este período de envejecimiento de las muestras se realizó la tinción de Wright (Mandahl, 1992) que tiñe las bandas G de los cromosomas en metafase. La identificación de los cromosomas se realizó de acuerdo con el "Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice" (1972; 1974) a partir del análisis completo de diez células bajo el microscopio.

Para los análisis de la estructura poblacional relacionada con el polimorfismo Robertsoniano se analizaron un total de 451 animales. Además de los animales capturados entre 1998 y 2000 (n=337), se incorporaron los datos cariológicos publicados de esta zona: 110 individuos procedentes de 20 localidades (Gündüz *et al.*, 2001) y 4 individuos de 2 localidades (Nachman *et al.* 1994). Los datos obtenidos por Adolph & Klein (1981) no fueron incluidos debido a la antigüedad de las citas. El área de estudio presentó una superficie total de unos 5000 km².

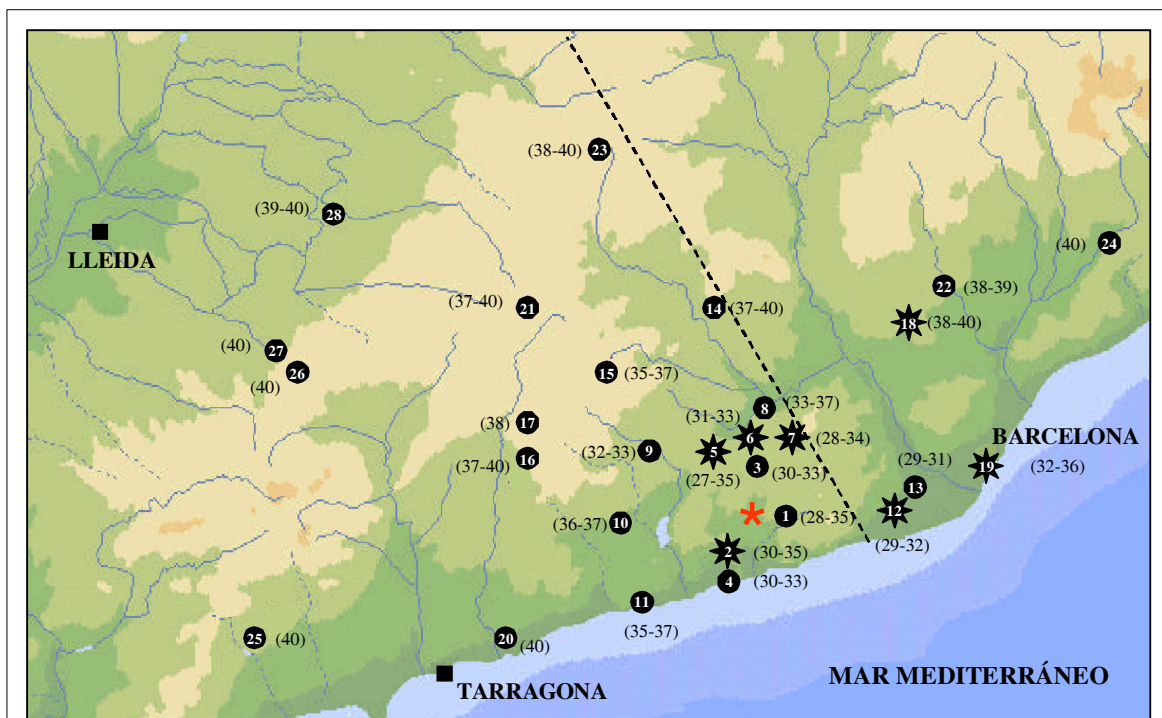


Figura 2.1. Mapa de la zona de polimorfismo Robertsoniano Barcelona de *M. domesticus*. Entre paréntesis se muestran los rangos de $2n$ encontrados en cada población muestreada. La relación de las localidades se expone en la tabla 2.1. Las localidades muestreadas a partir de 1998 se indican con una estrella. El asterisco muestra el centro estimado de la zona de polimorfismo Robertsoniano. Las poblaciones situadas al oeste de la línea discontinua son las consideradas en el cálculo de las clinas.

2.2.2. Análisis de los datos

En el análisis de los datos, cada translocación Robertsoniana y sus dos cromosomas homólogos acrocéntricos fueron considerados como dos alelos de un mismo locus, puesto que siempre se encontraron fusionados los mismos cromosomas, es decir, en la condición metacéntrica el cromosoma 3 siempre se encontró fusionado con el 8, el 4 con el 14, y así sucesivamente. Los cromosomas metacéntricos fueron designados individualmente con una 'A' y su pareja de homólogos acrocéntricos se denominó 'B'. Así la pareja de cromosomas homocigotos para su estado metacéntrico y acrocéntrico se determinó como 'AA' y 'BB', respectivamente, y la pareja heterocigota 'AB'.

2.2.2.1. Frecuencias de las translocaciones Robertsonianas, polimorfismo Robertsoniano, equilibrio Hardy Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Se obtuvieron las frecuencias de cada uno de los metacéntricos en cada una de las localidades. Para ello sólo se utilizaron aquellos animales de los que se disponía la identificación del cariotipo completa. Puesto que 12 de las 28 localidades fueron prospectadas durante varios años, se calculó el estadístico F_{ST} para medir la diferenciación temporal de los lugares prospectados durante más de un año (Weir & Cockerham, 1984; para más detalles ver apartado 2.2.2.2). Se utilizó el test de permutación del programa FSTAT v2.9.3.2 (véase apartado 2.2.2.4), el cual es un método potente para detectar diferencias temporales en las poblaciones (Goudet *et al.*, 1996; Lugon-Moulin *et al.*, 1999). Se estudió si los valores F_{ST} diferían significativamente de cero utilizando 10000 permutaciones de los genotipos entre las muestras. Para estos análisis se consideraron las localidades que presentaban polimorfismo Robertsoniano, al menos en alguno de los años considerados: Bellaterra, Calafell, Garraf, La Granada, Les Pobles, Sant Pau d'Ordal y Vilanova i la Geltrú. Sabadell no fue incluida debido en que uno de los muestreos tan sólo se obtuvo un individuo. Tampoco se incluyó Avinyonet, puesto que el tamaño de muestra para cada uno de los años fue de dos (tabla 2.2).

Para visualizar la transición en términos de proporción de genotipos individuales en cada población, se calculó un índice de hibridación (I). A cada cromosoma metacéntrico se le

asignó una puntuación de +1 y a su correspondiente pareja de acrocéntricos una puntuación de -1 (Gündüz *et al.*, 2001). Así los animales estándar recibieron la puntuación de -14 y los homocigotos para todas las fusiones +14. Se obtuvo el número medio de $2n$ por localidad para tener una estima del sentido de la reducción cromosómica, y el número medio de metacéntricos en heterocigosis por individuo. Además de estos índices, para analizar la variabilidad citogenética poblacional se utilizaron otros indicadores: número medio de alelos por locus para cada población, porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosis media. Para el cálculo de estos indicadores se consideró cada fusión Robertsoniana como un alelo perteneciente a un locus, tal y como se describió en el apartado 2.2.2. Aunque el número medio de alelos por locus para cada población no es una medida muy fiable, puesto que depende mucho de tamaños muestrales, da cierta idea del grado de polimorfismo de las poblaciones. En el cálculo del porcentaje de loci polimórficos se utilizó el criterio de la frecuencia del alelo más común igual o inferior a 0,95, criterio recomendado por Nei (1987) para tamaños muestrales inferiores a 50 individuos. La heterocigosis media es la proporción media de heterocigotos por locus en una población (Nei, 1987). Para muestras pequeñas Nei (1978) recomienda utilizar:

$$H' = \sum_{k=1}^r h_k / r$$

donde h_k es el valor de h para k_i locus, $h = 2n(1 - \sum x_i^2)/(2n-1)$, $r = n^o$ de loci, $n = n^o$ individuos por loci, y x es la frecuencia de cada alelo en un locus. Para todos estos cálculos se utilizaron aquellos ejemplares de los que se obtuvo la caracterización completa del cariotipo. Sólo para el cálculo del índice de hibridación y el $2n$ medio se utilizaron todos los animales de los

Tabla 2.1. Ubicación y características cromosómicas de las localidades de las que se dispone datos de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona. Las localidades están ordenadas según la distancia al centro de polimorfismo Robertsoniano (véase apartado 2.2.2.1 y figura 2.1). N corresponde al número de individuos de los que se dispone el cariotipo completo. Los marcados con un asterisco corresponden a datos procedentes de Adolph & Klein (1981), los que están en cursiva proceden de Nachman *et al.* (1994) y los resaltados en negrita proceden de Gündüz *et al.* (2001). I es el índice de hibridación, donde un valor de +14 corresponde a un individuo con todas las fusiones en homocigosis ($2n=26$), y un valor de -14 representa un individuo estándar ($2n=40$). H es el número medio de metacéntricos en heterocigosis por individuo (Gündüz *et al.*, 2001). Los números entre paréntesis hacen referencia a ejemplares de los que únicamente se conoce el $2n$, utilizados sólo para calcular el $2n$ medio y el índice de hibridación (I).

Tabla 2.2. Número de individuos capturados por año en las localidades muestreadas en más de una ocasión.

Localidad	1994	1996	1997	1998	1999	2000
Avinyonet	2	2	-	-	-	-
Bellaterra	-	-	-	19	-	3
Calafell	-	-	5	15	-	-
Fullella	-	1	-	21	-	-
Garraf	-	-	7	16	11	-
La Granada	-	-	-	22	20	16
La Riera	-	8	-	3	-	-
Les Pobles	-	8	-	15	-	-
L'Espluga Calba	-	4	-	5	-	-
Sabadell	-	1	-	-	8	-
St. Pau d'Ordal	-	-	-	45	10	-
Vilanova i la Geltrú I	-	6	2	11	-	-

que se disponían el número diploide, aunque la identificación de los cromosomas no fuera completa. Se estudió la correlación de estas variables con la distancia geográfica de la población al centro de la zona de polimorfismo Robertsoniano. Este centro se estimó como el punto medio entre las poblaciones en las que se pudieron describir todos los metacéntricos encontrados en el área de estudio. Sólo se utilizaron las localidades cuyas muestras presentaban cinco o más individuos.

Según la ley de Hardy-Weinberg en una población, en ausencia de fuerzas como la selección, migración o deriva genética, y donde se da panmixia, las frecuencias alélicas (y las genotípicas) se mantienen constantes de generación en generación. Si las frecuencias observadas no se ajustan a las esperadas por esta ley, se supone entonces que se ha violado alguna de las condiciones anteriores. Para comprobar las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) de cada uno de los metacéntricos, en cada muestra se realizó la prueba de significación de probabilidades exactas que evita las dificultades que aparecen cuando se utiliza la distribución de la χ^2 para muestras pequeñas (Haldane, 1954; Guo & Thompson, 1992). El p-valor fue calculado por el método de enumeración completa descrito por Louis & Dempster (1987). Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg para el global de los metacéntricos en cada una de las muestras se estudiaron mediante el método de Fisher (Raymond & Rousset, 1995). Puesto que en ciertos estudios se ha observado que se produce segregación conjunta de los cromosomas isomórficos (Castiglia & Capanna, 2000; Scascitelli *et al.*, 2003), se determinó si ciertas parejas de cromosomas metacéntricos se encontraron más frecuentemente en cada una de las muestras, es decir, se estudió si



existía desequilibrio de ligamiento. Con este propósito se utilizó la prueba exacta de Fisher, basada en la cadena de Markov para el cálculo del valor de significación (Guo & Thompson, 1992; Raymond & Rousset, 1995). Cuando se emplearon pruebas múltiples para el estudio del equilibrio Hardy Weinberg o el desequilibrio de ligamiento dentro de las poblaciones individuales, se ajustaron los niveles de significación mediante la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Todos estos tests se realizaron sólo en aquellas muestras con cinco o más individuos.

2.2.2.2. Estructura de la población atendiendo a la composición de metacéntricos Robertsonianos

En una población que esté subdividida, existen tres niveles de diferenciación genética: dentro de cada subpoblación (I), entre subpoblaciones (S) y en la metapoblación (T), es decir, en el conjunto de las subpoblaciones (Hartl, 1981; Hartl & Clark, 1989). Para evaluar la subdivisión poblacional se utilizaron los índices de fijación de Wright (F_{IT} , F_{IS} y F_{ST} ; Wright, 1951), que se obtuvieron según el método descrito por Weir & Cockerham (1984):

- f , coeficiente de endogamia: éste corresponde a F_{IS} de Wright. Es una medida de la desviación de las frecuencias genotípicas de las frecuencias panmíticas, en términos de exceso o deficiencia de heterocigotos, causada por la tendencia a que se den cruces entre individuos emparentados. Convencionalmente se define como la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia respecto a la subpoblación. El valor de este índice varía entre -1 y 1. Los valores negativos indican exceso de heterocigotos, respecto al equilibrio Hardy Weinberg, y los positivos, deficiencia. El índice f se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\hat{f} = \frac{\sigma_b}{\sigma_b + \sigma_c}$$

donde σ_b representa la componente de la varianza entre individuos dentro de las poblaciones y σ_c entre gametos dentro de los individuos.

- θ , coeficiente del coancestro o coeficiente de fijación: corresponde a F_{ST} de Wright. Mide el efecto de la subdivisión genética, es decir, la reducción de la heterocigosidad en una población debida a la deriva genética. Se define como la correlación de alelos de diferentes individuos en la misma población. Varía entre cero y uno. El valor cero indica panmixia, es decir, que no existe subdivisión, dándose apareamientos aleatorios, no produciéndose divergencia genética en la metapoblación. El valor de uno indica aislamiento completo, es decir, una subdivisión extrema de la metapoblación. Se obtiene según:

$$\hat{\theta} = \frac{\sigma_a}{\sigma_a + \sigma_b + \sigma_c}$$

donde σ_a representa la varianza entre poblaciones.

- F , coeficiente general de consanguinidad o índice de fijación en la metapoblación: corresponde a F_{IT} de Wright y es un indicador de si dos alelos de un mismo locus en un individuo son idénticos por descendencia respecto a la metapoblación. Al igual que f los valores varían entre -1 y 1, dependiendo de si existe exceso de heterocigotos o defecto, respecto al equilibrio Hardy-Weinberg. La reducción total de heterocigotos incluye por una parte los fenómenos de endogamia en las subpoblaciones (F_{IS}) y los efectos de la propia subdivisión (F_{ST}) por otra. Se calcula según:

$$F = \frac{\sigma_a + \sigma_b}{\sigma_a + \sigma_b + \sigma_c}$$

Los estimadores de Weir & Cockerham (1984) corrigen los problemas derivados del tamaño de muestra y del número de subpoblaciones muestreadas. Los tres parámetros se relacionan por:

$$f = (F - \theta) / (1 - \theta)$$

Los estimadores de Weir & Cockerham para cada loci, así como su error típico, fueron obtenidos por el método de remuestreo Jackknife sobre las muestras (Miller, 1974; Efron,

1982). En primer lugar se calcularon estos estadísticos considerando todas las localidades (estándar y con polimorfismo Robertsoniano). Estos análisis se repitieron excluyendo las localidades estándar. En ambos casos no se incluyó la muestra perteneciente a Les Ordes, puesto que sólo presentó un individuo. Para evaluar la significación de estos estadísticos se utilizó el intervalo de confianza del 95% calculado como +/- dos veces el error típico sobre el valor del estadístico (Efron & Stein, 1981). El número de migrantes entre parejas de poblaciones (N_m) se estimó según Wright (1969) como:

$$N_m = (1/F_{ST} - 1)/4$$

También se obtuvo la heterocigosidad observada (H_o), y las heterocigosidades esperadas dentro de la población (H_s) y entre poblaciones (H_T), según Nei (1987). Como en el caso anterior se realizaron dos tipos de análisis: para el conjunto de todas las poblaciones, y considerando sólo las localidades con polimorfismo Robertsoniano.

