



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biologia

Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia

Unitat de Zoologia

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN MORFOLÓGICA EN UNA ZONA DE
POLIMORFISMO ROBERTSONIANO DE RATÓN DOMÉSTICO,
Mus musculus domesticus (Schwarz y Schwarz, 1943)

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología presentada por
Francesc Muñoz Muñoz.

Jacinto Ventura
Director de tesis

María José López
Codirectora de tesis

Francesc Muñoz
Doctorando

Bellaterra, abril de 2008

“Asoma entonces el demonio de la duda (...). Y el demonio de la duda muestra sus cuernos en la más letal de todas las preguntas: ¿será «esto» ciencia de la buena, o sólo especulación interesante con un barniz académico?”

JUAN LUÍS ARSUAGA. *El enigma de la esfinge.*

Capítulo 1. Introducción general.....	1
1.1. Variación cromosómica en el ratón doméstico.....	2
1.1.1. Variación cromosómica.....	2
1.1.1.1. Definición y clasificación.....	2
1.1.1.2. Variaciones cromosómicas estructurales: la translocación.....	3
1.1.1.3. Fusiones y disociaciones céntricas: translocaciones robertsonianas.....	3
1.1.2. El ratón doméstico: un modelo en el estudio de la variación cromosómica....	6
1.1.2.1. Taxonomía, evolución y distribución del género <i>Mus</i>	6
1.1.2.2. Variación cromosómica en <i>M. m. domesticus</i>	10
1.1.2.3. Mecanismos generadores de variación cromosómica en <i>M. m. domesticus</i>	14
1.1.2.4. Procesos evolutivos que dirigen la fijación de las nuevas reorganizaciones.....	17
1.1.2.5. Origen evolutivo de la variación cromosómica en <i>M. m. domesticus</i> ...	18
1.1.3. Interés de la variación cromosómica: especiación cromosómica.....	19
1.1.3.1. Modelos clásicos de especiación cromosómica.....	20
1.1.3.2. Modelos actuales de especiación cromosómica.....	23
1.2. Caracteres morfológicos y su aplicación en estudios evolutivos.....	25
1.2.1. Introducción.....	25
1.2.2. Caracteres no métricos.....	28
1.2.2.1. Definición y tipos de caracteres no métricos.....	28
1.2.2.2. Breve historia del estudio de los caracteres no métricos.....	31
1.2.2.3. Base genética de los caracteres no métricos.....	32
1.2.2.4. Variación no métrica y distancias poblacionales.....	35
1.2.3. Caracteres métricos: la mandíbula como modelo para el estudio del desarrollo y la evolución de estructuras morfológicas complejas.....	37
1.2.3.1. Introducción.....	37
1.2.3.2. Regiones morfogenéticas y musculatura mandibular.....	38
1.2.3.3. Embriología y desarrollo mandibular.....	42
1.2.3.4. Divergencia en la forma mandibular: origen y factores de variabilidad...	47
1.2.3.4.1. Factores genéticos intrínsecos.....	48
1.2.3.4.2. Factores epigenéticos.....	49

1.2.3.4.3. Efectos genéticos maternos.....	50
1.2.3.4.4. Factores ambientales.....	51
1.2.3.5. Base genética de la morfología mandibular.....	51
1.3. Área de estudio: zona de polimorfismo cromosómico Barcelona.....	58
1.3.1. Antecedentes históricos.....	58
1.3.2. Estructura poblacional.....	59
1.3.2.1. Situación geográfica.....	59
1.3.2.2. Diversidad cariotípica.....	60
1.3.2.3. Estructuración geográfica: variación clinal escalonada.....	61
1.3.3. Hipótesis sobre su origen.....	64
1.4. Objetivos del trabajo.....	66
Capítulo 2. Material y métodos generales.....	67
2.1. Muestra utilizada.....	68
2.1.1. Captura de los ejemplares, cariotipado y obtención del material óseo.....	68
2.1.2. Composición de la muestra.....	68
2.2. Caracteres empleados.....	70
2.2.1. Caracteres no métricos.....	70
2.2.2. Caracteres métricos: medidas mandibulares.....	74
2.3. Una fuente de variación no deseada: el error de medida.....	76
2.4. Corrección secuencial de Bonferroni.....	78
Capítulo 3. Efecto de la variación cromosómica en el polimorfismo morfológico.....	79
3.1. Introducción.....	80
3.2. Caracteres no métricos del cráneo y la mandíbula.....	85
3.2.1. Registro y análisis estadístico de los datos.....	85
3.2.1.1. Criterios de agrupación de la muestra.....	85
3.2.1.2. Análisis estadísticos previos: factores de variación.....	86
3.2.1.3. Análisis estadísticos previos: interdependencia entre caracteres y entre lados en caracteres bilaterales.....	87
3.2.1.4. Cálculos de frecuencias y distancias morfológicas.....	88
3.2.1.5. Comparación de matrices.....	92
3.2.2. Resultados.....	94
3.2.2.1. Análisis estadísticos previos.....	94

