

Departament de Genètica

Facultat de Biologia



Anàlisi dels canvis cromosòmics a llarg
termini en poblacions naturals de
Drosophila subobscura i la seva relació
amb el possible canvi climàtic global

Elisabet Solé Dalfó

2002

Anàlisi dels canvis cromosòmics a llarg termini en poblacions
naturals de *Drosophila subobscura* i la seva relació amb el
possible canvi climàtic global

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Biologia
Departament de Genètica
Programa de Genètica
Bienni 1996-1998

Memòria presentada per
Elisabet Solé Dalfó

Per optar al grau de
Doctora en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció del
Dr. Lluís Serra i Camó i Dr. Joan Balanyà i Maymó

Lluís Serra i Camó

Joan Balanyà i Maymó

Elisabet Solé Dalfó

Barcelona, octubre de 2002

Índex

| | |
|---|----|
| Introducció | 1 |
| 1 L'espècie <i>Drosophila subobscura</i> | 3 |
| 1.1 Àrea de distribució | 5 |
| 1.2 Els cromosomes i les seves inversions | 6 |
| 2 El polimorfisme cromosòmic | 10 |
| 3 La colonització d'Amèrica | 12 |
| 4 Estudis de la variació temporal i altitudinal del polimorfisme cromosòmic | 15 |
| 4.1 Estudis dels canvis estacionals del polimorfisme cromosòmic | 16 |
| 4.2 Estudis dels canvis del polimorfisme cromosòmic a curt termini | 18 |
| 4.3 Estudis dels canvis del polimorfisme cromosòmic a llarg termini | 18 |
| 4.4 Estudis de la variació del polimorfisme cromosòmic amb l'altitud | 19 |
| 5 Canvi climàtic | 20 |
| Objectius | 23 |
| Material i mètodes | 27 |
| 1 Poblacions analitzades | 29 |
| 1.1 Poblacions mediterrànies | 29 |
| 1.2 Poblacions atlàntiques | 34 |
| 1.3 Poblacions centreeuropees | 36 |
| 2 Obtenció de les mostres | 38 |
| 3 Anàlisi de la diversitat d'espècies | 41 |
| 4 Estudi del polimorfisme cromosòmic | 43 |
| Resultats | 49 |
| 1 Diversitat d'espècies | 51 |
| 1.1 Riquesa d'espècies | 53 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 1.2 | Rarefaction | 54 |
| 1.3 | Índex de diversitat | 55 |
| 1.4 | Índex d'uniformitat | 55 |
| 2 | Polimorfisme cromosòmic | 55 |
| 2.1 | Descripció de les noves inversions | 61 |
| 2.2 | Comparació del polimorfisme obtingut a partir dels mascles del camp amb l'obtingut a partir dels mascles descendents de les femelles del camp ... | 65 |
| 2.3 | Heterogeneïtat entre poblacions i mostres | 65 |
| 2.4 | Distàncies genètiques entre poblacions | 68 |
| 2.5 | Variació en l'espai de les freqüències cromosòmiques | 70 |
| 2.6 | Variació en el temps de les freqüències cromosòmiques | 72 |
| 3 | Annex | 77 |
| | Discussió | 85 |
| 1 | Diversitat d'espècies | 87 |
| 2 | Polimorfisme cromosòmic | 90 |
| | Conclusions | 101 |
| | Bibliografia | 105 |
| | Programari utilitzat | 119 |

INTRODUCCIÓ

1 L'espècie *Drosophila subobscura*

Drosophila subobscura és una espècie del grup *obscura* que pertany al subgènere *Sophophora* del gènere *Drosophila* dels dípters. Generalment se subdivideix el subgènere *Sophophora* en 7 grups d'espècies: *melanogaster*, *obscura*, *saltans*, *willistoni*, *dentissima*, *fima* i *dispar*. El grup *obscura* compta actualment amb més de 35 espècies. Sturtevant (1942) va dividir inicialment el grup *obscura* en dos subgrups (*obscura* i *affinis*) basant-se en característiques morfològiques com el nombre de pèes de les pintes tarsals dels mascles, la forma dels testicles i el nombre de fileres de quetes acrosticals. *D. subobscura* va ser inclosa al subgrup *obscura*. Anderson *et al.* (1977) mantenien encara aquest criteri de classificació. Posteriorment, Lakovaara i Saura (1982) i Beckenbach *et al.* (1993), van considerar que hi havia suficients diferències entre els membres neàrtics i els paleàrtics del subgrup *obscura* per dividir-los en dos subgrups diferents; així doncs, van proposar una classificació que agrupava les espècies del grup *obscura* en tres subgrups: *pseudoobscura*, format per unes 6 espècies de l'oest d'Amèrica del Nord; *obscura*, constituït per unes 17 espècies paleàrtiques; i *affinis*, que englobava espècies neàrtiques juntament amb la paleàrtica *D. helvetica*. L'única espècie del grup present a l'Àfrica tropical, *D. microlabis*, es va mantenir en un principi dins del subgrup *obscura*; però en descobrir-se posteriorment en aquesta regió 3 noves espècies del grup (Tsacas, 1985; Cariou *et al.*, 1988) va ser proposada la formació del subgrup *microlabis* per incloure les 4 espècies afrotropicals del grup. Una de les darreres divisions en subgrups ha estat la proposada per Barrio *et al.* (1994) que segreuen 3 espècies del subgrup *obscura* (*D. subobscura*, *D. madeirensis* i *D. guanche*) per formar el nou subgrup *subobscura*. D'aquesta manera, el grup *obscura* quedaria dividit en 5 subgrups: *affinis* i *pseudoobscura*, amb espècies típiques de Nord-amèrica; *obscura* i *subobscura*, típics d'Europa, i *microlabis* que és típic d'Àfrica (Figura 1). Cal dir, però, que els diversos estudis filogenètics portats a terme amb les espècies del grup *obscura*, no han aportat una informació aclaridora i definitiva respecte a la seva classificació en subgrups, la qual cosa provoca que encara actualment els investigadors no s'hagin posat d'acord ni en el nombre de subgrups del grup ni en les espècies que els integren (O'Grady, 1999).

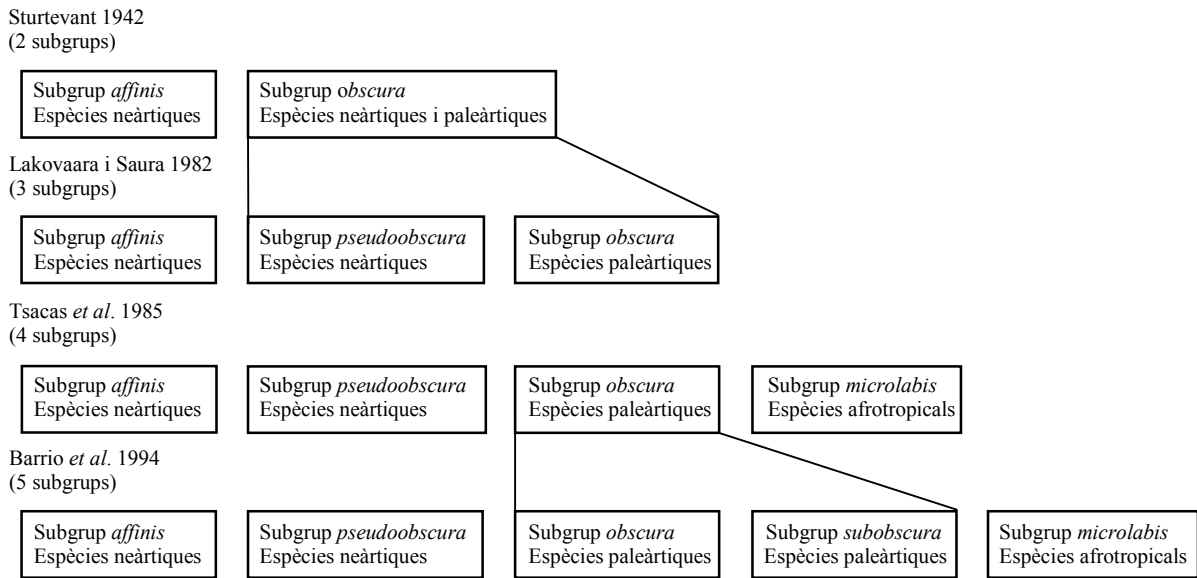


Figura 1. Recull històric de la taxonomia del grup *obscura*.