Se estudió la asociación entre la diferenciación poblacional (estimaciones de F_{ST} entre pares de muestras) y la distancia geográfica. Para ello se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967; Sokal, 1979) entre $F_{ST}(1-F_{ST})$ y el logaritmo de la distancia geográfica entre poblaciones, tal y como indica Rousset (1997) para una distribución geográfica bidimensional. El índice F_{ST} está relacionado con la distancia de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983; Slatkin, 1995), por lo que responde a una diferenciación entre las poblaciones debida básicamente a la deriva genética. Se realizó también la correlación entre la matriz de distancias geográficas y las distancias genéticas de Nei y Rogers. La distancia de Nei utilizada fue la corregida para tamaños muestrales pequeños (Nei, 1978). Ésta intenta reflejar el número de cambios que se han producido desde la separación de dos poblaciones y es apropiada cuando las poblaciones divergen a causa de la deriva y de las mutaciones (Weir, 1996), pero considera que el ritmo de mutaciones es constante, lo que puede ser poco realista (Hillis, 1984). Además presenta otro problema añadido, su falta de metricidad. Al comparar las distancias entre tres taxones A, B y C, la distancia AC tiene que ser inferior o igual a las distancias AB más BC, por lo que se pueden obtener distancias negativas dificultando su interpretación biológica. A pesar de estos problemas, la distancia genética de Nei es el coeficiente más ampliamente

utilizado. La distancia genética de Rogers (1972) no tiene un significado biológico como el anterior. Es una estimación geométrica de la distancia media entre las frecuencias alélicas de dos poblaciones. En este caso no es necesario asumir la igualdad y la constancia en el ritmo de evolución entre loci y entre poblaciones. Sin embargo, al igual que la anterior distancia, está influenciada por el grado de heterocigosis de los taxones. Así, la distancia entre dos taxones con alelos diferentes y fijados será mayor que la distancia entre dos taxones que tampoco compartan ningún alelo pero que presenten varios alelos por loci. Para el cálculo de las diversas distancias sólo se utilizaron las poblaciones con polimorfismo Robertsoniano.

La relación citogenética entre poblaciones polimórficas se evaluó mediante un análisis jerárquico de conglomerados, a partir del método UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averages*; Sneath & Sokal, 1973). Este se realizó utilizando las distancias de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983; Slatkin, 1995), de Nei (Nei, 1978) y de Rogers (Rogers, 1972). Se utilizó la correlación cofenética como medida de bondad de ajuste entre las distancias originales y las distancias ultramétricas obtenidas a partir del UPGMA (Sneath & Sokal, 1973; Rohlf & Sokal, 1981). La correlación cofenética correspondió al coeficiente r obtenido a partir de la prueba de Mantel entre cada una de las matrices de distancias y la matriz de distancias ultramétricas correspondiente. 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.

2.2.2.3. Análisis de las clinas de las frecuencias de los metacéntricos en una dimensión

Se estimaron las formas de las clinas en una dimensión para cada uno de los metacéntricos Robertsonianos. Para estas estimaciones se utilizaron aquellas muestras procedentes del transecto oeste (figura 2.1) y con un tamaño de muestra igual o superior a cinco. Las clinas fueron ajustadas, por máxima verosimilitud, a una curva tangente hiperbólica (\tanh) mediante el algoritmo de Metrópolis (Szymura & Barton, 1986). Para este ajuste se utilizaron cuatro variables: p_{\max} , p_{\min} (la frecuencia máxima y mínima en el final de la cola de la clina), la amplitud y el centro de la clina. Sin embargo, para los objetivos del presente estudio, las clinas fueron ajustadas fijando los valores de p_{\max} y p_{\min} en 1 y 0, respectivamente, asumiéndose que en el centro de la zona de polimorfismo Robertsoniano la frecuencia de



metacéntricos era de 1 y en los lugares más alejados de este centro era 0. La distancia a la que se encontraba cada una de las poblaciones se calculó respecto al centro de la zona de polimorfismo Robertsoniano, estimado como se explicó en el apartado 2.2.2.1. En cada clina se obtuvo la amplitud, definida como la inversa de la máxima pendiente (Endler, 1977), y el centro, que es la posición del máximo cambio en frecuencia. Para la obtención de la región crítica de estos parámetros se siguió el criterio de que los valores del \log_e de la verosimilitud se situaran dos unidades por debajo del máximo. Esta región crítica es asintóticamente equivalente al intervalo de confianza del 95% (Edwards, 1972). Para estudiar la concordancia y la coincidencia (semejanza en las amplitudes y los centros, respectivamente) entre las clinas de los diferentes metacéntricos, se utilizó el contraste de verosimilitud. En muestras grandes, dos veces la diferencia en \log_e de verosimilitud (ΔL) se distribuye aproximadamente como χ^2 , con un número de grados de libertad igual a la diferencia de parámetros que se estiman entre los modelos contrastados. Para la comparación entre amplitudes de las clinas (concordancia) se ajustó una curva tanh para un metacéntrico, manteniendo fijo el valor de la amplitud de la clina de uno de los metacéntricos respecto al valor de la amplitud de la clina del metacéntrico con el cual se compara, sólo dejando variar el centro de la curva. Si dos veces la diferencia entre valor del \log_e de la verosimilitud, con este parámetro fijado, y el valor del \log_e de la verosimilitud obtenido sin fijar para ninguno de los dos parámetros (amplitud y centro) fue menor que el valor de χ^2 con un grado de libertad, se consideraron las clinas concordantes. Para la coincidencia de las clinas, se siguió el mismo proceso pero esta vez fijando el valor del centro de la curva y dejando variar las amplitudes (para detalles ver Szymura & Barton, 1986 y Fel-Clair *et al.*, 1996).

2.2.2.4. Programas estadísticos

Las frecuencias de las translocaciones Robertsonianas el número medio de alelos por locus, el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosidad media, así como las distancias genéticas de Nei y Rogers, se obtuvieron mediante el programa BIOSYS-2 (D. L. Swofford & R. B. Selander, University of Illinois, 1997). Los análisis del equilibrio Hardy-Weinberg y de desequilibrio de ligamiento se realizaron mediante el programa GENEPOP v3.4 (Raymond & Rousset, 1995). Para la obtención de los índices de fijación de Wright, según el método

2.3. RESULTADOS

descrito por Weir & Cockerham (1984) se utilizó el programa FSTAT v2.9.3.2 (J. Goudet, University of Lausanne, 2002). Las pruebas de Mantel, así como la obtención de los UPGMA se realizaron mediante el programa NTSYS-pc v2.01 (NTSYS Inc., 1986-1997).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Cariotipos

El número de animales por localidad, la procedencia de los datos, el $2n$ y los metacéntricos de cada animal se muestran en el apéndice 1. El número cromosómico varió entre 27 y 40 con un total de 114 cariotipos diferentes. La zona de polimorfismo presentó una extensión de unos 5000 km² de superficie y mostró una distribución clinal en cuanto al número cromosómico, obteniéndose los menores $2n$ en la zona de Garraf y los cariotipos estándar ($2n=40$) en la periferia del área de muestreo (figura 2.2 H; tabla 2.1). Se pudieron identificar siete fusiones diferentes: Rb(3.8), Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(7.17), Rb(9.11) y Rb(12.13). De estos metacéntricos, Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(9.11) y Rb(12.13) fueron encontrados previamente por Adolph & Klein (1981), y Rb(3.8) por Gündüz *et al.* (2001). La translocación Rb(7.17), descrita por primera vez en este área, no ha sido hallada en ninguna de las poblaciones Robertsonianas conocidas de Europa y Norte de África de *M. domesticus*. No se localizó ninguna raza cromosómica, con un $2n$ inferior a 40, siguiendo el criterio de Hausser *et al.* (1994). Las reordenaciones cromosómicas fueron identificados en 322 individuos: 47 fueron homocigotos y 275 heterocigotos al menos para una fusión. Se encontraron 143 animales heterocigotos simples y 132 heterocigotos múltiples, de los cuales 88 presentaron dos fusiones en heterocigosis, 34 con tres translocaciones en heterocigosis y 8 con cuatro fusiones en heterocigosis. Con más de cuatro fusiones en heterocigosis sólo se encontraron dos ejemplares, uno con cinco y otro con seis. Los cariotipos más frecuentes fueron: M 4.14, 5.15, 6.10, 9.11, 12.13 H 3.8 ($n=13$), es decir homocigotos para las fusiones Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(9.11), Rb(12.13) y heterocigoto para la Rb(3.8), M 4.14, 5.15, 6.10, 9.11, 12.13 H 3.8, 6.10 ($n=15$), M 4.14, 5.15, 9.11, 12.13 H 3.8 ($n=16$), M 4.14, 5.15, 9.11, 12.13 ($n=15$) y M 4.14, 5.15, 9.11, 12.13 H 6.10 ($n=11$). El resto de cariotipos no estuvieron presentes en más de diez ejemplares. No se encontraron heterocigotos complejos,



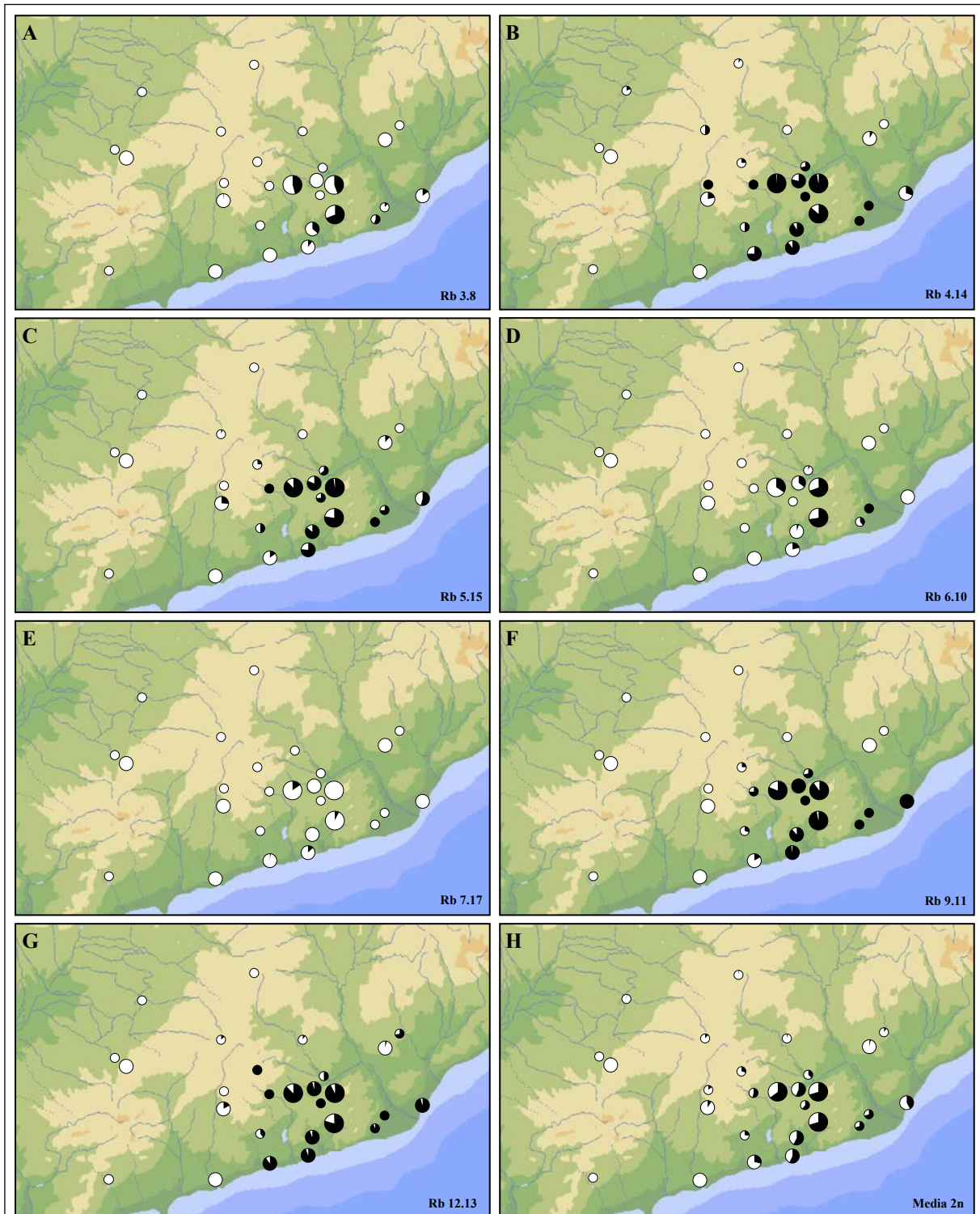
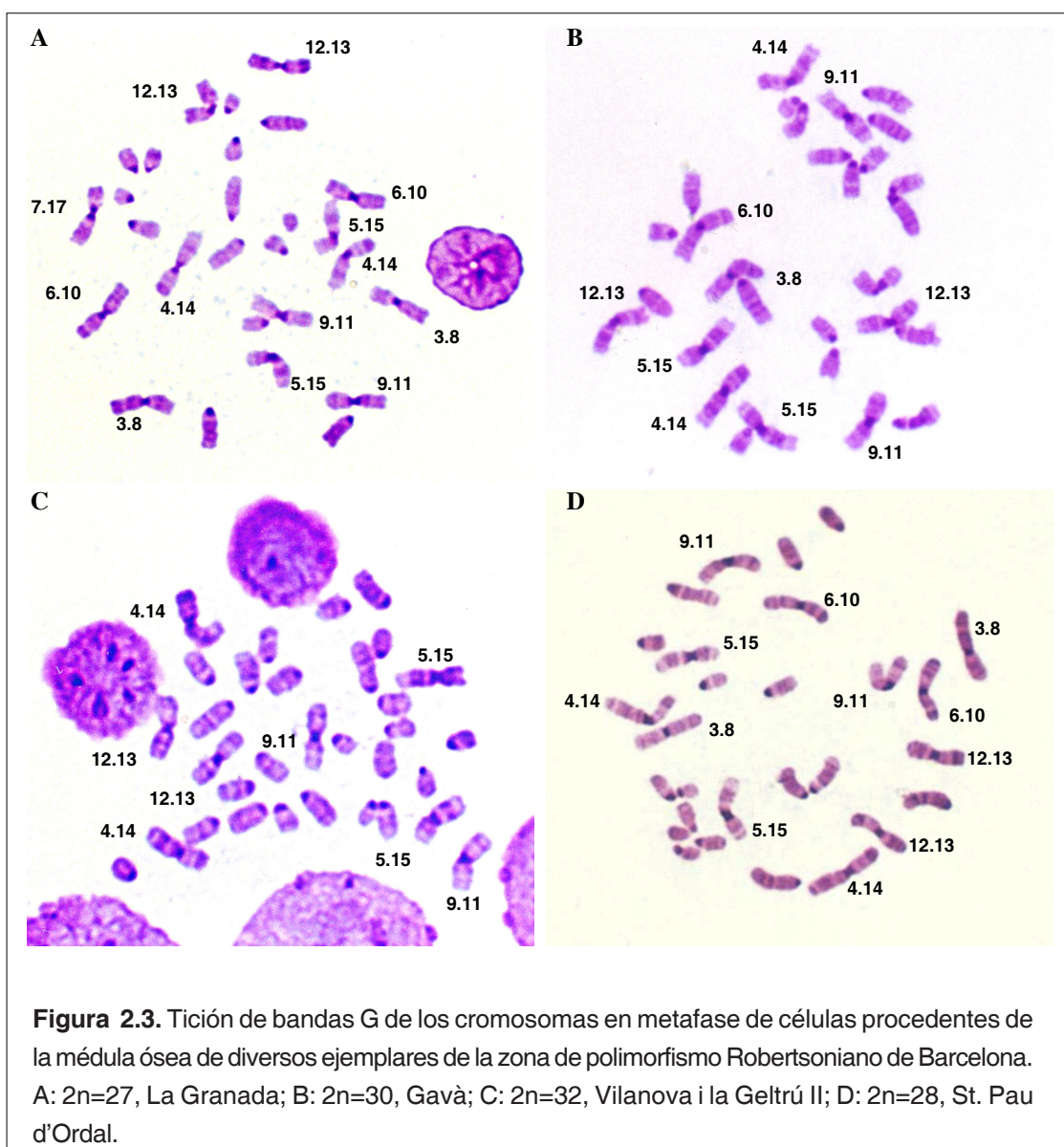


Figura 2.2. A-G, frecuencias (en negro) de cada uno de los metacéntricos por localidades. H: $2n$ medio en cada localidad muestreada. El tamaño de los círculos es proporcional al tamaño de la muestra. Las localidades se relacionan en la figura 2.1 y tabla 2.1.

es decir, con homología monobranquial. Tampoco se identificaron animales con todas las fusiones descritas en homocigosis, es decir con un $2n=26$. En la figura 2.3 se muestran algunos cariotipos donde se pueden observar las fusiones encontradas en el área estudiada.