3.2.2.2. Frecuencias y distancias morfológicas.....	99
3.2.2.3. Análisis de los factores de aislamiento: distancia geográfica y variación cariotípica.....	103
3.3. Medidas mandibulares.....	106
3.3.1. Métodos.....	106
3.3.1.1. Agrupación de la muestra.....	106
3.3.1.2. Análisis estadísticos previos: normalidad, valores atípicos y factores de variación.....	106
3.3.1.3. Análisis estadísticos previos: el tamaño corporal.....	108
3.3.1.4. Obtención de distancias morfológicas y fenogramas.....	109
3.3.1.5. Análisis de los factores de aislamiento.....	110
3.3.2. Resultados.....	111
3.3.2.1. Análisis estadísticos previos.....	111
3.3.2.2. Análisis del tamaño.....	111
3.3.2.3. Distancias morfológicas y patrones de diferenciación.....	113
3.3.2.4. Análisis de los factores de aislamiento.....	119
3.4. Discusión de los resultados.....	125
Capítulo 4. Efecto de la variación cromosómica sobre la inestabilidad del desarrollo.....	135
4.1. Inestabilidad del desarrollo y asimetría fluctuante.....	136
4.2. Inestabilidad del desarrollo y zonas híbridas.....	139
4.3. Inestabilidad del desarrollo en caracteres no métricos.....	144
4.3.1. Métodos.....	144
4.3.1.1. Caracteres empleados y agrupación de la muestra.....	144
4.3.1.2. Pruebas estadísticas previas: detección de asimetría fluctuante y factores de variación.....	146
4.3.1.3. Comparación de los niveles de asimetría fluctuante.....	146
4.3.2. Resultados.....	149
4.3.2.1. Pruebas previas.....	149
4.3.2.2. Comparación de los niveles de asimetría fluctuante.....	152
4.4. Inestabilidad del desarrollo en medidas mandibulares.....	154
4.4.1. Métodos.....	154
4.4.1.1. Muestra, criterio de agrupación y error de medida.....	154

4.4.1.2. Pruebas estadísticas previas.....	154
4.4.1.3. Comparación de los niveles de asimetría fluctuante.....	155
4.4.1.4. Concordancia entre caracteres.....	157
4.4.2. Resultados.....	157
4.4.2.1. Análisis estadísticos previos.....	157
4.4.2.2. Niveles de asimetría fluctuante en rasgos y en regiones mandibulares...	158
4.4.2.3. Concordancia entre caracteres.....	164
4.5. Discusión de los resultados.....	167
Capítulo 5. Efecto de la variación cromosómica sobre los patrones de integración morfológica.....	173
5.1. Introducción a la integración fenotípica o morfológica.....	174
5.2. Integración morfológica de la mandíbula y polimorfismo cromosómico.....	176
5.3. Métodos.....	177
5.3.1. Caracteres y agrupación de la muestra.....	177
5.3.2. Obtención de matrices de correlación y varianza/covarianza.....	177
5.3.3. Integración morfológica y efectos de colinealidad.....	178
5.3.4. Variabilidad en las matrices de correlación y varianza/covarianza.....	181
5.3.5. Repetibilidad de las matrices.....	182
5.4. Resultados.....	184
5.4.1. Integración morfológica y efectos de colinealidad.....	184
5.4.2. Variabilidad en las matrices de correlación y varianza/covarianza.....	186
5.5. Discusión de los resultados.....	189
Discusión general.....	195
Conclusiones.....	203
Bibliografía.....	207
Apéndices.....	237
Agradecimientos.....	247

Capítulo 1. Introducción general.