La primera descripció de l'espècie *Drosophila subobscura* és deguda a Collin (1936); posteriorment, diversos autors van anar aportant noves dades per completar-ne la descripció (Figura 2). *Drosophila subobscura* és una espècie polífaga, d'ecologia mal coneguda, encara que sembla ser una espècie molt generalista. No es coneix exactament el lloc de la natura on es reproduïx i on pon els ous; s'han trobat ous d'aquesta espècie tant en fruits, com en plantes en descomposició, exurats vegetals i fongs (Begon i Shorrocks, 1978). Es cultiva fàcilment al laboratori i el seu cicle vital tarda uns 20 dies a completar-se a 18°C, això fa que sigui un organisme molt útil per fer estudis genètics. Aquesta espècie també ha estat utilitzada per fer estudis de filogènia d'insectes, comportament i biologia en general per diversos

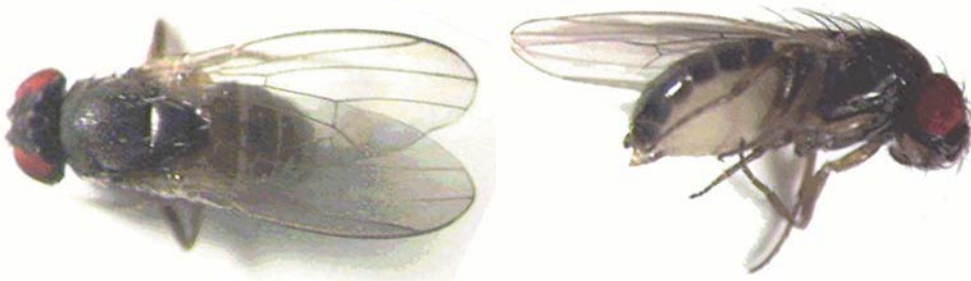


Figura 2. Vista dorsal i lateral de *Drosophila subobscura*.

grups i científics europeus. És una espècie molt ben estudiada des del punt de vista de la genètica evolutiva (Krimbas, 1993; Powell, 1997).

1.1 Àrea de distribució

L'àrea de distribució de l'espècie a Europa s'estén pràcticament per tot el continent excepte el nord d'Escandinàvia, i inclou les illes Britàniques, i les del Mediterrani (illes Balears, Còrsega, Sardenya, Sicília, Creta, Xipre i les petites illes italianes i gregues) (Figura 3). També es troba en diverses repúbliques de l'antiga Unió Soviètica (Sokolov i Dubinin, 1941), la regió iraniana de la mar Càspia, Turquia, Líban (Pipkin, 1951), Israel i la zona costanera del nord d'Àfrica fins al Sàhara, a més de les illes Canàries, Açores i Madeira (Krimbas, 1993).

A la natura, es troba a prop dels marges dels boscos de *Quercus*, *Abies*, *Pinus*, *Castanea*, *Ulmus*, *Acer* i altres, encara que sembla més associada a l'activitat humana del que inicialment es pensava. Cal tenir em compte que el límit nord de distribució de l'espècie a Europa coincideix amb el del *Quercus robur*.

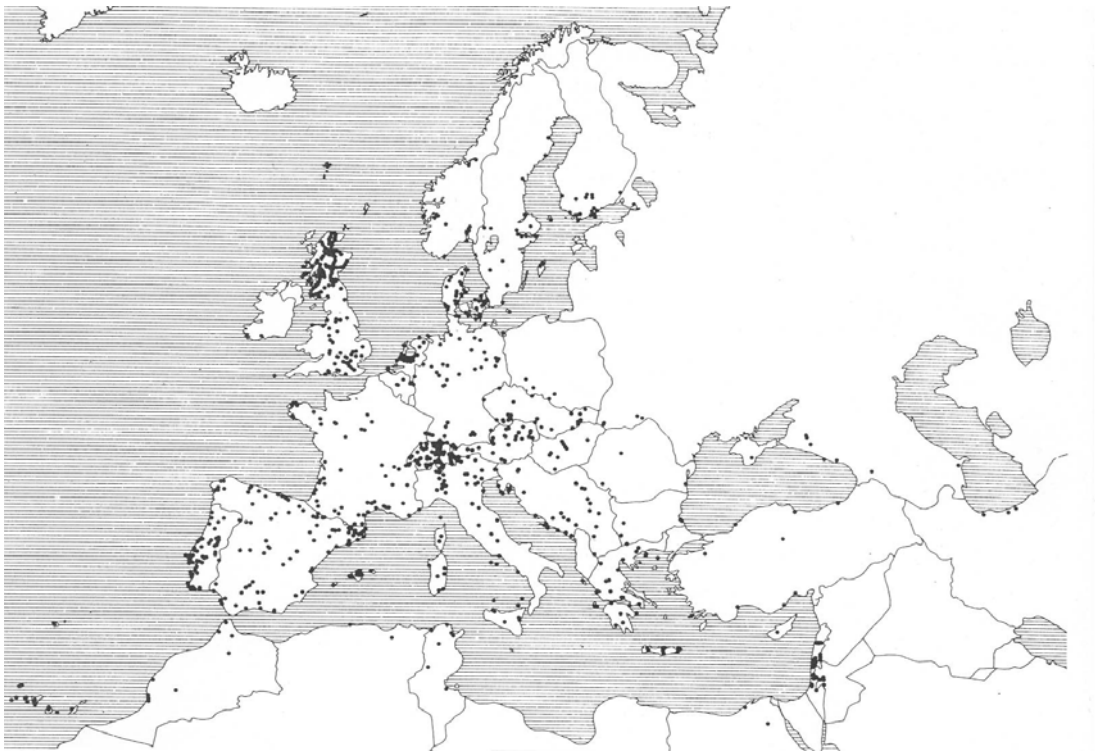


Figura 3. Mapa de la regió paleàrtica on hi ha representades totes les poblacions en les quals s'ha capturat *D. subobscura* (Krimbas, 1993).

L'abundància de *D. subobscura* en les diferents zones de l'àrea de distribució varia segons si la regió és central o marginal. A les regions perifèriques de l'àrea de distribució l'espècie es troba en un percentatge més baix del que es troba en la zona central de distribució. No obstant això, s'ha demostrat en diversos estudis que es pot trobar des del nivell del mar fins a altituds de més de 2000 metres. Cal tenir en compte que al centre i nord d'Europa *D. obscura* és una espècie tan freqüent o més que *D. subobscura*.

A finals de la dècada dels 70 i inicis dels 80 *D. subobscura* va colonitzar la costa oest d'Amèrica, tant la del Nord com del Sud, i s'ha estès en aquest continent al llarg de la costa ocupant les regions corresponents a les mateixes latituds que ocupa al continent europeu.

1.2 Els cromosomes i les seves inversions

D. subobscura presenta 6 parells de cromosomes, 5 parells d'acrocentrics (designats A, J, U, E i O) i un parell de puntiformes (Mainx *et al.*, 1953) (Figura 6). Els cromosomes J, U, E i O són els autosomes i l'A és el cromosoma sexual (=X). Frizzi (1950) va ser el primer autor en publicar un mapa dels cromosomes de *D. subobscura*, i en va descriure detalladament la morfologia. Posteriorment, Mainx *et al.* (1953) van fer un estudi més exhaustiu i ampli. Aquests cromosomes acrocèntrics presenten un ric polimorfisme per inversions en poblacions naturals que ha estat molt estudiat. Una de les primeres investigadores interessades en aquest polimorfisme va ser Stumm-Zollinger (1953), que va estudiar-lo en diverses poblacions europees i va anar anomenant les diferents inversions amb un nom propi que les identificava. Aquest nom començava amb la lletra del cromosoma en què es trobava; per exemple, la inversió Attila es trobava en el cromosoma A. Molt aviat aquest sistema es va canviar per un altre de numeració que facilitava la nomenclatura de les diferents inversions i ordenaments cromosòmics.