2.3. RESULTADOS

Las translocaciones Robertsonianas se presentaron en 23 poblaciones de las 28 muestreadas. Las únicas localidades en las que se identificaron las siete fusiones fueron Garraf, La Granada y Vilanova i la Geltrú I. Estas tres localidades se utilizaron para determinar el centro de la zona polimórfica (véase figuras 2.1). Los metacéntricos más representados en las poblaciones fueron el Rb(4.14), el Rb(12.13), el Rb(5.15) y el Rb(9.11), que estuvieron presentes en 21, 20, 18 y 15 poblaciones, respectivamente de las 28 estudiadas (tabla 2.1, figura 2.2). Las fusiones Rb(6.10) y Rb(3.8) se encontraron en 10 y 9 poblaciones, respectivamente y la translocación Rb(7.17) sólo se halló en 4 poblaciones. En cuanto a la extensión geográfica, la translocación Rb(4.14) fue la más ampliamente distribuida, alcanzando un radio de 76 km respecto al centro de la zona polimórfica. Las fusiones



Rb(12.13) y Rb(5.15) presentaron un radio de 44 km, las translocaciones Rb(9.11) y Rb(3.8) se distribuyeron a lo largo de 39 km, y las fusiones Rb(6.10) y Rb(7.17) se extendieron 24 km y 20 km, respectivamente, respecto al centro de la zona.

2.3.2. Frecuencias de las translocaciones Robertsonianas, polimorfismo Robertsoniano, equilibrio Hardy Weinberg y desequilibrio de ligamiento

En las siete localidades en las que se estudió la diferenciación temporal en las frecuencias alélicas (Bellaterra, Calafell, Garraf, La Granada, Les Pobles, Sant Pau d'Ordal y Vilanova i la Geltrú I), no se encontraron diferencias significativas entre los diversos años de muestreo, por lo que todas las muestras pertenecientes a una misma localidad se agruparon para realizar los análisis subsiguientes.

Se detectaron diversas fusiones con frecuencia de 1 en varias poblaciones (tabla 2.1), aunque en la mayoría de éstas no se puede hablar con certeza de fijación, dado el bajo tamaño de muestra. Presentaron frecuencia 1 las fusiones: Rb(4.14), Rb(9.11) y Rb(12.13) en Avinyonet (n=4), la Rb(9.11) en Lavern (n=24), la Rb(5.15) en Sant Pau d'Ordal (n=55), la Rb(4.14), Rb(5.15) y Rb(12.13) en Sant Martí Sarroca (n=4), la Rb(4.14), Rb(5.15) y Rb(9.11) en Gavà (n=9), la Rb(4.14), Rb(6.10), Rb(9.11) y Rb(12.13) en Viladecans (n=4), la Rb(12.13) en La Llacuna (n=2), la Rb(4.14) en Les Ordes (n=1) y finalmente la Rb(9.11) en Barcelona (n=13) (tabla 2.1). Sólo en las poblaciones de Lavern, Sant Pau d'Ordal y quizás en Barcelona, en que las que el número de individuos de la muestra fue mayor, cabe la posibilidad de que se trate de fusiones fijadas. La translocación Rb(7.17) presentó una frecuencia baja en todas las poblaciones, y en ningún caso superó el valor de 0,2.

Se obtuvo una correlación negativa entre la distancia al centro de la zona de polimorfismo Robertsoniano y el índice de hibridación ($r=0,66$; $p<0,001$), el número medio de metacéntricos heterocigotos por individuo ($r=0,63$; $p<0,001$), el número medio de alelos por locus ($r=0,73$; $p<0,001$), el porcentaje de loci polimórficos ($r=0,73$; $p<0,001$) y la heterocigosidad media por locus ($r=0,65$; $p<0,001$). En las tablas 2.1 y 2.3 se muestran los valores de estas variables para cada población. Estos resultados indicaron que los valores más altos de polimorfismo

2.3. RESULTADOS

Tabla 2.3. Número medio de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos y heterocigosidad media por locus para cada una de las muestras. En la primera y tercera variable se muestra el error típico.

Localidad	Número medio de alelos por locus	Porcentaje de loci polimórficos	Heterocigosidad media por locus
1 Garraf	2,00 ± 0,00	85,71	0,28 ± 0,05
2 Vilanova i la Geltrú II	1,86 ± 0,14	85,71	0,18 ± 0,06
3 Avinyonet	1,29 ± 0,18	28,57	0,12 ± 0,08
4 Vilanova i la Geltrú I	2,00 ± 0,00	85,71	0,21 ± 0,04
5 La Granada	2,00 ± 0,00	85,71	0,27 ± 0,06
6 Lavern	1,57 ± 0,20	42,86	0,17 ± 0,07
7 St. Pau d'Ordal	1,71 ± 0,18	57,14	0,19 ± 0,07
8 St. Sadurní d'Anoia	1,71 ± 0,18	71,43	0,29 ± 0,09
9 St. Martí Sarroca	1,14 ± 0,14	14,29	0,06 ± 0,06
10 St. Llorenç del Penedes	1,57 ± 0,20	57,14	0,30 ± 0,11
11 Calafell	1,71 ± 0,18	57,14	0,17 ± 0,06
12 Gavà	1,43 ± 0,20	42,86	0,16 ± 0,09
13 Viladecans	1,29 ± 0,18	28,57	0,10 ± 0,07
14 Vallbona d'Anoia	1,14 ± 0,14	14,29	0,03 ± 0,03
15 La Llacuna	1,43 ± 0,20	42,86	0,21 ± 0,10
16 Les Pobles	1,57 ± 0,20	42,86	0,15 ± 0,07
17 Les Ordes	1,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00
18 Bellaterra	1,43 ± 0,20	28,57	0,05 ± 0,02
19 Barcelona	1,57 ± 0,20	42,86	0,19 ± 0,08
20 La Riera	1,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00
21 Sta. Coloma de Queralt	1,43 ± 0,20	42,86	0,13 ± 0,08
22 Sabadell	1,14 ± 0,14	14,29	0,06 ± 0,06
23 Els Prats de Rei (Calaf)	1,14 ± 0,14	14,29	0,02 ± 0,02
24 La Roca	1,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00
25 Les Borges del Camp	1,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00
26 Fullea	1,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00
27 L'Espluga Calba	1,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00
28 Anglesola	1,14 ± 0,14	14,29	0,05 ± 0,05

se encontraron en las muestras procedentes de localidades próximas al centro de la zona de polimorfismo Robertsoniano.

En todas las muestras se obtuvo equilibrio H-W. El análisis del desequilibrio de ligamiento no reveló, en ninguna de las muestras, asociaciones significativas entre pares de metacéntricos Robertsonianos.

2.3.3. Estructura cromosómica en la población

Los estadísticos F obtenidos considerando todas las muestras o sólo aquellas que presentaron polimorfismo Robertsoniano, fueron similares. Los resultados mostraron un alto nivel de variación cromosómica en la metapoblación (tabla 2.4: F_{IT}). El valor elevado y

Tabla 2.4. Estadísticos F por fusión Robertsoniana y para el total de las fusiones, y estimación de la heterocigosidad según Nei (1987), considerando todas las muestras (parte superior) y sólo las muestras con polimorfismo Robertsoniano (parte inferior).

Metacéntrico	Estimadores F			Estimación de la heterocigosidad			Nm
	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	H_O	H_S	H_T	
<i>Todas las muestras</i>							
Rb(3.8)	0,334 ± 0,118	0,324 ± 0,094	0,012 ± 0,097	0,126	0,123	0,192	0,522
Rb(4.14)	0,677 ± 0,091	0,682 ± 0,078	-0,020 ± 0,086	0,198	0,180	0,500	0,117
Rb(5.15)	0,654 ± 0,082	0,634 ± 0,084	0,054 ± 0,063	0,178	0,192	0,486	0,144
Rb(6.10)	0,455 ± 0,125	0,415 ± 0,111	0,067 ± 0,090	0,110	0,134	0,271	0,352
Rb(7.17)	-0,030 ± 0,147	0,084 ± 0,029	-0,119 ± 0,178	0,024	0,026	0,027	2,726
Rb(9.11)	0,798 ± 0,061	0,765 ± 0,082	0,176 ± 0,162	0,105	0,105	0,492	0,077
Rb(12.13)	0,662 ± 0,083	0,682 ± 0,076	-0,065 ± 0,058	0,140	0,137	0,498	0,117
<i>Total</i>	<i>0,607 ± 0,063</i>	<i>0,598 ± 0,063</i>	<i>0,022 ± 0,021</i>	<i>0,126</i>	<i>0,128</i>	<i>0,353</i>	<i>0,168</i>
<i>Muestras con polimorfismo Rb</i>							
Rb(3.8)	0,307 ± 0,122	0,298 ± 0,099	0,009 ± 0,056	0,155	0,150	0,230	0,589
Rb(4.14)	0,596 ± 0,125	0,602 ± 0,104	-0,023 ± 0,086	0,243	0,219	0,484	0,165
Rb(5.15)	0,583 ± 0,092	0,561 ± 0,096	0,051 ± 0,063	0,219	0,234	0,501	0,196
Rb(6.10)	0,427 ± 0,126	0,387 ± 0,113	0,064 ± 0,090	0,135	0,163	0,319	0,396
Rb(7.17)	-0,035 ± 0,148	0,082 ± 0,029	-0,122 ± 0,178	0,029	0,032	0,033	2,799
Rb(9.11)	0,761 ± 0,085	0,723 ± 0,109	0,173 ± 0,161	0,129	0,128	0,498	0,096
Rb(12.13)	0,576 ± 0,138	0,603 ± 0,128	-0,068 ± 0,058	0,172	0,168	0,454	0,165
<i>Total</i>	<i>0,536 ± 0,063</i>	<i>0,526 ± 0,060</i>	<i>0,020 ± 0,021</i>	<i>0,155</i>	<i>0,156</i>	<i>0,360</i>	<i>0,225</i>

significativamente diferente de cero de F_{IT} muestra que la metapoblación no se encuentra en equilibrio existiendo una deficiencia de heterocigotos. La mayor parte de la variación fue explicada por el componente de variación entre subpoblaciones (tabla 2.4: F_{ST}), y una proporción pequeña fue atribuida al componente de variación dentro de la subpoblación (tabla 2.4: F_{IS}). Los valores de F_{IS} , calculados individualmente para cada metacéntrico, no fueron significativamente diferentes de cero, consecuentemente el valor total de F_{IS} tampoco fue diferente de 0. Estos resultados concordaron con los obtenidos para el análisis de equilibrio H-W dentro de cada subpoblación. El valor elevado de F_{ST} total significativamente diferente de cero y el número bajo de emigrantes por generación (Nm), indicaron la existencia de una gran diferenciación cromosómica entre subpoblaciones. Así la deficiencia de heterocigotos (F_{IT}) se debió a la subdivisión de la metapoblación en subpoblaciones. Esta deficiencia de heterocigotos en la metapoblación se pudo apreciar también con los índices de heterocigosidad de Nei (tabla 2.4), en los que la heterocigosidad observada (H_O) fue más próxima a la esperada en las subpoblaciones (H_S) que en la metapoblación considerada como un continuo (H_T).

2.3. RESULTADOS

Se encontró correlación entre la matriz de distancias geográficas con: las distancias F_{ST} ($1-F_{ST}$) (prueba de Mantel, 10000 permutaciones, $r=0,28$, $Z= 2974,88$, $p<0,01$), las distancias de Nei (prueba de Mantel, 10000 permutaciones, $r=0,36$, $Z= 6895,77$, $p<0,001$) y las distancias de Rogers (prueba de Mantel, 10000 permutaciones, $r=0,31$, $Z= 6402,53$, $p<0,001$). Estos resultados mostraron que la diferenciación cromosómica estuvo relacionada con la distancia geográfica.

El estudio de las distancias genéticas entre poblaciones (Rogers, 1972, Nei, 1978, Reynolds *et al.*, 1983; tablas 2.5 y 2.6) y los dendogramas UPGMA (figuras 2.4 y 2.5) mostraron que el mayor nivel de diferenciación se encontró entre las poblaciones con un $2n$ comprendido entre 37 y 40 cromosomas, que correspondieron a las poblaciones colindantes con las localidades estándar (Anglesola, Bellaterra, Calaf, Vallbona, Les Pobles, Santa Coloma y Sabadell), y las que presentaron un $2n$ entre 27 y 35 cromosomas, situadas en el centro de la zona de polimorfismo Robertsoniano Barcelona (Avinyonet, Lavern, Vilanova i la Geltrú I, Sant Marti Sarroca, Vilanova i la Geltrú II, Garraf, Gavà, La Granada, Sant Pau d'Ordal y Viladecans). El grupo formado por las muestras procedentes de Barcelona, Calafell, La Llacuna, Sant Llorenç del Penedès y Sant Sadurní d'Anoia, con un $2n$ comprendido entre 32 y 37 cromosomas y ubicado geográficamente entre los dos anteriores, quedó agrupado de forma distinta en los diferentes dendogramas. Así, en el UPGMA construido a partir de las distancias de Rogers (con un coeficiente de correlación cofenética mayor, $r=0,81$) estas muestras formaron un conglomerado diferenciado pero agrupado a las muestras con un $2n$ cercano a 40 cromosomas (figura 2.4 A). En el dendograma obtenido a partir de las distancias de Reynolds ($r=0,76$), este grupo también se mantuvo como conglomerado diferenciado pero agrupado con las localidades centrales de la zona de polimorfismo Robertsoniano (figura 2.4 B). Sin embargo, en el UPGMA obtenido a partir de las distancias de Nei, que fue el que presentó una correlación cofenética más baja ($r=0,73$), este grupo de muestras quedó repartido entre el conglomerado formado por las localidades con un área de distribución periférica y el formado por las localidades centrales (figura 2.5).

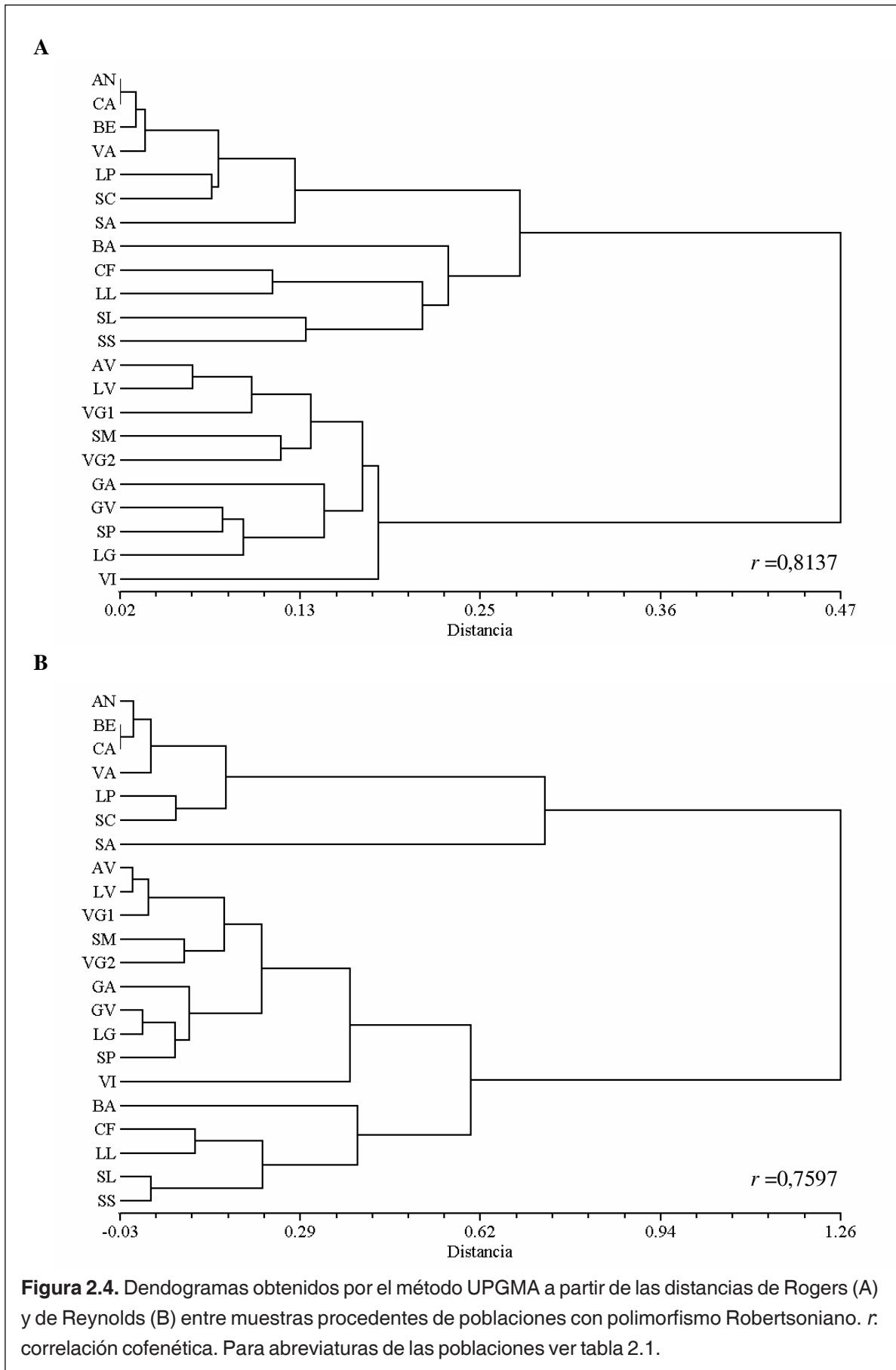


Tabla 2.5. Valores F_{ST} (parte superior de la matriz) y distancias de Reynolds entre muestras (parte inferior). Para abreviaturas de las poblaciones ver tabla 2.1.

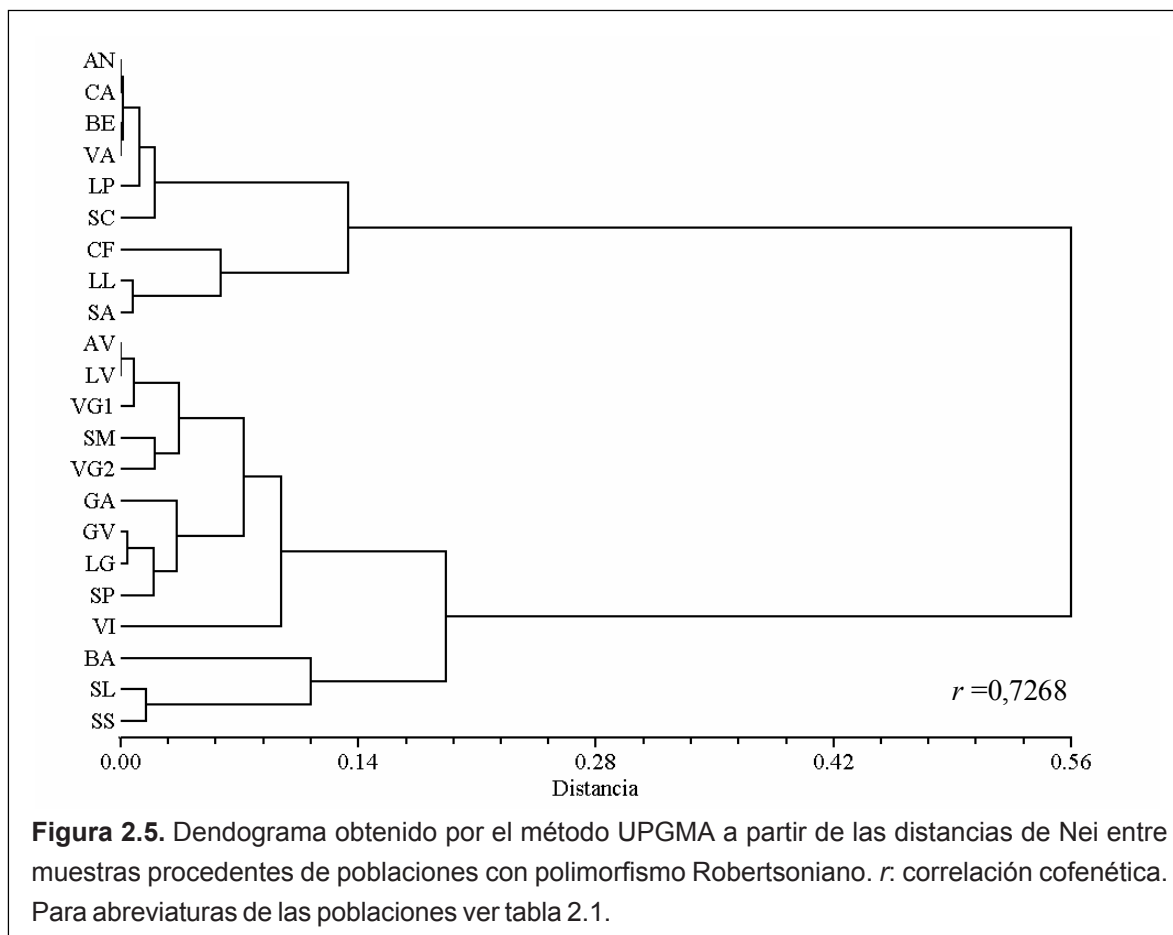
	GA	VG2	AV	VG1	LG	LV	SP	SS	SM	SL	CF	GV	VI	VA	LL	LP	BE	BA	SC	SA	CA	AN
GA		0,249	0,200	0,244	0,109	0,270	0,074	0,338	0,362	0,463	0,548	0,082	0,153	0,678	0,503	0,649	0,755	0,396	0,620	0,664	0,685	0,666
VG2	0,280		0,010	0,057	0,078	0,029	0,226	0,140	0,057	0,368	0,446	0,159	0,284	0,709	0,412	0,645	0,795	0,226	0,623	0,675	0,721	0,694
AV	0,223	0,190		0,173	0,076	-0,009	0,115	0,203	0,238	0,449	0,563	0,187	0,156	0,880	0,569	0,731	0,904	0,389	0,753	0,847	0,894	0,858
VG1	0,286	0,059	0,010		0,051	0,161	0,234	0,197	0,080	0,405	0,483	0,102	0,430	0,747	0,477	0,665	0,818	0,276	0,659	0,714	0,758	0,732
LG	0,116	0,052	0,079	0,081		0,137	0,078	0,217	0,120	0,379	0,440	0,008	0,207	0,653	0,427	0,599	0,701	0,310	0,576	0,618	0,658	0,639
LV	0,315	0,175	-0,008	0,029	0,148		0,213	0,205	0,167	0,440	0,511	0,229	0,256	0,750	0,493	0,675	0,810	0,264	0,677	0,712	0,760	0,739
SP	0,077	0,267	0,122	0,257	0,081	0,240		0,395	0,323	0,548	0,600	0,051	0,124	0,762	0,595	0,711	0,800	0,468	0,706	0,737	0,767	0,753
SS	0,412	0,220	0,226	0,151	0,244	0,230	0,502		0,157	0,023	0,311	0,340	0,409	0,524	0,182	0,423	0,692	0,207	0,372	0,552	0,546	0,483
SM	0,449	0,084	0,272	0,059	0,127	0,182	0,390	0,171		0,402	0,499	0,333	0,667	0,919	0,633	0,703	0,902	0,387	0,759	0,863	0,927	0,893
SL	0,622	0,520	0,596	0,459	0,477	0,581	0,793	0,023	0,514		0,218	0,530	0,578	0,331	0,074	0,144	0,497	0,339	0,143	0,386	0,360	0,279
CF	0,794	0,660	0,827	0,590	0,580	0,715	0,917	0,373	0,692	0,246		0,620	0,652	0,548	0,098	0,426	0,652	0,455	0,360	0,394	0,570	0,521
GV	0,085	0,108	0,206	0,173	0,008	0,260	0,053	0,415	0,404	0,755	0,966		0,357	0,837	0,631	0,743	0,887	0,437	0,753	0,819	0,847	0,822
VI	0,166	0,562	0,169	0,333	0,232	0,296	0,132	0,526	1,099	0,863	1,056	0,442		0,915	0,712	0,773	0,919	0,554	0,803	0,881	0,924	0,895
VA	1,133	1,373	2,124	1,235	1,058	1,385	1,436	0,741	2,512	0,403	0,794	1,813	2,464		0,640	0,069	-0,019	0,674	0,253	0,519	0,002	0,083
LL	0,698	0,649	0,842	0,531	0,557	0,680	0,905	0,200	1,002	0,076	0,103	0,996	1,244	1,022		0,357	0,720	0,277	0,426	0,261	0,710	0,622
LP	1,047	1,093	1,315	1,035	0,913	1,124	1,242	0,550	1,214	0,155	0,554	1,358	1,482	0,071	0,441		0,090	0,594	0,066	0,301	0,075	0,046
BE	1,405	1,701	2,340	1,583	1,207	1,662	1,609	1,176	2,322	0,686	1,056	2,177	2,517	-0,018	1,271	0,094		0,776	0,292	0,571	-0,032	0,012
BA	0,504	0,323	0,493	0,256	0,370	0,307	0,631	0,232	0,490	0,413	0,607	0,575	0,807	1,122	0,325	0,901	1,495		0,617	0,602	0,701	0,676
SC	0,969	1,075	1,400	0,976	0,858	1,131	1,225	0,466	1,421	0,154	0,446	1,396	1,622	0,292	0,554	0,069	0,345	0,961		0,468	0,220	0,090
SA	1,091	1,252	1,879	1,124	0,963	1,244	1,335	0,804	1,986	0,488	0,502	1,706	2,130	0,733	0,302	0,358	0,846	0,922	0,631		0,617	0,579
CA	1,156	1,417	2,243	1,277	1,072	1,427	1,455	0,790	2,623	0,447	0,844	1,879	2,574	0,002	1,238	0,078	-0,032	1,208	0,248	0,961		-0,029
AN	1,097	1,316	1,948	1,185	1,017	1,345	1,397	0,660	2,235	0,328	0,736	1,723	2,256	0,087	0,973	0,047	0,012	1,126	0,095	0,865	-0,029	

Tabla 2.6. Distancias de Nei (parte superior de la matriz) y distancias de Rogers entre muestras (parte inferior). Para abreviaturas de las poblaciones ver tabla 2.1.

	GA	VG2	AV	VG1	LG	LV	SP	SS	SM	SL	CF	GV	VI	VA	LL	LP	BE	BA	SC	SA	CA	AN
GA		0,109	0,095	0,119	0,047	0,117	0,022	0,226	0,205	0,419	0,463	0,030	0,068	0,997	0,483	0,775	0,963	0,245	0,757	0,824	0,998	0,945
VG2	0,204		0,048	0,015	0,017	0,041	0,074	0,067	0,020	0,196	0,222	0,024	0,165	0,710	0,231	0,510	0,683	0,090	0,499	0,527	0,719	0,674
AV	0,207	0,153		0,010	0,036	0,000	0,035	0,093	0,040	0,269	0,279	0,043	0,030	0,867	0,301	0,640	0,836	0,142	0,611	0,644	0,875	0,819
VG1	0,193	0,107	0,117		0,029	0,006	0,075	0,051	0,021	0,194	0,209	0,048	0,103	0,692	0,216	0,513	0,672	0,077	0,491	0,509	0,703	0,659
LG	0,164	0,104	0,149	0,129		0,050	0,025	0,110	0,052	0,262	0,285	0,004	0,097	0,848	0,321	0,607	0,809	0,162	0,584	0,653	0,849	0,791
LV	0,202	0,140	0,063	0,084	0,160		0,063	0,061	0,038	0,205	0,240	0,061	0,067	0,688	0,220	0,518	0,670	0,079	0,517	0,505	0,704	0,668
SP	0,123	0,132	0,140	0,192	0,102	0,178		0,185	0,114	0,375	0,414	0,013	0,038	1,052	0,435	0,768	1,005	0,232	0,763	0,816	1,059	0,997
SS	0,322	0,202	0,247	0,198	0,273	0,185	0,325		0,055	0,015	0,117	0,155	0,229	0,286	0,116	0,184	0,264	0,076	0,175	0,269	0,280	0,255
SM	0,324	0,119	0,125	0,152	0,179	0,152	0,201	0,179		0,166	0,191	0,076	0,182	0,691	0,210	0,475	0,658	0,124	0,464	0,504	0,698	0,650
SL	0,457	0,333	0,382	0,332	0,407	0,320	0,460	0,135	0,293		0,060	0,352	0,441	0,088	0,036	0,026	0,075	0,147	0,032	0,095	0,087	0,073
CF	0,444	0,297	0,346	0,289	0,366	0,284	0,424	0,223	0,257	0,179		0,389	0,417	0,214	0,013	0,152	0,219	0,194	0,111	0,104	0,224	0,199
GV	0,153	0,123	0,121	0,162	0,089	0,140	0,082	0,321	0,179	0,456	0,420		0,094	1,054	0,415	0,763	1,006	0,179	0,752	0,813	1,059	0,993
VI	0,188	0,220	0,107	0,163	0,220	0,152	0,157	0,319	0,232	0,454	0,418	0,192		1,081	0,453	0,844	1,054	0,277	0,792	0,817	1,091	1,025
VA	0,685	0,561	0,611	0,561	0,636	0,548	0,688	0,363	0,521	0,229	0,271	0,684	0,682		0,134	0,013	0,000	0,410	0,032	0,056	0,000	0,003
LL	0,508	0,341	0,375	0,340	0,430	0,324	0,473	0,270	0,286	0,164	0,114	0,464	0,446	0,236		0,100	0,150	0,086	0,122	0,007	0,163	0,160
LP	0,603	0,479	0,535	0,479	0,554	0,472	0,606	0,287	0,446	0,153	0,227	0,602	0,600	0,082	0,163		0,008	0,343	0,012	0,064	0,013	0,009
BE	0,674	0,550	0,600	0,550	0,625	0,537	0,677	0,352	0,510	0,218	0,260	0,673	0,671	0,030	0,225	0,071		0,419	0,025	0,074	0,000	0,001
BA	0,333	0,189	0,246	0,178	0,293	0,184	0,318	0,212	0,228	0,235	0,271	0,280	0,282	0,409	0,184	0,327	0,398		0,388	0,263	0,443	0,440
SC	0,598	0,473	0,523	0,473	0,548	0,460	0,601	0,276	0,434	0,141	0,184	0,596	0,594	0,088	0,219	0,075	0,079	0,376		0,089	0,023	0,009
SA	0,596	0,472	0,522	0,472	0,547	0,459	0,599	0,338	0,433	0,232	0,183	0,595	0,593	0,089	0,147	0,150	0,119	0,320	0,164		0,079	0,084
CA	0,688	0,563	0,613	0,563	0,638	0,551	0,691	0,366	0,524	0,231	0,274	0,687	0,685	0,026	0,238	0,084	0,019	0,411	0,090	0,115		0,000
AN	0,671	0,547	0,596	0,547	0,622	0,534	0,674	0,349	0,507	0,214	0,257	0,670	0,668	0,043	0,221	0,068	0,035	0,395	0,073	0,132	0,017	