S'han identificat més de 60 inversions diferents que formen més de 85 ordenaments. Cada inversió s'anomena amb una lletra que és la del cromosoma on es troba i un número que la identifica, per exemple A₂. Les inversions es van anar

numerant a mesura que es van anar descrivint (Kunze-Mühl i Müller, 1958). Mainx *et al.* (1953) van dividir en 100 parts el conjunt de cromosomes politènics de l'espècie *Drosophila subobscura*; a cada part la van anomenar zona i les van començar a numerar per la regió proximal del cromosoma A, de manera que la zona 99 és la regió distal del cromosoma O, i la zona 100 correspon al cromosoma puntiforme o *dot*. Cada zona es va subdividir en 3, 4 o 5 seccions que es van anomenar amb les lletres A, B, C..., aquestes seccions s'anomenen segments i no han estat subdividides en regions més petites. Per tal de mapar amb exactitud els punts de trencament de cada inversió, Kunze-Mühl i Müller (1958) van refer el mapa anterior mantenint les 100 zones amb què es van dividir el conjunt dels cromosomes i els 405 segments. Així doncs, entendrem per 12C, el segment C de la zona 12, aquest es troba en el cromosoma A, i és un dels punts de trencament d'una inversió. Krimbas (1993) publicà un nou mapa, que actualitza el de Kunze-Mühl i Müller en afegir-hi els punts de trencament de les inversions descrites amb posterioritat (Figura 4).

Mainx *et al.* (1953) van utilitzar la soca Küsnacht, que és homocariotípica per tots els cromosomes, per elaborar el mapa de *D. subobscura*. Als ordenaments d'aquesta soca Küsnacht se'ls va considerar estàndards (A_{ST} , J_{ST} , U_{ST} , E_{ST} i O_{ST}), i corresponen als ordenaments més freqüents a Centreeuropa i les illes Britàniques. Se sap que alguns d'aquests ordenaments estàndard no són els més antics filogenèticament (Krimbas, 1993). Per definir els punts de trencament de les inversions, el millor és observar la inversió sobre un ordenament estàndard. Algunes inversions es troben sempre soles en els cromosomes, com per exemple la inversió A_1 , i altres poden trobar-se soles o formant part d'ordenaments complexos, com és el cas de l' U_1 , que també es troba formant part de l'ordenament U_{1+2} (Figura 5). També se'n troben algunes que només formen part d'un ordenament específic; això acostuma a passar en les inversions imbricades; un exemple en seria la inversió E_9 , que sempre s'acostuma a presentar com E_{1+2+9} , i mai sola. De vegades per indicar que les inversions estan imbricades, es subratllen els números de les inversions que estan imbricades amb una línia continua; per exemple, $O_{\underline{3+4}}$ indica que les inversions O_3 i O_4 són imbricades. En canvi, inversions en el mateix cromosoma però no imbricades s'indiquen amb una línia discontinua, per exemple $O_{\underline{3+4}+7}$, on s'indica que les inversions O_3 i O_4 estan imbricades, però la inversió O_7 no ho està amb cap de les

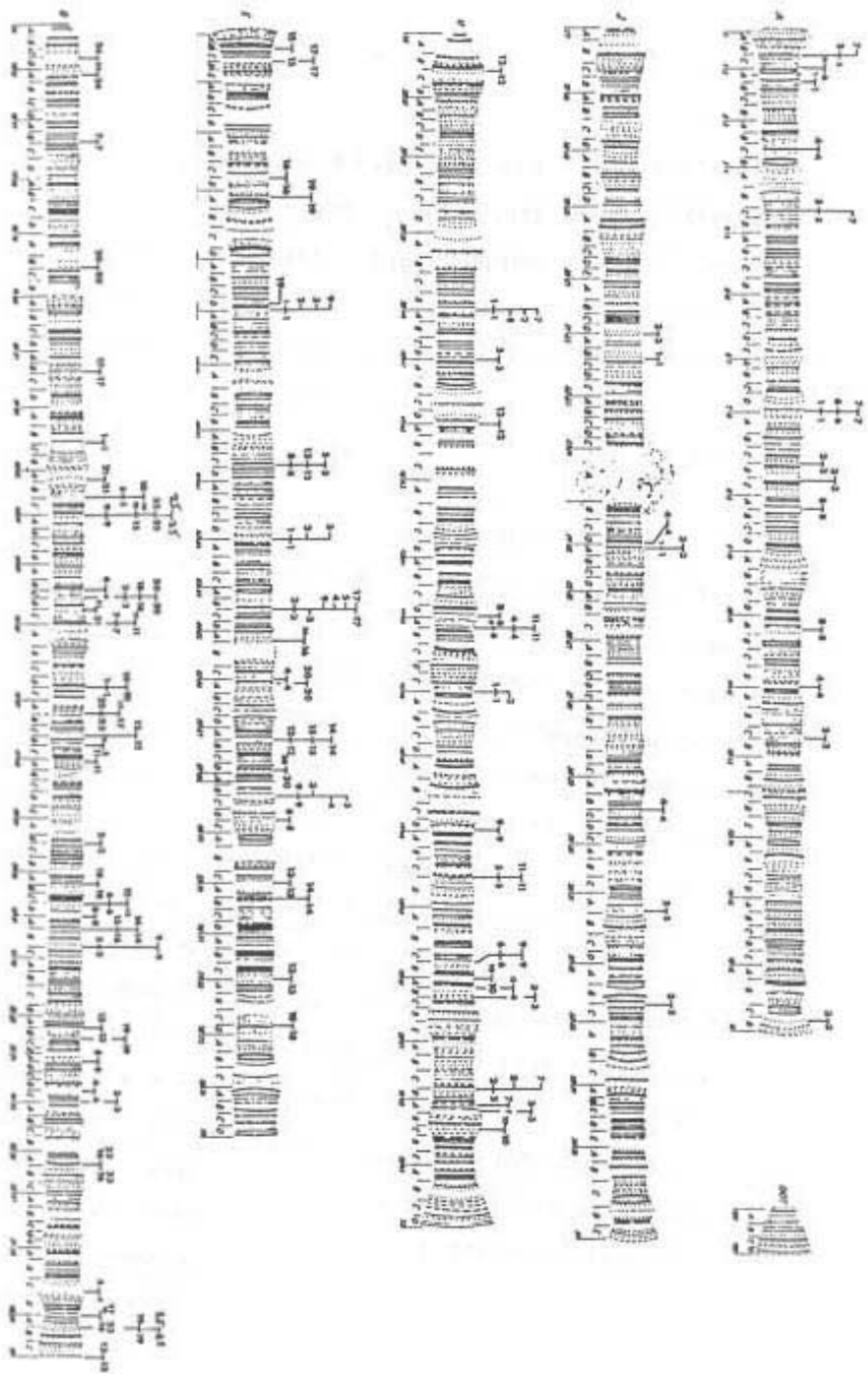


Figura 4. Mapa dels cromosomes de *Drosophila subobscura*, realitzat per Kunze-Mühl i Müller, actualitzat amb noves inversions (Krimbas, 1993).