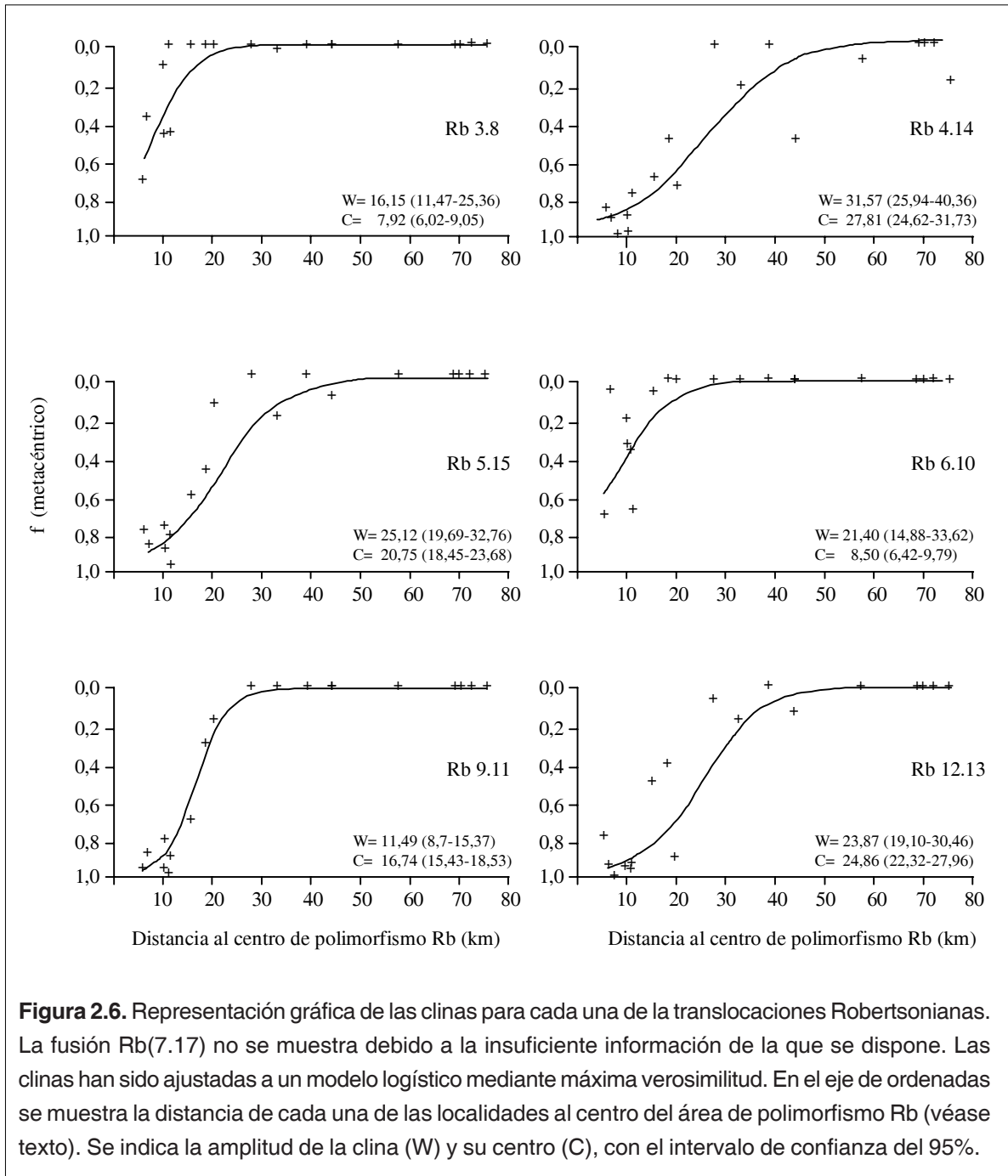


2.3. RESULTADOS



2.3.4. Análisis de las clinas

El cambio en las frecuencias de los metacéntricos fue estudiado con más detalle mediante el análisis de clinas en una dimensión para cada uno de los metacéntricos excepto para la fusión Rb(7.17), debido a que los datos relativos a este metacéntrico fueron insuficientes para el ajuste de la curva tanh. Para este análisis se seleccionaron las poblaciones que quedaron al oeste del área de distribución (figura 2.1). Los datos de partida para el ajuste estuvieron representados por muestras de tamaño relativamente pequeño y correspondientes a una amplia zona geográfica, con lo que no es sorprendente la gran dispersión de puntos existente alrededor de la clina ajustada. Aunque muestras más grandes y regulares a lo largo de un transecto determinado hubieran dado lugar seguramente a clinas mejor ajustadas, los datos aquí presentados proporcionan un reflejo bastante razonable de las amplitudes y situaciones de las clinas a partir del centro de la zona de polimorfismo Robertsoniano.



En las figuras 2.6 y 2.7 están representadas las clinas obtenidas para cada metacéntrico, donde se muestra el centro y la amplitud con sus correspondientes intervalos de confianza, calculados estos últimos como $2\log_e$ de la verosimilitud. Las pruebas de concordancia sólo mostraron diferencias significativas entre el cromosoma Rb(9.11) y los cromosomas Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10) y Rb(12.13), y entre los metacéntricos Rb(3.8) y Rb(4.14). Las clinas de los cromosomas Rb(3.8) y Rb(9.11) fueron más estrechas (figura 2.6; tabla 2.7). La mayor parte de las clinas no fueron coincidentes. Sólo lo fueron la clina del cromosoma

2.3. RESULTADOS

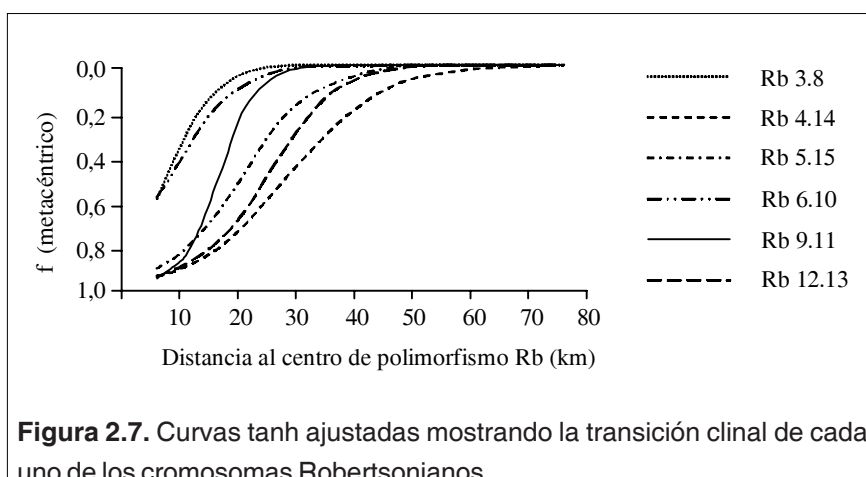


Figura 2.7. Curvas tanh ajustadas mostrando la transición clinal de cada uno de los cromosomas Robertsonianos.

Tabla 2.7. Pruebas de concordancia y coincidencia para las diferentes clinas. LL1. Log_e de verosimilitud con el valor fijado en la pendiente (concordancia) o en el centro (coincidencia) de la curva tanh. LL0: Log_e de verosimilitud sin fijar ningún parámetro. ΔLL : $\text{LL0}-\text{LL1}$. $2\Delta\text{LL}$ sigue una distribución χ^2 con 1 grado de libertad. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; después de la corrección secuencial de Bonferroni $N=15$

Metacéntrico	Concordancia				Coincidencia			
	LL1	LL0	ΔLL	p-valor	LL1	LL0	ΔLL	p-valor
Rb(3.8)	-232,76				-232,76			
Rb(4.14)	-189,03				-189,03			
Rb(5.15)	-212,59				-212,59			
Rb(6.10)	-258,60				-258,60			
Rb(9.11)	-142,17				-142,17			
Rb(12.13)	-179,38				-179,38			
Rb(3.8)+Rb(4.14)	-428,65	-421,79	6,86	<0,001**	-579,04	-421,79	157,25	<0,001***
Rb(3.8)+Rb(5.15)	-448,23	-445,35	2,88	0,016	-561,10	-445,35	115,75	<0,001***
Rb(3.8)+Rb(6.10)	-492,28	-491,36	0,92	0,176	-491,66	-491,36	0,30	0,438
Rb(3.8)+Rb(9.11)	-377,00	-374,93	2,07	0,042	-464,70	-374,93	89,77	<0,001***
Rb(3.8)+Rb(12.13)	-415,76	-412,15	3,61	0,007	-552,03	-412,15	139,89	<0,001***
Rb(4.14)+Rb(5.15)	-403,63	-401,62	2,01	0,045	-411,70	-401,62	10,08	<0,001***
Rb(4.14)+Rb(6.10)	-450,30	-447,63	2,67	0,021	-569,88	-447,63	122,25	<0,001***
Rb(4.14)+Rb(9.11)	-360,53	-331,20	29,33	<0,001***	-368,30	-331,20	37,10	<0,001***
Rb(4.14)+Rb(12.13)	-369,82	-368,41	1,41	0,093	-370,67	-368,41	2,26	0,033
Rb(5.15)+Rb(6.10)	-471,59	-471,19	0,40	0,372	-554,21	-471,19	83,02	<0,001***
Rb(5.15)+Rb(9.11)	-370,81	-354,77	16,05	<0,001***	-362,54	-354,77	7,78	<0,001***
Rb(5.15)+Rb(12.13)	-392,05	-391,98	0,08	0,698	-395,07	-391,98	3,09	0,013
Rb(6.10)+Rb(9.11)	-407,64	-400,77	6,86	<0,001**	-459,98	-400,77	59,21	<0,001***
Rb(6.10)+Rb(12.13)	-438,69	-437,99	0,70	0,236	-543,35	-437,99	105,37	<0,001***
Rb(9.11)+Rb(12.13)	-340,59	-321,56	19,03	<0,001***	-343,55	-321,56	21,99	<0,001***

Rb(3.8) con la del Rb(6.10) y la del Rb(4.14) con la del Rb(12.13) y la del Rb(5.15) (tabla 2.7; figuras 2.6 y 2.7). Los centros de las clinas más próximos al centro de la zona de polimorfismo Robertsonian lo presentaron los metacéntricos Rb(3.8) y Rb(6.10), mientras que en los cromosomas Rb(4.14), Rb(5.15) y Rb(12.13) la posición del máximo cambio en frecuencia estuvo más alejada.



2.4. DISCUSIÓN

Los primeros estudios realizados sobre la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona apuntaban la existencia de una raza cromosómica, en un inicio formada por animales de $2n=30$ (Adolph & Klein, 1981) y posteriormente por animales de $2n=28$ (Gündüz, 2000; Gündüz *et al.*, 2001). Muestreos más exhaustivos realizados en el presente trabajo han demostrado la existencia de ejemplares con un número diploide menor ($2n=27$), pero no han podido demostrar la existencia de una raza según la definición establecida por Hausser *et al.* (1994), siendo todas las poblaciones Robertsonianas de esta área de estudio polimórficas. Esta situación difiere de la variación cromosómica de *M. domesticus* hallada a lo largo de Europa y el norte de África, donde se encuentran zonas híbridas entre razas Robertsonianas, o entre éstas y la raza estándar. Esto sugiere que el área analizada en el presente estudio es una zona de polimorfismo Robertsoniano más que una zona híbrida. De hecho, ya Mayr (1963) destaca que es preferible no extender el término “hibridación” a todo flujo de genes de población a población, llevando esta terminología a un extremo absurdo pero consecuente, que consideraría toda población como población híbrida. Aún en el caso de que después de un aislamiento por alopatría, dos poblaciones que no han alcanzado el nivel de especie entren en contacto, se considera más prudente utilizar el término de intergradación secundaria (Mayr, 1963). Sin embargo, en la zona aquí estudiada, no se descarta la existencia de una raza Robertsoniana, con un número diploide inferior a 27, que podría estar ubicada en alguna área entre las localidades de La Granada, Garraf y Vilanova i la Geltrú I, puesto que estas poblaciones son las únicas en donde se han encontrado representados todos los cromosomas Robertsonianos; existe además una distribución clinal desde dicho posible centro de la zona hacia la periferia tanto en frecuencias de metacéntricos, número cromosómico, heterocigosis estructural y polimorfismo Robertsoniano.

La extensión de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona es elevada (aproximadamente unos 5000 km²) si se compara con las estrechas zonas híbridas descritas en el norte de Italia y Túnez, caracterizadas por híbridos con baja eficacia biológica (Hauffe & Searle, 1993; Castiglia & Capanna, 1999; Saïd *et al.*, 1999). Esto sugiere que la eficacia biológica de los animales de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona no se encuentra drásticamente afectada por la presencia de estas translocaciones.

2.4. DISCUSIÓN

En esta área, el polimorfismo Robertsoniano es particularmente elevado, pero muestra un patrón diferente al encontrado mediante análisis de la variabilidad de una porción de 650pb de ADNmt, que comprende una parte del citocromo b y los genes The-ARNt, Pro-ARNt y Phe-ARNt, y del grado de polimorfismo de los alozimas *Amy1*, *Got1*, *Got2*, *Gpi1*, *Idh1*, *Idh2*, *Ldh1*, *Ldh2* (Gündüz, 2000). Los resultados obtenidos por este autor mostraron que los valores medios de heterocigosidad y el porcentaje de loci polimórficos fueron similares en las localidades Robertsonianas y estándar, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio derivados del análisis del polimorfismo Robertsoniano. La falta de concordancia entre la diferenciación genética (ADNmt y alozimas) y la cromosómica se puede atribuir a la rapidez de la radiación, a la elevada ratio de cambio cromosómico y a la existencia de un ancestro común reciente de las poblaciones Robertsonianas (Britton-Davidian *et al.*, 1989; Britton-Davidian, 1990). El grado de diferenciación cromosómica que se detectó entre poblaciones ($F_{ST}=0,598$) sugiere que el nivel de flujo genético es bajo (dos individuos cada diez generaciones). El valor de F_{ST} obtenido a partir del análisis alozimático ($F_{ST}=0,198$; Gündüz, 2000), aunque inferior al calculado para los datos cromosómicos, indicó también un bajo nivel de flujo genético entre las subpoblaciones ($Nm=1,18$). Estos resultados, junto con los obtenidos para el equilibrio Hardy-Weinberg, tanto para el análisis de variabilidad genética y Robertsoniana, sugieren que las poblaciones de la zona de polimorfismo Robertsoniano funcionan como unidades panmíticas separadas. Esta fragmentación de la metapoblación en subpoblaciones posiblemente esté determinada por una serie de factores relacionados con el aislamiento y el comensalismo ligado al hombre. Si el flujo genético que se mantiene entre las poblaciones es bajo o ausente, y el tamaño efectivo de las poblaciones en el momento de la fragmentación es pequeño, se puede llegar a procesos de fijación de algún metacéntrico, como se ha encontrado en alguna de las poblaciones: Rb(9.11) en Barcelona y Lavern, y Rb(5.15) en Sant Pau d'Ordal.

Las tasas y distancias de migración vienen determinadas por múltiples factores como las propias características de los individuos, su biología y la distancia geográfica entre las poblaciones. El ratón doméstico es un animal de baja vagilidad, pero que puede presentar dispersión siguiendo dos modelos, una dispersión pasiva, mediante el transporte humano, y una dispersión activa (Boursot *et al.*, 1993). Si la dispersión pasiva se da de manera frecuente

en una área estamos ante un modelo de isla (*island model*) en el cual la tasa de migración no depende de la distancia entre subpoblaciones. Alternativamente, si la mayor parte de la migración se produce de manera activa, o la migración pasiva que se produce es muy infrecuente y a cortas distancias, se favorece el modelo de pasadera (*stepping stone model*), en el que la migración sólo ocurre entre subpoblaciones adyacentes. En la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona se observa una relación de la diferenciación cromosómica con la distribución geográfica de las poblaciones, como mostró la correlación entre la matriz de distancias de Rogers, Reynolds o Nei con la de distancias geográficas, por lo que cabe pensar en la actuación del segundo modelo de dispersión. La diferenciación geográfica se pudo apreciar también en los análisis de conglomerados, donde las poblaciones quedaron reunidas básicamente en tres grupos, uno que correspondió a las poblaciones ubicadas en la periferia y con un número cromosómico mayor, una franja de poblaciones con una situación geográfica intermedia, y un conjunto de poblaciones cercanas al centro de la zona de polimorfismo Robertsoniano, con $2n$ más reducidos. En los resultados procedentes de análisis alozimáticos (Gündüz, 2000) no se encontró esta relación entre la diferenciación geográfica y la filogenética. Esto es lo esperado si el polimorfismo ancestral se está todavía segregando en las poblaciones actuales. Tajima (1983) mostró la situación más simple en que una población se subdivide en dos subpoblaciones, cada una con N individuos diploides. Si dos secuencias son muestreadas en cada una de estas dos poblaciones, para que la probabilidad de que la filogenia de los alelos refleje la filogenia de la población alcance un valor de 0,95, se necesitan $8N$ generaciones desde la subdivisión. Dando una estima baja y conservadora de una población efectiva de hembras de 1000 y una generación por año, se necesitaría que transcurrieran 4000 años antes de que la filogenia coincidiera con la geografía bajo este modelo simple de dos poblaciones. Se cree que el ratón doméstico llegó al oeste del mar Mediterráneo entre hace 4000 y 2800 años (Edad de Bronce), por lo que parece razonable la falta de correlación entre la filogenia y la variación geográfica en términos de un polimorfismo ancestral (Boursot *et al.*, 1993). Además se debe tener en cuenta que, para los análisis alozimáticos sólo dos de los diez loci analizados, *Amy1* y *Got2* (Gündüz, 2000), están ubicados en cromosomas que intervienen en translocaciones (cromosomas 3 y 8, respectivamente), por lo que cabe pensar que las historias evolutivas de los cromosomas Robertsonianos y los loci no ligados a translocaciones

2.4. DISCUSIÓN

Robertsonianas sean diferentes. En general se espera que las regiones ligadas genéticamente presenten una historia evolutiva correlacionada, mientras que la recombinación creará diferentes genealogías para distintas regiones genómicas. Es por ello que parece más apropiado, para el estudio de la historia evolutiva de las zonas de polimorfismo Robertsoniano, el análisis de microsatélites ligados a las translocaciones, que tienen la característica de ser marcadores genéticos muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple y son codominantes.

Aunque estudios moleculares realizados por Britton-Davidian *et al.* (1989) y Nachman *et al.* (1994) argumentan que en general las translocaciones Robertsonianas se originan *in situ*, no se debe descartar la introducción de algunas de las fusiones debido a la llegada de animales de otras poblaciones europeas. Si bien la combinación de cromosomas hallada en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona no se ha encontrado en ninguna otra población de Europa o del Norte de África, algunas de las fusiones sí han sido descritas en otras áreas de Europa: Rb(3.8), en Schwabische Alb, en el sur de Alemania (Adolph & Klein, 1983), en los Apeninos (Capanna *et al.*, 1976), en Luino, Norte de Italia (Gropp *et al.*, 1982), en las cercanías de Viterbo, centro de Italia (Spirito *et al.*, 1980; Corti *et al.*, 1990), en Dinamarca (Nance *et al.*, 1990), en Madeira (Britton-Davidian *et al.*, 2000); Rb(4.14), en Thebes, Grecia (Winking *et al.*, 1981; Ticky & Vucak, 1987); Rb(5.15) en Schwäbische Alb, sur de Alemania (Adolph & Klein, 1981), Valle de Poschiavo, Alpes (Gropp *et al.*, 1970), Milán y Cremona, norte de Italia (Capanna & Riscassi, 1978), en los Apeninos, en Italia central (Capanna *et al.*, 1976, 1977), en Zadar y Dalmatia, Yugoslavia (Ticky & Vucak, 1987); y Rb(6.10), en Tübingen, sur de Alemania (Bauchau, 1990). Las fusiones Rb(7.17), Rb(9.11) y Rb(12.13) sólo han sido descritas en la zona Robertsoniana Barcelona, por lo que cabe esperar que el origen de este polimorfismo, al menos en parte, sea independiente. El cromosoma mayor candidato a haber sido importado es el Rb(5.15) puesto que es el que está más ampliamente distribuido en Europa. Sin embargo, estudios recientes que analizan microsatélites ligados a esta fusión muestran un origen independiente de dicho metacéntrico, al menos entre las poblaciones del centro y norte de Italia y la población de Avinyonet (Riginos & Nachman, 1999). Puesto que no se han realizado análisis de este tipo considerando otras poblaciones europeas ni otras fusiones compartidas, no se descarta la posible introducción,



debida a un origen antrópico, de algunas de las translocaciones. El centro de la zona de polimorfismo tan sólo se encuentra a unos 20 kilómetros de Castelldefells. En época de íberos y romanos, la costa de esta población formaba un puerto natural donde las naves romanas atracaban y comercializaban con los habitantes de la zona. Este comercio podría haber sido la puerta de entrada a animales procedentes de Italia portadores de algunas fusiones. Otra hipótesis no desestimable es la aparición de alguna de las fusiones Robertsonianas por intervención humana, en relación al uso de productos con acción anticoagulante. Entre los compuestos químicos que producen este efecto se encuentra la sal sódica de warfarina. Stanimirovic *et al.* (1997) indicaron que diferentes dosis de este compuesto provocaba la formación de la translocación Rb(5.15) en la cepa de ratón de laboratorio BALB/c. Otros estudios han demostrado la presencia de esta fusión en poblaciones salvajes donde se hallan altas concentraciones de derivados de warfarina en el suelo (Stanimirovic, 1995; Stanimirovic *et al.*, 1995; ambos citados en Stanimirovic *et al.*, 1997).

Independientemente del origen de las fusiones, dos escenarios diferentes podrían haber dado lugar a la estructura escalonada de las clinas de las fusiones en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona: intergradación primaria y contacto secundario. Bajo la hipótesis de intergradación primaria, estaríamos ante un proceso de fijación de fusiones en poblaciones, sin necesidad de aislamiento geográfico, que han entrado en contacto con las poblaciones estándar. White (1978) propuso esta situación como modelo general de formación de razas cromosómicas de ratón doméstico y predijo que los metacéntricos tienen una ventaja selectiva que promueven su extensión desde el punto de origen, que en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona se estima que estaría situado entre las poblaciones de Garraf, Vilanova i la Geltrú I y La Granada. En este caso, el escalonamiento de las clinas encontrado puede representar la secuencia de formación o introducción de los metacéntricos. Así los cromosomas Robertsonianos con una distribución más amplia serían los que aparecieron más tempranamente [Rb(4.14), Rb(5.15) y Rb(12.13)], mientras que los cromosomas con una distribución más restringida serían los que lo hicieron más tardíamente [Rb(3.8), Rb(6.10), Rb(7.17) y Rb(9.11)]. Bajo la hipótesis de contacto secundario se esperaría la existencia de una raza cromosómica, aislada por alopatria en alguna zona del macizo del Garraf,

2.4. DISCUSIÓN

posiblemente con un $2n=26$ y con las fusiones Rb(3.8), Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(7.17), Rb(9.11) y Rb(12.13) en homocigosis. En algún momento esta raza habría entrado en contacto con las poblaciones de 40 cromosomas, dando lugar al amplio rango de polimorfismo Robertsoniano detectado. En este caso el escalonamiento de las clinas de los cromosomas Robertsonianos se podría haber alcanzado por varios factores:

1) *Subdominancia epistática*: ésta tiende a reducir la eficacia biológica cromosómica favoreciendo los heterocigotos Robertsonianos simples sobre los múltiples (Barton & Bengtsson, 1986). Bajo selección epistática, un cariotipo homocigoto recombinante, (homocigoto para alguno de los metacéntricos descritos en la zona de polimorfismo Barcelona) habría sido favorecido en el momento en que la raza y las poblaciones estándar entraron en contacto, puesto que individuos con este cariotipo no pueden producir animales altamente heterocigotos, y por tanto con baja eficacia biológica, en los cruces con las razas parentales. Un incremento en la frecuencia de alguno de estos homocigotos recombinantes en el centro de la zona podría haber causado la separación de alguna de las clinas. Bajo este modelo se esperaría una baja frecuencia de heterocigotos múltiples, que es lo que encontramos en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona, y una alta frecuencia de homocigotos para pocas fusiones, como sucede en otras zonas híbridas escalonadas (Searle *et al.*, 1993). No obstante, esta última condición no se da en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona. Para comprobar el modelo epistático sería necesario medir la eficacia biológica de los diferentes tipos de heterocigotos simples y múltiples.

2) *Deriva genética*: el ratón doméstico es un animal comensal, lo que hace que su distribución esté fragmentada en poblaciones favoreciendo la acción de la deriva genética (Hauffe & Searle, 1993). Una disminución en la densidad en alguna de las poblaciones puede causar la fijación de alguna fusión provocando el cambio de posición de alguna de las clinas. Este tipo de hábitats no sólo pueden provocar un desplazamiento de las clinas sino también variación en su amplitud, existiendo una correlación positiva entre la fragmentación del hábitat y la amplitud de las clinas (Nichols, 1989).

3) *Éxito reproductor diferencial*: animales con determinadas fusiones pueden presentar un mayor éxito reproductor que animales portadores de otras translocaciones. Por ejemplo,

estudios de fertilidad realizados en animales portadores de las fusiones Rb(6.16) o Rb(6.15), demuestran que éstos presentan disfunción espermática. Esto se atribuye a la acumulación de mutaciones en el gen *Spam1* (localizado en el cromosoma 6 cerca del centrómero) debida a la supresión de la recombinación en la zona pericentromérica que se da en heterocigotos Robertsonianos. El gen *Spam1* codifica para la proteína con actividad hialuronidasa denominada molécula 1 de adhesión del esperma (Zheng *et al.*, 2001), con lo que una alteración de ésta disminuye su capacidad para penetrar en la matriz extracelular de las células del cúmulus del oocito, rica en ácido hialurónico (Lin *et al.*, 1994). Un fenómeno similar podría estar sucediendo con la translocación Rb(6.10), puesto que es una de las que presenta una distribución limitada, con un centro de la clina cercano al centro de la zona de polimorfismo Robertsoniano.

4) *Impulso meiótico*: Castiglia & Capanna (2000) encontraron que en híbridos heterocigotos entre las razas CD ($2n=22$) y la estándar de la zona del centro de Italia, los metacéntricos de longitud más pequeña presentaron un mayor índice de transmisión a la descendencia. Cabe destacar que las fusiones más ampliamente distribuidas en el área de polimorfismo Robertsoniano Barcelona fueron las de longitud cromosómica menor. Así, la longitud de los metacéntricos (L_m) calculada como la suma de longitudes de cada acrocéntrico expresada como porcentaje de complemento haploide mitótico (Nesbitt & Francke, 1973), fue para los cromosomas Rb(4.14), Rb(12.13), Rb(5.15) y Rb(9.11), $L_m=10,20$, $L_m=9,97$, $L_m=9,59$, $L_m=9,01$, respectivamente, mientras que para las fusiones Rb(3.8) y Rb(6.10) estas longitudes fueron superiores ($L_m=11,10$ y $L_m=10,45$, respectivamente). La longitud del metacéntrico Rb(7.17) fue también pequeña ($L_m=9,17$), pero su distribución geográfica fue reducida. Cabe destacar que es el cromosoma con mayor desigualdad de tamaño entre los acrocéntricos que lo componen. Así, el brazo menor (cromosoma 17) representa un 68,88 % del brazo mayor (cromosoma 7), mientras que en el resto de metacéntricos este porcentaje varía entre un 72 y 100% [Rb(5.15) y Rb(12.13) respectivamente]. La reducida frecuencia y rara presencia del cromosoma Rb(7.17) en las poblaciones analizadas pueden ser debidas a que se trata de la unión de dos cromosomas de muy diferente tamaño, y fusiones entre cromosomas que difieren mucho en su longitud, cuando están en heterocigosis pueden incrementar la incidencia de mala segregación debido a problemas de orientación durante la meiosis (White, 1973; Lande, 1979; King, 1995). Además, en el tercio proximal del cromosoma

2.4. DISCUSIÓN

17 se puede encontrar el haplotipo *t*. Éste está formado por tres genes distorsionadores (*distorter*) y un gen respuesta (*responder*), y mantiene su integridad por cuatro inversiones, que son las responsables de la supresión de la recombinación en esta región (Hammer *et al.*, 1989; Lyon, 1991). Este haplotipo presenta en los machos una distorsión en la tasa de transmisión a la descendencia. Así, los machos heterocigotos para el complejo *t* completo, producen más del 90% de los gametos funcionales con este haplotipo. Pero la homocigosidad para la totalidad de este complejo da lugar a la esterilidad y frecuentemente a muerte embrionaria de ambos sexos. Sin embargo, las hembras presentan una fertilidad normal y un ratio de transmisión que se ajusta a las proporciones mendelianas. El haplotipo *t* está presente en la mayor parte de las poblaciones salvajes de *Mus domesticus* con una frecuencia de un 10% (Lenington *et al.*, 1988; Ardlie, 1998; Lyon, 2003). La recombinación entre la forma salvaje y el haplotipo *t* es infrecuente, detectándose una vez cada 200-1000 descendientes (Bennett *et al.*, 1976; Sarvetnick *et al.*, 1986). Cuando esto sucede se generan los haplotipos *t* parciales, que retienen algunas de las características de los haplotipos *t* completos (Lyon, 1991). Los animales con estos haplotipos presentan diferentes grados de esterilidad (Lyon *et al.*, 2000; Lyon, 2003). El hecho de que la distribución del metacéntrico Rb(7.17) sea tan reducida podría estar relacionado con la presencia del haplotipo *t*, completo o parcial, ligado a esta translocación. Esto daría lugar a un bajo ratio de transmisión del cromosoma Rb(7.17) a la descendencia.