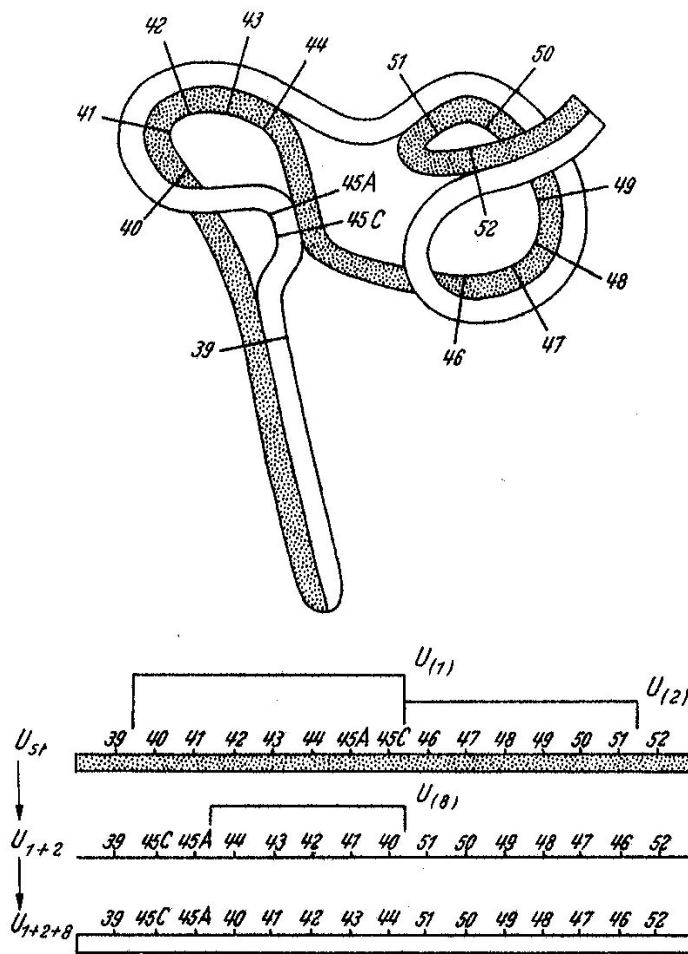


Figura 5. Esquema de l'aparellament dels cromosomes en un heterozigot U_{1+2+8}/U_{ST} . En la part superior podem veure la figura en forma de laç que s'origina quan s'aparella un cromosoma U_{ST} (representat puntejat) amb el cromosoma U_{1+2+8} (representat en blanc sense puntejar). A la part inferior s'indica la formació de l'ordenament U_{1+2+8} a partir d' U_{ST} . La figura de la part superior es forma quan s'aparellen les diverses zones i seccions homòlogues del cromosoma U_{ST} amb el que té l'ordenament U_{1+2+8} (Kunze-Mühl i Sperlich, 1955).

anteriors. Les inversions imbricades es troben sempre associades. En poblacions naturals, s'ha vist que les inversions no imbricades d'un mateix cromosoma presenten un fort desequilibri del lligament, el cromosoma O n'és un exemple. Així encara que la inversió O_7 es trobi separada de l'ordenament O_{3+4} , en poblacions naturals gairebé sempre es detecta l'ordenament O_{3+4+7} , mentre que la inversió O_7 sola es presenta amb baixa freqüència. Per altra banda, no es disposa de dades clares que permetin afirmar que hi ha associacions entre inversions de diferents cromosomes, ni en poblacions naturals ni de laboratori (Sperlich i Feuerbach, 1966).

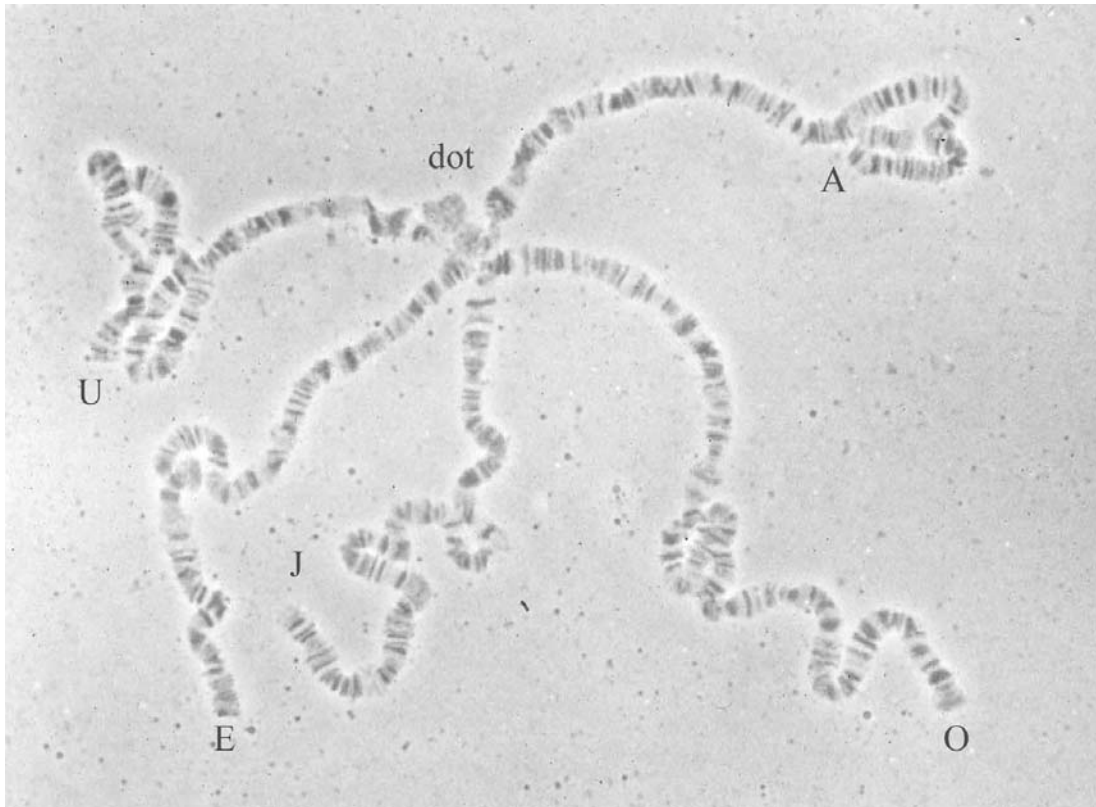


Figura 6. Fotografia dels 6 parells de cromosomes (5 acrocèntrics i el puntiforme) en una preparació de cromosomes politènics d'un individu de *D. subobscura*.

2 El polimorfisme cromosòmic

Un dels atractius de *D. subobscura* com a material d'estudi en genètica de poblacions és que presenta un gran nombre d'inversions cromosòmiques en les poblacions naturals. Tots els cromosomes excepte el puntiforme presenten polimorfisme per inversions (Figura 6). Aquest polimorfisme cromosòmic per inversions ha estat molt estudiat a Europa per científics de diversos països. S'han estudiat poblacions des de Finlàndia fins a Tunísia i Egipte, incloent-hi també algunes zones de l'antiga Unió Soviètica. També s'han estudiat poblacions del Marroc i de les illes Canàries, Madeira i Açores. En total s'han analitzat més de 130 poblacions a la regió paleàrtica, algunes d'elles diverses vegades i altres per més d'un autor (Figura 3). Tot això ha permès conèixer la distribució dels diferents ordenaments i veure que a Europa alguns d'aquests es distribueixen seguint unes clines latitudinals. Com a clina entenem un canvi gradual de les freqüències de les

inversions en una certa direcció. Per exemple, a les poblacions del nord predominen els ordenaments estàndard i a mesura que anem cap al sud aquests disminueixen en freqüència (Figura 7). Alguns ordenaments també es comporten com els estàndard, per exemple U_1 i O_{3+4+12} . En canvi, d'altres són molt freqüents al sud d'Europa i la seva freqüència disminueix a mesura que es va cap al nord, com per exemple A_2 i O_{3+4} . Algunes clines no segueixen estrictament els meridians. Per exemple, A_{ST} i O_{ST} presenten clines NE-SW. Hi ha ordenaments amb clina E-W, com per exemple A_1 . Altres ordenaments són molt freqüents en una determinada àrea i la seva freqüència disminueix a mesura que ens allunyem d'aquesta zona, com ara U_{1+2+3} i $E_{1+2+9+12}$ a la regió mediterrània, o J_{3+4} a la Mediterrània oriental, Turquia, Grècia i Sardenya, o també U_{1+2+6} a la regió dels Balcans i Àsia Menor, i E_{1+2+9} als Balcans.

Les clines poden formar-se principalment per un procés adaptatiu o degut a factors històrics. En el cas del procés adaptatiu, el contingut genètic dels diferents ordenaments cromosòmics donaria una adaptació diferencial als individus enfront de condicions ambientals diferents. És a dir, per exemple, en latituds fredes hi hauria

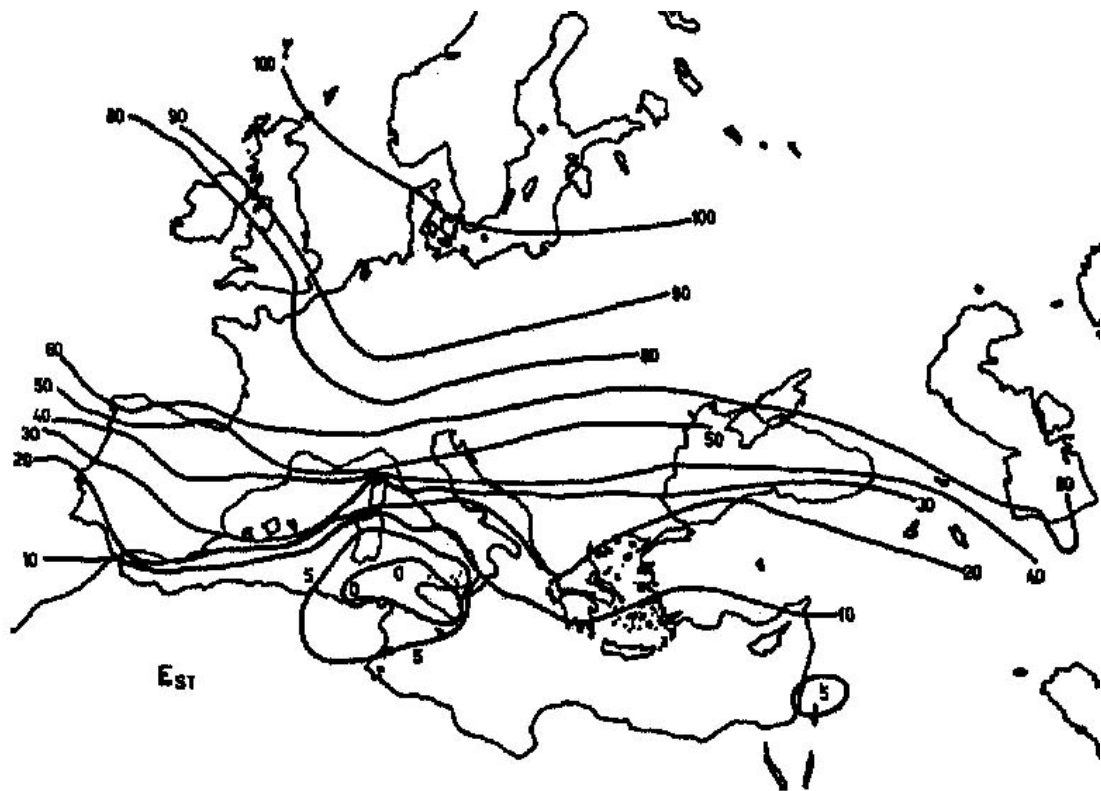


Figura 7. Clina latitudinal de la freqüència de l'ordenament E_{ST} a la regió paleàrtica. L'ordenament E_{ST} és molt freqüent al nord d'Europa i la seva freqüència va disminuint a mesura que ens desplaçem cap al sud (Krimbas i Loukas, 1980).

determinats ordenaments que permetrien una millor adaptació dels individus a aquestes condicions que d'altres ordenaments, o a la inversa. Per altra banda, les clines també poden originar-se per factors històrics. Per exemple, la freqüència d'un determinat ordenament serà més alta a la zona on aquest s'ha originat, i anirà disminuint a mesura que ens allunyem d'aquesta zona. Inicialment es discutia si les clines latitudinals d'alguns ordenaments observades a la regió paleàrtica eren degudes a un procés adaptatiu o a factors històrics. La colonització d'Amèrica per *D. subobscura*, com s'explica en el proper apartat, ha permès demostrar que les clines latitudinals de les ordenacions cromosòmiques d'aquesta espècie obeeixen a un procés adaptatiu. Per tant, el sistema d'inversions cromosòmiques d'aquesta espècie constitueix un mecanisme genètic d'adaptació ràpida a l'ambient que li dona una especial flexibilitat evolutiva.

3 La colonització d'Amèrica

La colonització d'Amèrica per *D. subobscura* ha permès demostrar que la hipòtesi adaptativa de la formació de les clines latitudinals és la correcta. L'any 1978 es va detectar per primera vegada *D. subobscura* a Xile, a la població de Puerto Montt (Brncic *et al.*, 1981). Estudis posteriors mostren que l'espècie ha colonitzat una àrea que s'estén a Xile des de La Serena a Punta Arenas (Budnik i Brncic, 1982; Prevosti *et al.*, 1983a, 1989; Mestres *et al.*, 1993); també s'han trobat individus d'aquesta espècie a localitats d'Argentina i Uruguai (López, 1985; Goñi i Martínez, 1995; Goñi *et al.*, 1998). L'expansió de l'espècie per aquesta extensa àrea geogràfica va ésser ràpida i va tenir lloc en pocs anys. El 1982 es va detectar l'espècie a la localitat de Port Townsend, a l'estat de Washington (Beckenbach i Prevosti, 1986) i, més tard, a diferents localitats de la costa californiana (Ayala *et al.*, 1989). Com havia passat abans amb Sud-amèrica, a Nord-amèrica tampoc s'havia trobat abans l'espècie, com ho demostren les anàlisis exhaustives del polimorfisme cromosòmic d'algunes espècies neàrtiques del subgrup *pseudoobscura* fetes per Dobzhansky i col·laboradors (Ayala *et al.*, 1989). Actualment l'espècie està distribuïda per la costa oest de Nord-amèrica, des d'Ojai (Califòrnia) fins a la Colúmbia Britànica (Canadà)

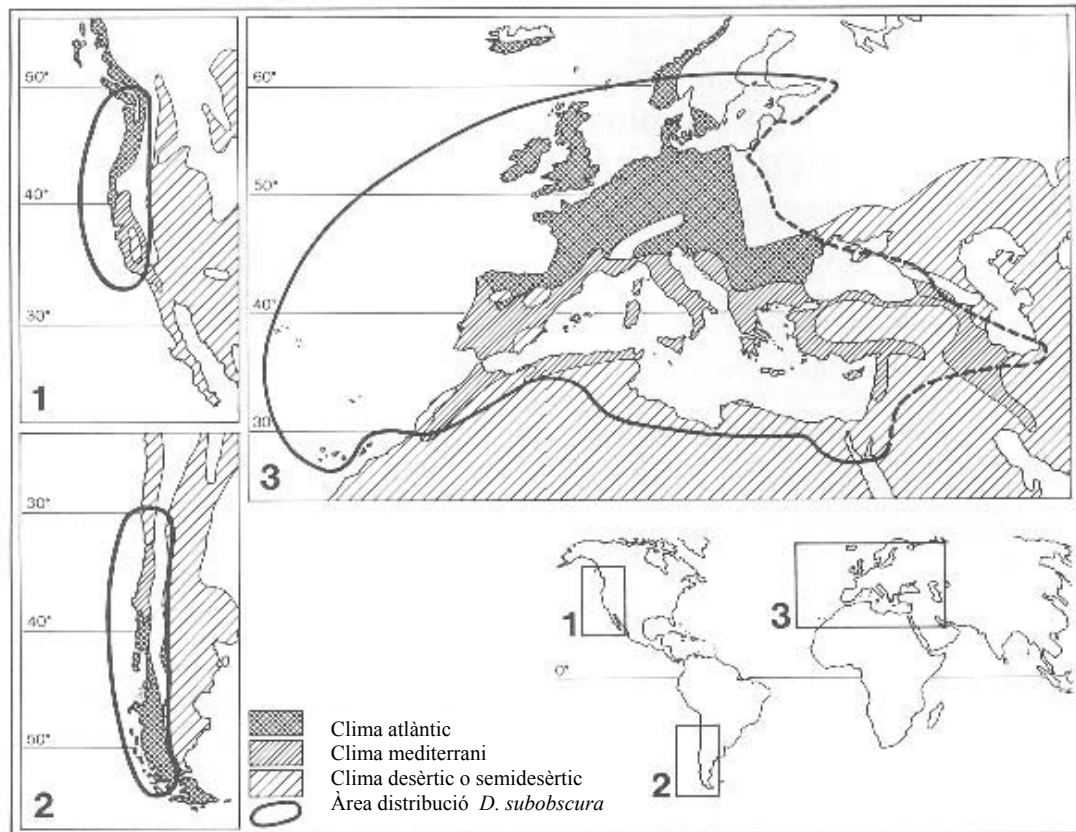


Figura 8. Mapa de les àrees colonitzades i de la regió paleàrtica amb l'àrea de distribució de *D. subobscura* i les condicions climàtiques en les tres zones.