A partir de la información de la que se dispone referente a la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona, resulta imposible determinar con precisión el origen de los patrones de variación que se aprecian actualmente en este área. Son necesarios estudios más detallados y más datos, tanto a nivel ecológico como genético, para determinar si la zona de polimorfismo Robertsoniano Barcelona deriva de una situación de intergradación primaria o de contacto secundario.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

Adolph, S. & Klein, J. (1981). Robertsonian variation in *Mus musculus* from Central Europe, Spain, and Scotland. *The Journal of Heredity*, 72: 219-221.

Adolph, S. & J. Klein (1983). Genetic variation of wild mouse populations in southern Germany. I Cytogenetic study. *Genetical Research*, 41: 117-134.

Ardlie, K. G. 1998. Putting the brake on drive: meiotic drive of *t* haplotypes in natural populations of mice. *Trends in Genetics*, 14: 189–193.

Arnold, M. L. (1997). *Natural hybridisation and evolution*. Oxford University Press, New York.

Barton, N. H. (1979). The dynamics of hybrid zones. *Heredity*, 43: 341-359.

Barton, N. H. & B. O. Bengtsson (1986). The barrier to genetic exchange between hybridizing populations. *Heredity*, 57: 357-376.

Barton, N. H. & G. M. Hewitt (1981). Hybrid zones and speciation. En Atchley, W. R., & D. S. Woodruff (eds.): *Evolution and Speciation: Essays in Honour of M. J. D. White*. Pp. 109-145. Cambridge University Press, Cambridge.

Barton, N. H. & G. M. Hewitt (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual reviews of ecology and systematics*, 16: 113-148.

Barton, N. H. & G. M. Hewitt (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341: 497-502.

Barton, N. H. & S. Rouhani (1991). The probability of fixation of a new karyotype in a continuous population. *Evolution*, 45: 499-517.

Bauchau, V. (1990). Phylogenetic analysis of the distribution of chromosomal races of *Mus musculus domesticus* Ruddy in Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41: 171-192.

Bauchau, V., Smest, s., Viroux, M-C., Nootens, D. & A. -K. de Caritat (1990). Robertsonian translocations in free-living populations of the house mouse in Belgium. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41: 193-201.

Bazykin, A. D. (1969). Hypothetical mechanisms of speciation. *Evolution*, 23: 685-687.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

Bennett, D., Dunn, L. C. & K. Artzt (1976). Genetic changes in mutations at the T/t locus in the mouse. *Genetics* 83: 361-372.

Boursot, P., Auffray, J. -C., Britton-Davidian, J. & F. Bonhomme (1993). The evolution of house mouse. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 119-152.

Britton-Davidian, J. (1990). Genic differentiation in *M. m. domesticus* populations from Europe, the Middle East and North Africa: geographic patterns and colonization events. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41: 27-45.

Britton-Davidian, J., Catalan, J., Ramalhinho, M. G., Ganem, G., Auffray, J. -C., Capela, R., Biscoito, M., Searle, J. B. & M. L. Mathias (2000). Rapid chromosomal evolution in island mice. *Nature*, 403: 158.

Britton-Davidian, J., Nadeau, J. H., Croset, H. & Thaler, L. (1989). Genic differentiation and origin of Robertsonian populations of the house mouse (*Mus musculus domesticus* Ruddy). *Genetical Research*, 53: 29-44.

Capanna, E., Civitelli, M. V. & M. Cristaldi (1977). Chromosomal rearrangement, reproductive isolation and speciation in mammals. The case of *Mus musculus*. *Bolletino di Zoologia*, 44: 213-246.

Capanna, E., Gropp, A., Winking, H., Noack, G. & M.-V. Civitelli (1976). Robertsonian metacentrics in the mouse. *Chromosoma (Berl.)*, 58: 341-353.

Capanna, E. & E. Riscassi (1978). Robertsonian karyotype variability in natural *Mus musculus* populations in the Lombardy area of Po Valley. *Bollettino di Zoologia*, 45: 63-71.

Castiglia, R. & E. Capanna (1999). Contact zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 1. Temporal analysis of a hybrid zone between the CD chromosomal race (2n=22) and populations with the standard karyotype. *Heredity*, 83: 319-326.

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

Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice (1972). Standard karyotype of the mouse *Mus musculus*. *Journal of Heredity*, 63: 69-72.

Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice (1974). Standard karyotype of the mouse *Mus musculus*. *Mouse News Letter*, 51: 2-3.

Corti, M., Ciabatti, C. M. & E. Capanna (1990). Parapatric hybridation in the chromosomal speciation of the house mouse. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41: 203-214.

Edwards, A. W. F. (1972). *Likelihood*. Cambridge University Press, Cambridge.

Efron, B. (1982). *The jackknife, the bootstrap and other resampling plans*. Society for industrial and applied mathematics, Philadelphia.

Efron, B., & C. Stein (1981). The jackknife estimate of variance. *Annals of Statistics*, 9: 586-596.

Endler, J. A. (1977). *Geographic variation, speciation and clines*. Pp. 246. Princeton University Press, New Jersey, .

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.

Ford, C. E. (1966). The use of chromosomes markers. *En: Micklem H. S. & J. F. Loutit, (eds.): Tissue Grafting and radiation*. Pp.197-206. Academic Press, New York.

Goudet, J., Raymond, M., de Meeüs, T. & F. Rousset (1996). Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, 144: 1933-1940.

Gropp, A., Tettenborn, U. & E. V. Lehmann (1970). Chromosomenvariation vom Robertson'schen Typus bei der Tabakmaus, *M. poschiavinus*, und ihren Hybriden mit der Laboratoriumsmaus. *Cytogenetics*, 9: 9-23.

Gropp, A., Winking, H., Redi, C., Capanna, E., Britton-Davidian, J. & G. Noack (1982). Robertsonian karyotype variation in wild house mice from Rhaeto-Lombardia. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 34: 67-77.

Gündüz, I. (2000). Evolutionary genetics of the house mouse (*Mus musculus domesticus*), with particular emphasis on chromosomal and mitochondrial DNA variation. Tesis Doctoral. University of York.

Gündüz, I, López-Fuster, M. J., Ventura, J. & J. B. Searle (2001). Clinal analysis of a chromosomal hybrid zone in the house mouse. *Genetical Research*, 77: 41-51.

Guo, S. W. & E. A. Thompson (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Haldane, J. B. S. (1948). The theory of cline. *Journal of Genetics*, 48: 277-284.
- Haldane, J. B. S. (1954). An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics*, 52:631-635
- Hammer, M. F., Schimenti, J. & L. M. Silver (1989). Evolution of mouse chromosome 17 and the origin of inversions associated with *t* haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 86: 3261-3265.
- Harrison, R. G. (1990). Hybrid zones: windows on evolutionary process. En Futuyma D. & J. Antonovics (eds.): *Oxford surveys in evolutionary biology. Vol 7*. Pp 69-128. Oxford University Press, London.
- Harrison, R. G. (1993). Hybrids and hybrids zones: historical perspective. En Harrison R. G. (ed.): *Hybrid zones and the evolutionary process*. Pp. 3-12. Oxford University Press, Inc., Oxford.
- Hartl, D. L. (1981). *A primer of population genetics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hartl, D. L. & A. G. Clark (1989). *Principles of population genetics*. 2^a Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hauffe, H. C. & J. B. Searle (1993). Extreme karyotypic variation in a *Mus musculus domesticus* hybrid zone: The Tobacco Mouse story revisited. *Evolution*, 45: 1374-1395.
- Hauffe, H. C. & J. B. Searle (1998). Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from northern Italy. *Genetics*, 150: 1143-1154.
- Hausser, J., Fedyk, S., Fredga, K., Searle, J. B., Volobouev, V., Wójcik, J. M. & J. Zima (1994). Definition and nomenclature of the chromosome races of *Sorex araneus*. *Folia Zoologica*, 43 (Supplemento 1): 1-9.
- Hedrick, P. W. (1981). The establishment of chromosomal variants. *Evolution*, 35: 322-332.
- Hillis, D. M. (1984). Misuse and modification of Nei's genetic distance. *Systematic Zoology*, 33: 238-240.
- Hübner, R. & L. Koulischer (1990). Cytogenetic studies on wild house mice from Belgium. *Genetica*, 80: 93-100.



- Johnson, M. S., Clarke, B. & J. Murray (1990). The coil polymorphism in *Partula suturalis* does not favour sympatric speciation. *Evolution*, 44: 459-464.
- Key, K. H. L. (1968). The concept of stasipatric speciation. *Systematic Zoology*, 17: 14-22
- King, M. (1995). *Species evolution: the role of chromosome change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lande, R. (1979). Effective deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. *Evolution*, 33: 234-251.
- Lande, R. (1985). The fixation chromosomal rearrangements in a subdivided population with local extinction and colonization. *Heredity*, 54: 323-332.
- Lenington, S., Franks, P., & J. Williams (1988). Distribution of *t* haplotypes in natural populations. *Journal of Mammalogy*, 69:489-499.
- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.G. & P. Primakoff (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *Journal of Cell Biology*, 125: 1157-1163
- Lugon-Moulin, N., Brünner, H., Wytttenbach, A., Hausser, J. & J. Goudet (1999). Hierarchical analyses of genetic differentiation in a hybrid zone of *Sorex araneus* (Insectivora: Soricidae). *Molecular Ecology*, 8: 419-431.
- Louis, E.J. & E. R. Dempster (1987). An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics*, 43: 805-811.
- Lyon, M. F. (1991). The genetic basis of transmission-ratio distortion and male sterility due to the t-complex. *American Naturalist*, 137: 349-358.
- Lyon, M. F. (2003). Transmission ratio distortion in mice. *Annual Review of Genetics*, 37: 393-408.
- Lyon, M. F., Schimenti, J. C. & E. P. Evans (2000). Narrowing the critical regions for mouse t complex transmission ratio distortion factors by use of deletions. *Genetics*, 155: 793-801.
- Mallet, J. & N. Barton (1989). Inference from clines stabilized by frequency-dependent selection. *Genetics*, 122: 967-976.
- Mandahl, N. (1992). Methods in solid tumor cytogenetics. *En* Rooney D. E. & B. H.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

Czepulkowski, (eds.): *Human cytogenetics. A practical approach. Vol. II.* Pp. 155-187. IRL Press, London.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.

Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*. Columbi University Press, New York.

Mayr, E. (1963). *Animal Species and Evolution*. Belknap Press, Cambridge.

Michalakis, Y. & I. Olivieri (1993). The influence of local extinctions on the probability of fixation of chromosomal rearrangements. *Journal of Evolutionary Biology*, 6: 153-170.

Miller, R. G. (1974). The jackknife-a review. *Biometrika*, 61: 1-15

Nachman, M. W., Boyer, S. N., Searle, J. B. & C. F. Aquadro (1994). Mitochondrial DNA variation and the evolution of Robertsonian chromosomal races of house mice, *Mus domesticus*. *Genetics*, 136: 1105-1120.

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 the Linnean Society*, 41: 215-227.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 83:583-590.

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.

Nesbitt, M. N. & U. Francke (1973). A system of nomenclature for band patterns of mouse chromosomes. *Chromosoma (Berl)*, 41: 145-158.

Nichols, R. A. (1989). The fragmentation of tension zones in sparsely populated areas. *American Naturalist*, 134: 969-977.

Raymond, M. & F. Rousset (1995). GENPOP: population genetics software for exact text and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.

Reynolds, J., Weir, B. S. & C.C. Cockerham. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779.

- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Riginos, C. & W. Nachman (1999). The origin of a robertsonian chromosomal translocation in house mice inferred from linked microsatellite markers. *Molecular Biological Evolution*, 16: 1763-1773.
- Rohlf, F. J. and R. R. Sokal. (1981). Comparing numerical taxonomic studies. *Systematic Zoology*, 30: 459-490.
- Rogers, J. S. (1972). Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics, University of Texas Publications*, 7213:145-153
- Rousset, F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145: 1219-1228.
- 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.
- Sarvetnick, N., Fox, H., Mann, E., Mains, P., Elliot, R. & L. Silver (1986). Nonhomologous pairing in mice heterozygous for a *t* haplotype can produce recombinant chromosomes with duplications and deletions. *Genetics*, 113: 723-734.
- Scascitelli, M., Pacchierotti, F., Rizzoni, M., Gustavino, B. & F. Spirito (2003). Cosegregation of Robertsonian metacentric chromosomes in the first meiotic division of multiple heterozygous male mice as revealed by FISH analysis of spermatocyte II metaphases. *Cytogenetics and Genome Research*, 101: 136-142.
- Searle, J. B., Navarro, Y. N. & G. Ganem (1993). Further studies of a staggered hybrid zone in *Mus musculus domesticus* (the house mouse). *Heredity*, 71: 523-531.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics*. 139:457-462
- Sneath, P. H. A. & R. R. Sokal. (1973). *Numerical taxonomy*. Pp. 573. Freeman, San Francisco.
- Sokal, R. R., (1979). Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Systematic Zoology*, 28: 227-232.
- Spirito, F., Modesti, A., Perticone, P., Cristaldi, M., Federici, R. & Rizzoni, M. (1980). Mechanisms of fixation and accumulation of centric fusions in natural populations of *Mus*

2.5. BIBLIOGRAFÍA

musculus L. I. Karyological analysis of a hybrid zone between two populations in the central Apennines. *Evolution*, 34: 453-466.

Stanimirovic, Z. (1995). Comparative analysis of natural and induced polymorphism of chromosomes in the species *Mus musculus*, Linne 1758. pp. 1-204. Doktorska disertacija, Biološki fakultat, Univerzitet u Beogradu.

Stanimirovic, Z., Vucinic, M., Soldatovic, B., & B. Markovic (1997). Genotoxicity and potential chemosterilant effects of rosol. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 47(4): 237-246.

Stanimirovic, Z., Vucinic, M., Soldatovic, B. & M. Vucicevic (1995). A large acrocentric chromosome in the first pair of autosomes in natural populations of *Mus musculus*, Linne 1758. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 45(2-3): 155-160.

Szymura, J. M. & N. H. Barton (1986). Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata*, near cracow in southern Poland. *Evolution*, 40: 1141-1159.

Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437-460.

Tichy, H. & I. Vucak (1987). Chromosomal polymorphism in the house mouse (*Mus domesticus*) of Greece and Yugoslavia. *Chromosoma*, 95: 31-36.

Weir, B. S. (1996). *Genetic data analysis II*. Sonauer Associates, Inc., Canada.

Weir, B. S., & C. C. Cockerham (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

White, M. J. D. (1973). *Animal cytology and evolution*. 3rd edn. Cambridge University Press, London.

White, M. D. J. (1978). Chain processes in chromosomal speciation. *Systematic Zoology*, 27: 285-298.

Winking, H., Gropp, A. & G. Bulfield (1981). Robertsonian chromosomes in mice from North-eastern Greece. *Mouse News Letter*, 64: 69-70.

Wright, S. (1941). On the probability of fixation of reciprocal translocations. *American Naturalist*, 74: 513-522.

Wright, S (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

Wright, S. (1969). *Evolution and the Genetics of Populations. II. The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.

Zheng, Y., Deng, X., Zhao, Y., Zhang, H. & P.A. Martin-DeLeon (2001). Spam1 (PH-20) mutations and sperm dysfunction in mice with the Rb(6.16) or Rb(6.15) translocation. *Mammalian Genome*, 12: 822-829.