(Prevosti *et al.*, 1989). També s'ha trobat recentment a l'estat de Utah (Noor *et al.*, 1998).

L'estudi d'aquest procés de colonització va representar una oportunitat única per entendre la dinàmica evolutiva d'aquesta espècie. Les àrees colonitzades tenen una situació geogràfica equivalent a ambdós hemisferis, i les condicions climàtiques són paral·leles a les de l'àrea de distribució a la regió paleàrtica (Prevosti *et al.*, 1988) (Figura 8). Aquest procés de colonització s'ha estudiat des del punt de vista tant biogeogràfic com ecològic i genètic (Brncic *et al.*, 1981; Prevosti *et al.*, 1983b, 1985, 1988, 1990; Beckenbach i Prevosti, 1986; Latorre *et al.*, 1986; Ayala *et al.*, 1989; Rozas *et al.*, 1990; Mestres *et al.*, 1990, 1992, 1995, 2001; Rozas i Agudé, 1991; Pascual *et al.*, 1993, 2001; Balanyà *et al.*, 1994; Solé *et al.*, 2000). La ràpida expansió de *D. subobscura* en les àrees colonitzades ha fet que sigui l'espècie més freqüent en algunes de les poblacions analitzades. En els estudis realitzats del

polimorfisme cromosòmic a Amèrica només es van detectar 20 ordenaments cromosòmics dels 85 presents a Europa. Alguns d'aquests ordenaments són molt freqüents a Europa, altres són més infreqüents o es troben només en determinades zones. El fet que a les poblacions nord-americanes i sud-americanes es trobin els mateixos ordenaments dona suport al fet que ambdós processos de colonització no són independents. A Amèrica han aparegut noves inversions, com és el cas de l'E₁₇ a les poblacions de Santiago de Xile i Chillán (Xile) (Prevosti *et al.*, 1985) o de l'E₁₈ a Eureka (California) (Pegueroles *et al.*, 1988), tot i que no s'han tornat a detectar en mostres posteriors. La hipòtesi més acceptada és que un nombre no massa gran d'individus d'Europa va arribar a Amèrica portant una mostra significativa dels ordenaments presents al Vell Continent. És per això que a Amèrica, a conseqüència d'aquest efecte fundador es troben només alguns dels ordenaments més freqüents a Europa. Aquest efecte també es fa palès quan s'estudien altres aspectes de la variabilitat genètica com els al·loenzims i els microsatèl·lits. Alguns estudis genètics basats en el polimorfisme enzimàtic mostren que a Amèrica es troben alguns dels al·lèls més freqüents a Europa, però no aquells molt poc freqüents (Balanyà *et al.*, 1994). Un fet similar té lloc amb els al·lèls dels *loci* microsatèl·lits a aquesta espècie. A Europa es troba un gran nombre d'al·lèls per cada *locus*, entre 18 i 36, en canvi, a Nord-amèrica el nombre oscil·la només de 4 a 8, és a dir, hi ha una clara reducció en el nombre d'al·lèls (Pascual *et al.*, 2001).

S'ha observat que en les poblacions colonitzadores la inversió O₅ presenta una associació completa amb un gen letal (Mestres *et al.*, 1990, 1992, 1995; Solé *et al.*, 2000). A més, les proves d'al·lèlismes indiquen que es tracta del mateix gen letal, la qual cosa reforça l'origen comú dels colonitzadors de Nord-amèrica i Sud-amèrica. Probablement un individu de la mostra de colonitzadors era portador d'una inversió O₅ amb el gen letal (Mestres i Serra, 1995). S'ha intentat esbrinar quina era la població europea d'origen buscant aquella que contingués una O₅ amb un letal al·lèlic amb el de les poblacions americanes. Fins ara no se n'ha trobat cap que compleixi aquesta condició; malgrat que s'han trobat inversions O₅ en algunes poblacions europees mostrejades, unes no eren portadores de cap gen letal, i d'altres portaven un letal que no era al·lèlic amb el de les O₅ americanes (Mestres *et al.*, 1992, Zivanovic i Mestres, 2000).

Tres anys després que *D. subobscura* es trobés per primera vegada a Sud-amèrica, i quatre anys després a Nord-amèrica, es va detectar la presència de clines latitudinals per alguns ordenaments cromosòmics a les poblacions americanes (Prevosti *et al.*, 1985, 1988). Aquestes clines latitudinals tenien el mateix sentit en les dues zones colonitzades i coincideixen amb les que s'havien observat a Europa. L'establiment de les mateixes clines en les dues regions colonitzades equivalents a les ja existents a Europa, recolza clarament la hipòtesi adaptativa de la formació d'aquestes clines.

4 Estudis de la variació temporal i altitudinal del polimorfisme cromosòmic

La variació geogràfica adaptativa podria estar relacionada amb diversos factors ambientals i ecològics, com per exemple la temperatura. Està força acceptat que les clines latitudinals pel polimorfisme cromosòmic són degudes a factors ambientals (Prevosti *et al.*, 1985, 1988, 1990; Menozzi i Krimbas, 1992). Les dades obtingudes per diversos autors (Burla i Götz, 1965; Fontdevila *et al.*, 1983; de Frutos i Prevosti, 1984; Burla *et al.*, 1986; Gosteli, 1990; Mestres *et al.*, 1994) mostren que el polimorfisme per inversions de *D. subobscura* varia considerablement al llarg del temps, tal i com s'esperaria en el cas d'un polimorfisme flexible, segons la definició de Dobzhansky (1962). Tanmateix, els canvis observats no segueixen un patró de variació estacional tan clar com l'observat en *D. pseudoobscura* (Wright i Dobzhansky, 1946) ni tampoc s'han detectat canvis en alguns casos, com per exemple en els estudis realitzats a la població de Viena, analitzada durant diversos anys, i on es va observar que no hi havia canvis estacionals cíclics per a les diverses ordenacions cromosòmiques (Kunze-Mühl *et al.*, 1958; Sperlich i Feuerbach, 1966). A *D. subobscura* és el patró de variació a llarg termini pel polimorfisme cromosòmic per inversions el que sembla presentar regularitats més remarcables i no pas la variació estacional, malgrat que hi ha pocs estudis dels canvis temporals a llarg termini de les freqüències d'inversions en aquesta espècie i els estudis fins al moment realitzats de la variació de les freqüències d'inversions a llarg termini s'han limitat a l'anàlisi d'una sola població o d'un sol cromosoma.

4.1 Estudis dels canvis estacionals del polimorfisme cromosòmic

Entre els estudis portats a terme en poblacions europees podem citar el de la població gallega de El Pedroso, on en analitzar el polimorfisme del cromosoma O durant 4 anys es va detectar que alguns ordenaments presentaven una certa estacionalitat (Fontdevila *et al.*, 1983). Per exemple, l'ordenament O_{3+4+7} presentava un augment durant l'estiu i, en canvi, una disminució de la seva freqüència a la tardor i a la primavera, contràriament al que es va detectar per l'ordenament O_{ST} . Posteriorment, dels anys 1988 al 1991 es va tornar a estudiar la variació estacional d'aquest polimorfisme pel cromosoma O (Rodríguez-Trelles *et al.* 1996, 1998; Rodríguez-Trelles i Rodríguez, 1998). En aquest estudi es va tornar a detectar l'estacionalitat d'alguns ordenaments com l' O_{3+4+7} i l' O_{ST} , en el mateix sentit que en el primer treball. Aquests canvis estan d'acord amb la distribució geogràfica clinal d'aquestes ordenacions. És a dir, O_{ST} , que és molt freqüent en poblacions del nord, presenta la mínima freqüència a l'estiu, mentre que O_{3+4+7} , típica de les poblacions del sud, té un màxim en aquesta època de l'any. Les freqüències d'aquests ordenaments presentaven també una forta associació amb la temperatura màxima diària i la humitat relativa com a mesures climàtiques.

Altres autors, de Frutos i Prevosti (1984), van analitzar i comparar diverses mostres obtingudes al llarg de l'any a la població de Barcelona. Aquests autors no van detectar variacions en les freqüències de les ordenacions cromosòmiques dels cromosomes A, E i O, però sí en les del J i U; els ordenaments J_1 i U_{1+2+8} presentaven ambdós un màxim els mesos de juny i febrer, i un mínim en el de setembre, però les dades eren insuficients per veure si seguien un model cíclic.

4.2 Estudis dels canvis del polimorfisme cromosòmic a curt termini

Pel que fa referència als estudis a curt termini, les poques dades disponibles no permeten extraure cap conclusió definitiva. Cal citar de nou l'estudi realitzat a la població de El Pedroso, ja que, com s'ha dit anteriorment, els autors van analitzar el polimorfisme primerament durant un període de 4 anys i posteriorment de 3 anys, i

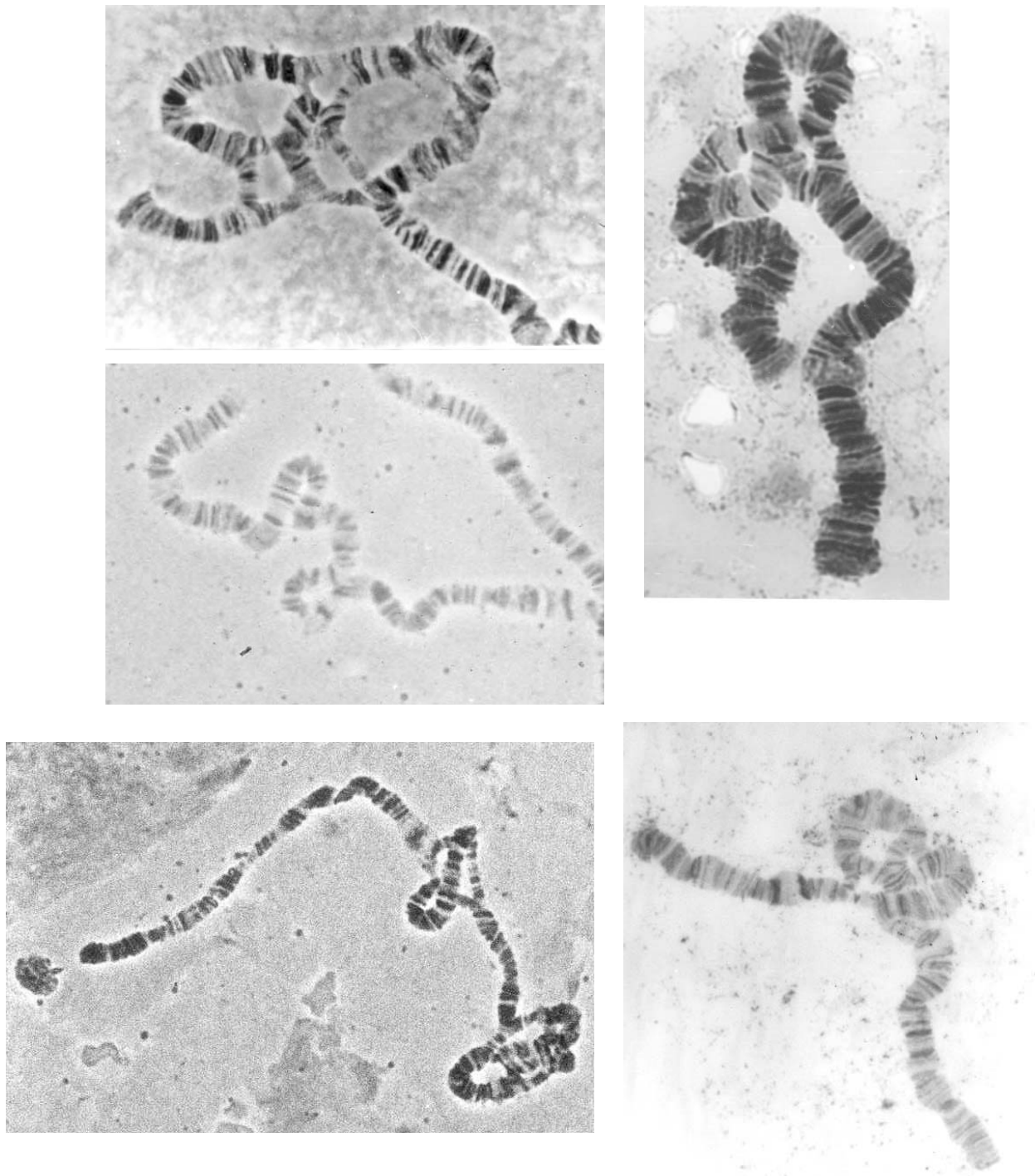


Figura 9. Imatges de diversos cromosomes i inversions: a la part superior esquerra el cromosoma U amb el cariotip U_{1+2+6}/U_{ST} , just a sota el cromosoma J amb el cariotip J_1/J_{ST} , a la part superior dreta el cromosoma A amb el cariotip A_2/A_{ST} , sota aquest el cromosoma E amb el cariotip E_{1+2+9}/E_{ST} i a l'esquerra el cromosoma O amb el cariotip O_5/O_{3+4} .

van observar una tendència a la disminució en la freqüència dels ordenaments O_{ST} i O_{3+4+8} i un augment de l'ordenament O_{3+4} (Fontdevila *et al.*, 1983; Rodríguez-Trelles *et al.*, 1996, 1998; Rodríguez-Trelles i Rodríguez, 1998). En el cas de les poblacions gregues de Mt. Parnes, Krimbas (1967) va estudiar els canvis en les freqüències d'alguns ordenaments durant dos anys consecutius. En el primer any es van detectar alguns canvis, malgrat que aquests no es corresponien amb el que s'esperaria segons les clines latitudinals trobades en aquesta espècie. En el segon any no es van detectar canvis.

4.3 Estudis dels canvis del polimorfisme cromosòmic a llarg termini

Els estudis dels canvis a llarg termini han donat uns resultats més consistents. Un dels primers estudis es va portar a terme amb una població propera a Zürich (Gosteli, 1990), tot comparant mostres obtingudes els anys 1986 i 1987 amb d'altres que ja havien estat analitzades amb anterioritat (1963, 1964 i 1984) per altres autors (Burla i Götz, 1965; Burla (no publicada)). L'autora conclou que hi ha diferències entre les mostres. Els ordenaments A_{ST} , J_{ST} , U_{ST} i O_{ST} disminueixen, mentre que J_1 , U_{1+2} , O_{3+4} i O_{3+4+8} augmenten.

En l'estudi de la població de El Pedroso (Fontdevila *et al.*, 1983; Rodríguez-Trelles *et al.*, 1996, 1998; Rodríguez-Trelles i Rodríguez, 1998) en comparar les dades obtingudes els anys 1976-1980 amb les dels anys 1988-1991 s'apreciava una certa disminució dels ordenaments O_{ST} i O_{3+4+8} , i un augment significatiu de l'ordenament O_{3+4} .

Orengo i Prevosti (1996) van analitzar els canvis en el polimorfisme cromosòmic de la població de Barcelona comparant 7 mostres recollides en un interval de 29 anys. Els resultats obtinguts mostraven que en general els ordenaments estàndard, típics de les poblacions del nord disminuïen, mentre que altres ordenaments més complexos, típics de les poblacions de més al sud, havien incrementat la seva freqüència. També es va detectar una certa correlació entre la temperatura i els ordenaments, que en algun cas era significativa. Aquests resultats

semblaven indicar que els canvis temporals en el polimorfisme cromosòmic de *D. subobscura* podien respondre a canvis climàtics.