2.6. APÉNDICE

2.6. APÉNDICE

Relación de los cariotipos encontrados en las poblaciones muestreadas de Cataluña y Baleares. Se muestra el origen de los datos (1: datos propios; 2: Günduz *et al.*, 2001; 3: Nachman *et al.*, 1994; 4: Adolph & Klein, 1981), el número de animales (N), el número diploide (2n), y el estado de cada metacéntrico (AA: metacéntrico en homocigosis; AB: metacéntrico en heterocigosis; BB: ausencia de metacéntrico).

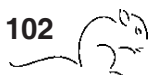
Localidad	origen	N	2n	l	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
Anglesola	2	2	39	-12	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB
	2	3	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Avinyonet	3	2	30	+6	BB	AA	AA	AA	BB	AA	AA
	4	2	31	+4	BB	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	2	1	32	+2	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	2	1	32	+2	-	-	-	-	-	-	-
	4	1	32	+2	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	33	0	BB	AA	AB	BB	BB	AA	AA
	4	1	33	0	-	-	-	-	-	-	-
Badalona	4	1	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
	4	1	39	-12	-	-	-	-	-	-	-
Barcelona	1	2	32	+2	AB	AB	AA	BB	BB	AA	AA
	1	1	33	0	AB	AB	AB	BB	BB	AA	AA
	1	1	33	0	BB	AA	AB	BB	BB	AA	AA
	1	2	34	-2	BB	AB	AB	BB	BB	AA	AA
	1	1	34	-2	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA
	1	1	35	-4	AB	BB	AB	BB	BB	AA	AB
	1	1	35	-4	BB	AB	BB	BB	BB	AA	AA
	1	3	35	-4	BB	BB	AB	BB	BB	AA	AA
	1	1	36	-6	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA
	Barcelona Oeste	4	1	33	0	-	-	-	-	-	-
4		1	35	-4	-	-	-	-	-	-	-
4		1	38	-10	-	-	-	-	-	-	-
Bellaterra	1	1	38	-10	BB	AA	BB	BB	BB	BB	BB
	1	1	38	-10	BB	BB	AB	BB	BB	BB	AB
	1	2	39	-12	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB
	1	4	39	-12	BB	BB	AB	BB	BB	BB	BB
	1	1	39	-12	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
	1	22	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Calaf	2	1	38	-10	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	39	-12	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB
	2	1	39	-12	-	-	-	-	-	-	-
	2	5	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Calafell	1	1	35	-4	BB	AA	AB	BB	BB	BB	AA
	2	2	35	-4	BB	AA	AB	BB	BB	BB	AA
	1	2	35	-4	BB	AA	BB	BB	BB	AB	AA
	1	2	35	-4	BB	AB	AB	BB	BB	AB	AA



Localidad	origen	N	2n	l	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
Calafell (cont.)	1	1	36	-6	BB	AA	AB	BB	BB	BB	AB
	1	1	36	-6	BB	AA	BB	BB	BB	BB	AA
	2	2	36	-6	BB	AA	BB	BB	BB	BB	AA
	1	1	36	-6	BB	AB	BB	BB	AB	AB	AB
	1	1	36	-6	BB	AB	BB	BB	BB	AA	AB
	2	1	37	-8	BB	AA	BB	BB	BB	BB	AB
	1	6	37	-8	BB	AB	BB	BB	BB	BB	AA
	Delta de l'Ebre	1	4	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Fulleda	1	21	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
	2	1	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Garraf	1	4	28	+10	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA
	1	1	28	+10	-	-	-	-	-	-	-
	1	3	29	+8	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AB
	2	1	29	+8	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AB
	1	1	29	+8	AA	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	2	1	29	+8	AA	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	1	29	+8	AA	AA	AB	AA	BB	AA	AA
	1	1	29	+8	AA	AB	AA	AB	AB	AA	AA
	1	2	29	+8	AB	AA	AA	AA	BB	AA	AA
	1	3	29	+8	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	30	+6	AA	AA	AA	AA	BB	AB	AB
	1	1	30	+6	AA	AA	AA	AB	BB	AA	AB
	1	1	30	+6	AA	AA	AB	AB	AB	AA	AB
	1	3	30	+6	AA	AA	AB	AB	BB	AA	AA
	1	1	30	+6	AB	AA	AA	AA	BB	AA	AB
	2	1	30	+6	AB	AA	AA	AA	BB	AB	AA
	2	2	30	+6	AB	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	3	30	+6	-	-	-	-	-	-	-
	1	1	31	+4	AB	AA	AB	AB	BB	AA	AA
	1	1	31	+4	AB	AA	BB	AA	BB	AA	AA
	1	3	31	+4	-	-	-	-	-	-	-
	1	1	32	+2	AB	AA	BB	AB	BB	AA	AA
	1	1	32	+2	AB	AB	AB	AB	AB	AA	AB
	1	1	32	+2	BB	AA	AA	BB	AB	AA	AB
	2	1	32	+2	BB	AB	AA	AB	BB	AA	AA
	1	1	32	+2	BB	AB	AB	AA	BB	AA	AA
	1	1	32	+2	-	-	-	-	-	-	-
	1	1	33	0	AB	BB	AB	AB	AB	AA	AB
	1	1	33	0	-	-	-	-	-	-	-
	1	1	35	-4	BB	AB	AB	AB	BB	AA	BB
1	1	35	-4	BB	BB	AB	AB	BB	AA	AB	
Gavà	1	1	29	+8	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AB
	1	1	30	+6	AA	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	5	30	+6	AB	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	1	30	+6	-	-	-	-	-	-	-
	1	1	31	+4	AB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	1	32	+2	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA

2.6. APÉNDICE

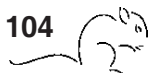
Localidad	origen	N	2n	l	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
Illes Medes	1	2	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
La Granada	1	2	27	+12	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA
	1	1	28	+10	AA	AA	AA	AB	AB	AA	AA
	1	3	29	+8	AA	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	1	29	+8	AA	AA	AA	BB	AB	AA	AA
	1	1	29	+8	AB	AA	AA	AB	AB	AA	AA
	1	2	29	+8	BB	AA	AA	AA	AB	AA	AA
	1	1	30	+6	AA	AA	AA	AB	BB	AB	AA
	1	1	30	+6	AA	AA	BB	AA	BB	AA	AA
	1	1	30	+6	AB	AA	AA	AA	AB	AB	AB
	1	4	30	+6	AB	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	5	30	+6	AB	AA	AA	BB	AB	AA	AA
	1	2	30	+6	BB	AA	AA	AA	BB	AA	AA
	1	1	30	+6	BB	AA	AA	AB	AB	AA	AA
	1	1	30	+6	BB	AA	AB	AA	AB	AA	AA
	1	1	31	+4	AA	AA	AA	BB	BB	AB	AA
	1	1	31	+4	AA	AA	AB	AB	BB	AA	AB
	1	1	31	+4	AB	AA	AA	AB	BB	AA	AB
	1	2	31	+4	AB	AA	AA	AB	BB	AB	AA
	1	1	31	+4	AB	AA	AA	AB	AB	BB	AA
	1	9	31	+4	AB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	2	31	+4	AB	AA	AB	AB	BB	AA	AA
	1	3	31	+4	BB	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	1	32	+2	AA	AA	AA	BB	BB	BB	AA
	1	2	32	+2	AB	AA	AA	BB	BB	AA	AB
	1	3	32	+2	AB	AA	AA	BB	BB	AB	AA
	1	2	32	0	AB	AA	AB	AB	BB	AA	AB
	1	1	32	0	AB	AA	AB	BB	BB	AA	AB
	1	1	32	+2	BB	AA	AA	AB	AB	AB	AB
	1	2	32	+2	BB	AA	AA	AB	BB	AA	AB
	1	1	32	+2	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	1	32	+2	BB	AB	AA	AB	BB	AA	AA
	1	1	33	0	AA	AA	AA	BB	BB	BB	AB
	1	1	33	0	BB	AA	AA	AB	BB	BB	AA
	1	1	33	0	BB	AB	AA	BB	AB	AB	AA
	1	1	34	-2	BB	AA	AB	BB	BB	AA	AB
	1	1	34	-2	BB	AA	AB	BB	BB	AB	AA
	1	1	34	-2	BB	AA	BB	AB	AB	AB	AB
	1	1	35	-4	BB	AA	AB	BB	BB	BB	AA
La Llacuna	2	2	35	-4	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	36	-6	BB	AB	BB	BB	BB	AB	AA
	2	1	36	-8	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	37	-8	BB	BB	AB	BB	BB	BB	AA
La Riera	1	3	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
	2	8	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
La Roca	3	2	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
	4	2	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB



Localidad	origen	N	2n	l	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
Lavern	1	1	31	+6	BB	AA	AA	AA	BB	AA	AB
	1	4	31	+4	BB	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	1	31	+4	BB	AA	AB	AA	BB	AA	AA
	1	2	32	+2	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	3	32	+2	BB	AA	AB	AB	BB	AA	AA
	1	4	32	+2	BB	AB	AA	AB	BB	AA	AA
	1	1	33	0	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AB
	1	2	33	0	BB	AA	AB	BB	BB	AA	AA
	1	3	33	0	BB	AB	AA	BB	BB	AA	AA
	1	3	33	0	BB	AB	AB	AB	BB	AA	AA
Les Borges del Camp	2	5	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Les Ordes	2	1	38	-10	BB	AA	BB	BB	BB	BB	BB
Les Pobles	1	1	37	-8	BB	AB	AB	BB	BB	BB	AB
	2	3	37	-8	BB	AB	AB	BB	BB	BB	AB
	2	1	37	-8	BB	BB	AA	BB	BB	BB	AB
	1	1	38	-10	AB	AB	BB	BB	BB	BB	BB
	1	1	38	-10	BB	AA	BB	BB	BB	BB	BB
	2	2	38	-10	BB	AB	AB	BB	BB	BB	BB
	2	1	38	-10	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	39	-12	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB
	1	4	39	-12	BB	BB	AB	BB	BB	BB	BB
	1	2	39	-12	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
	2	1	39	-12	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
	2	1	39	-12	-	-	-	-	-	-	-
	1	5	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
	2	1	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
L'Espluga Calba	1	5	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
	2	4	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Moià	4	2	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Sabadell	1	4	38	-10	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA
	1	4	39	-12	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
	2	1	39	-12	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
St. Jordi (Mallorca)	3	2	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
	4	2	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
St. Llorenç del Penedès	2	1	36	-6	BB	AA	BB	BB	BB	AB	AB
	2	2	36	-6	BB	AB	AA	BB	BB	BB	AB
	2	1	37	-8	BB	BB	AB	BB	BB	AB	AB
	2	1	38	-10	BB	AB	BB	BB	BB	AB	BB
St. Martí Sarroca	2	2	32	+2	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	2	2	33	0	BB	AA	AA	BB	BB	AB	AA

2.6. APÉNDICE

Localidad	origen	N	2n	I	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
St. Pau d'Ordal	1	5	28	+10	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA
	1	6	29	+8	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AB
	1	10	29	+8	AB	AA	AA	AA	BB	AA	AA
	1	2	30	+6	AB	AA	AA	AA	BB	AA	AB
	1	1	30	+6	AB	AA	AA	AA	BB	AB	AA
	1	7	30	+6	AB	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	3	31	+4	AB	AA	AA	AB	BB	AB	AA
	1	4	31	+4	AB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	1	30	+6	BB	AA	AA	AA	BB	AA	AA
	1	3	30	+6	-	-	-	-	-	-	-
	1	2	31	+4	BB	AA	AA	AA	BB	AB	AA
	1	4	31	+4	BB	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	2	31	+4	BB	AB	AA	AA	BB	AA	AA
	1	4	32	+2	BB	AA	AA	AB	BB	AB	AA
	1	1	32	+2	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	1	33	0	BB	AA	AA	BB	BB	AB	AA
1	1	33	0	BB	AB	AA	BB	BB	AA	AA	
1	1	34	-2	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	
St. Sadurní d'Anoia	2	1	33	0	BB	AA	AB	AB	BB	AB	AA
	2	1	33	0	BB	AB	AA	BB	BB	AA	AA
	2	1	34	-2	BB	AA	AB	BB	BB	AA	AB
	2	1	34	-2	BB	AA	AB	BB	BB	AB	AA
	2	1	35	-4	BB	AB	AA	BB	BB	AA	BB
	2	1	37	-8	BB	AB	AA	BB	BB	BB	BB
	2	1	37	-8	BB	AB	BB	BB	BB	AA	BB
Sta. Coloma de Queralt	2	1	37	-8	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	38	-10	BB	AA	BB	BB	BB	BB	BB
	2	1	38	-10	BB	AB	AB	BB	BB	BB	BB
	2	2	38	-10	BB	AB	BB	BB	BB	BB	AB
	2	1	38	-10	-	-	-	-	-	-	-
	2	2	39	-12	BB	AB	BB	BB	BB	BB	BB
	2	1	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Vallbona d'Anoia	2	1	37	-8	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	39	-12	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
	2	4	40	-14	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
Valdoreix	4	1	38	-10	-	-	-	-	-	-	
Viladecans	2	1	29	+8	AB	AA	AA	AA	BB	AA	AA
	2	1	30	+6	BB	AA	AA	AA	BB	AA	AA
	2	1	30	+6	-	-	-	-	-	-	-
	2	2	31	+4	BB	AA	AB	AA	BB	AA	AA
Vilanova i la Geltrú I	2	1	30	+4	-	-	-	-	-	-	-
	1	1	31	+4	AB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	2	1	31	+4	BB	AA	AA	AB	BB	AA	AA
	1	1	31	+4	BB	AA	AA	BB	AB	AA	AA



Localidad	origen	N	2n	l	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
Vilanova i la Geltrú I (cont.)	2	1	31	+4	BB	AA	AB	AA	BB	AA	AA
	1	1	31	+4	BB	AA	AB	AB	AB	AA	AA
	1	1	31	+4	BB	AA	BB	AB	AA	AA	AA
	2	1	31	+4	-	-	-	-	-	-	-
	1	1	32	+2	AB	AA	AB	BB	BB	AA	AA
	1	1	32	+2	AB	AB	AA	BB	BB	AA	AA
	1	2	32	+2	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	2	3	32	+2	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	2	1	32	+2	BB	AA	AB	AB	BB	AA	AA
	1	1	32	+2	BB	AB	AA	AB	AB	AA	AB
	1	2	32	+2	-	-	-	-	-	-	-
	2	2	32	+2	-	-	-	-	-	-	-
	1	1	33	0	AB	AA	BB	BB	BB	AA	AA
	1	1	33	0	BB	AB	AA	AB	BB	AA	AB
	2	1	33	0	BB	AB	AA	BB	BB	AA	AA
	2	1	34	-2	BB	AA	AB	BB	BB	AB	AA
Vilanova i la Geltrú II	1	1	30	+6	AA	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	1	31	+4	AB	AA	AA	AB	BB	AB	AA
	1	3	31	+4	AB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	2	32	+2	AB	AA	AB	BB	BB	AA	AA
	1	3	32	+2	AB	AB	AA	BB	BB	AA	AA
	1	1	32	+2	BB	AA	AA	AB	BB	AB	AA
	1	2	32	+2	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	1	1	33	0	AB	AA	AA	BB	BB	AB	AB
	1	1	33	0	AB	AA	BB	BB	BB	AA	AA
	1	1	33	0	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AB
	1	1	33	0	BB	AA	AA	BB	BB	AB	AA
	1	1	33	0	BB	AA	AB	BB	BB	AA	AA