4.4 Estudis de la variació del polimorfisme cromosòmic amb l'altitud

Altres autors van estudiar la possible variació del polimorfisme cromosòmic amb l'altitud. Martínez-Sebastián *et al.* (1984) van estudiar tres poblacions de la Sierra de Gúdar, a la província de Terol, situades a diferents altituds, i no detectaren diferències significatives entre elles pel que feia al polimorfisme cromosòmic, malgrat que hi havia clares diferències ecològiques i climàtiques entre les diferents localitats. Només Burla *et al.* (1986) van detectar diferències significatives en mostres capturades entre 600 i 1900 metres sobre el nivell del mar a la regió suïssa de Valais. Aquestes diferències afectaven sobretot el cromosoma J, el qual presentava una variació amb l'altitud que coincideix amb la variació latitudinal observada per aquest cromosoma. Un altre estudi en aquest mateix sentit va ser realitzat amb 4 poblacions d'una vall propera a Santiago de Xile entre l'agost i el setembre de 1985. Les poblacions analitzades es trobaven a alçades entre el nivell del mar i 1900 metres. En comparar el polimorfisme cromosòmic entre aquestes poblacions es van veure diferències significatives en els ordenaments E_{ST} , E_{1+2+9} , $E_{1+2+9+12}$, O_{3+4+2} , U_{ST} i U_{1+2} , malgrat que no es va observar una clina amb l'alçada, però sí que certs ordenaments seguien clines latitudinals (Brncic i Budnik, 1987).

Totes aquestes observacions, doncs, qüestionen el fet que el polimorfisme cromosòmic de *D. subobscura* es pugui considerar totalment com un polimorfisme rígid en el sentit establert per Dobzhansky (1962). Per tant, cal obtenir més dades amb poblacions situades en ambients suficientment diferenciats i durant un període més llarg de temps per tal d'extraure conclusions definitives. El que sembla clar, però, és que en el cas de *D. subobscura* no es detecta una resposta estacional d'aquest polimorfisme tan clara com per exemple a *D. pseudoobscura*. Aquesta propietat del polimorfisme de *D. subobscura*, per altra banda, el fa especialment adient com a possible marcador genètic d'aquells canvis ambientals que es donen de

manera gradual i en un sentit determinat en el decurs de períodes relativament llargs de temps.

5 Canvi climàtic

Actualment es disposa ja de moltes proves de l'impacte ecològic del recent canvi climàtic. Les respostes detectades abasten pràcticament tots els nivells d'organització de la flora i la fauna, i un conjunt molt ampli d'ecosistemes, des del nivell d'espècie fins al de les comunitats (Hughes, 2000; Walther *et al.*, 2002).

En els darrers 100 anys la temperatura del nostre planeta ha augmentat en 0,6°C; aquest canvi ha estat degut a un major augment de la temperatura mínima que de la temperatura màxima. També s'ha demostrat amb dades de satèl·lit que la neu i el gel del nostre planeta han disminuït un 10% des dels anys 60. Les precipitacions en canvi han estat poc uniformes i no presenten un patró en l'espai o el temps.

Els canvis més senzills de detectar en els ecosistemes degut al canvi climàtic han estat les variacions en les activitats estacionals que han sofert diversos organismes, entre els que podem destacar plantes, papallones i ocells (Brown *et al.*, 1999; Sillett *et al.*, 2000, Walther *et al.*, 2002). S'ha vist que alguns ocells crien més aviat, o fan el primer cant abans, o avancen la migració; algunes papallones apareixien abans i diverses plantes avancen la floració. Aquests són alguns exemples de com les activitats primaverals s'avancen. També s'han observat canvis a la tardor; així, les fulles d'alguns arbres triguen més a canviar de color, o alguns ocells endarrereixen la migració. Cal remarcar, però, que en diferents zones geogràfiques el comportament pot variar.

S'han realitzat estudis de l'impacte biològic que pot tenir el canvi climàtic basant-se en l'abundància d'espècies i la seva distribució (Parmesan, 1996; Brown *et al.*, 1999; Parmesan *et al.*, 1999; Thomas i Lennon, 1999). Les espècies migratòries presenten l'inconvenient que sovint la variació del lloc de cria en anys successius pot emascarar la variació deguda al canvi climàtic, i per això també s'han estudiat espècies sedentàries. Els ocells han estat molt estudiats, ja que es disposa de gran nombre de dades. S'ha vist que tot sovint l'àrea de distribució tendia a augmentar

cap els pols i en altitud però sovint ho feia de forma asimètrica. Els factors que afecten la distribució d'una espècie són diversos, i no es sorprenent que no s'hagi trobat una clara correlació amb la temperatura. Els desplaçaments de la zona de distribució poden provocar que una espècie ocupi una zona adjacent a la que tenia, i esdevingui un nou element en aquest biòtop. Sovint l'home té molt a veure en aquests canvis, doncs és ell qui altera l'ecosistema i qui introdueix i de vegades facilita la cria d'una espècie que no pertany a aquell ecosistema. Sovint calen canvis en les condicions locals per a que una nova espècie s'hi estableixi.

No és fàcil però establir la relació entre el canvi climàtic i els canvis en les comunitats o ecosistemes, ja que les relacions entre les diverses espècies d'una comunitat reflecteixen les interaccions entre els organismes i aquests amb l'ambient. S'esperaria que els canvis en l'ambient i els canvis climàtics afectessin la composició de la comunitat, però com l'afectaran depèn de la comunitat i del canvi; no és el mateix un augment de la temperatura de l'aigua de l'oceà d'1 o 2°C en els esculls i mars tropicals que en la zona de l'Antàrtida. La complexitat de les interaccions en els ecosistemes sovint fa difícil extrapolar els estudis individuals fins al nivell d'ecosistemes o comunitats (Walther *et al.*, 2002).

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball ha estat l'estudi dels canvis a llarg termini del polimorfisme cromosòmic per inversions de *Drosophila subobscura* en poblacions europees, i la seva possible relació amb el canvi climàtic global del planeta.

Com han demostrat els estudis de la colonització d'Amèrica per aquesta espècie, aquest polimorfisme es capaç d'adaptar-se ràpidament seguint un gradient latitudinal. Això va fer pensar que determinats factors ambientals podien tenir un paper molt destacat en els canvis observats en aquest polimorfisme al llarg del temps. Així doncs s'ha volgut comprovar si aquest polimorfisme es pot considerar un bon marcador genètic dels canvis ambientals en els ecosistemes tant d'origen natural com provocats per l'acció humana. Per assolir aquest objectiu general es van establir els següents objectius específics:

- Seleccionar un nombre representatiu de poblacions europees que ja haguessin sigut mostrejades com a mínim 15 anys enrera, i obtenir les mostres en la mateixa època de l'any i en la mateixa localitat.
- Determinar la composició i diversitat d'espècies del gènere *Drosophila* a les mostres obtingudes, per tal d'obtenir una estimació de la biodiversitat, que es pugui utilitzar en estudis posteriors.
- Caracteritzar les poblacions mitjançant les freqüències de les inversions o ordenaments existents en cada cromosoma.
- Per a cada població, comparar el polimorfisme cromosòmic actual amb el de les mostres obtingudes anteriorment en la mateixa població.
- Analitzar la variació en l'espai d'aquest polimorfisme comprovant l'existència de clines latitudinals en les mostres noves i comparar-les amb les de les mostres anteriors.

- Comprovar si a cada població ha disminuït la freqüència d'aquells ordenaments típics de latituds fredes i, de manera corresponent, si ha augmentat la freqüència d'aquells típics de les latituds càlides, a fi i efecte de relacionar aquests canvis amb el possible escalfament global del planeta.
- En d'altres estudis de la variació a llarg termini del polimorfisme cromosòmic de *D. subobscura*, s'ha considerat només el cromosoma O, o només una sola població. En aquest treball s'ha fixat també com a objectiu generalitzar aquest tipus d'anàlisi, considerant tots els cromosomes polimòrfics de l'espècie i un nombre de poblacions representatiu de la distribució de *D. subobscura* a Europa.