1.1. Variación cromosómica en el ratón doméstico

1.1.1. Variación cromosómica

1.1.1.1. Definición y clasificación

Por norma general, la morfología y el número de cromosomas de los individuos de una misma especie, así como de las células de un mismo individuo, suele ser constante. No obstante, ya sea de forma espontánea o inducida, pueden producirse variaciones cromosómicas que afecten tanto a la estructura (variaciones cromosómicas estructurales) como al número (variaciones cromosómicas numéricas) de cromosomas. Las variaciones cromosómicas estructurales se han clasificado históricamente en cuatro tipos básicos: deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones (Lacadena 1996). Mientras que las deleciones y las duplicaciones afectan al número de genes y por tanto al tamaño del cromosoma, las inversiones y translocaciones representan cambios en la ordenación del material genético pero sin incremento ni disminución de su cantidad. Así, las deleciones son alteraciones cromosómicas en las que se da una pérdida de material genético; en cambio, en las duplicaciones hay un aumento en el número de genes debido a que un fragmento del cromosoma se replica más de una vez. Por otro lado, las inversiones son cambios cromosómicos estructurales en los que un fragmento del cromosoma cambia de orientación dentro del cromosoma, y las translocaciones son cambios de posición de fragmentos del cromosoma.

Las variaciones numéricas son básicamente de tres tipos: poliploidías, haploidías y aneuploidías. La poliploidía y la haploidía suponen cambios en el número de juegos cromosómicos completos. De este modo la poliploidía aparece cuando se da un aumento en el número de juegos cromosómicos, mientras que la haploidía representa la pérdida de la mitad de la dotación cromosómica, es decir, cuando las células de un organismo poseen la misma dotación cromosómica que los gametos del mismo. La aneuploidía por su lado implica variación en el número de cromosomas pero sin llegar a afectar a juegos cromosómicos enteros.

De todos los tipos de variaciones cromosómicas existentes, en el presente trabajo sólo se tratarán las translocaciones, en especial un tipo particular de estas, el cual se explicará en el apartado correspondiente (1.1.1.3.).

1.1.1.2. Variaciones cromosómicas estructurales: la translocación

La translocación es un cambio estructural en el que algún segmento del cromosoma cambia de posición relativa dentro del complemento cromosómico, modificando por tanto los grupos de ligamiento (Lacadena 1996). Teniendo en cuenta la nomenclatura propuesta por Rieger et al. (1991) las translocaciones pueden clasificarse en:

- Translocaciones internas o intracromosómicas: son un tipo de translocación en la que el segmento que cambia de posición lo hace dentro del propio cromosoma. Este tipo de translocaciones a su vez pueden dividirse en intraradiales o extraradiales, en función de si el cambio sucede dentro del mismo brazo cromosómico o entre los dos brazos de un mismo cromosoma, respectivamente. Este tipo de translocaciones pueden explicarse por una rotura del cromosoma en tres puntos distintos.

- Translocaciones intercromosómicas: cambio de posición de algún segmento que pasa a situarse en otro cromosoma. Son básicamente de dos tipos: transposición y translocación recíproca o intercambio. En la transposición un segmento de un cromosoma pasa a otro cromosoma. En la translocación recíproca se da un intercambio mutuo de segmentos entre dos cromosomas, que pueden ser homólogos o no. Las translocaciones recíprocas o intercambios pueden afectar a brazos cromosómicos enteros o casi enteros si se producen en sitios próximos a los centrómeros. Dentro de este tipo se encuentran las fusiones y disociaciones céntricas (Robertson 1916) y las fusiones en tándem (White 1957).

1.1.1.3. Fusiones y disociaciones céntricas: translocaciones Robertsonianas

El tipo de translocación que se encuentra más frecuentemente en el reino animal es la translocación Robertsoniana, denominada así en honor a su descubridor, W. R. B. Robertson (Robertson 1916). Dentro de los procesos de translocación Robertsoniana se incluyen esencialmente dos mecanismos contrapuestos, la fusión céntrica y la disociación o fisión céntrica (Figura 1-1). A su vez, el proceso de fusión céntrica puede darse por dos vías principales: i) por un lado, mediante la unión de dos cromosomas telocéntricos (con un único brazo cromosómico) por sus respectivos centrómeros, dando lugar a un único cromosoma metacéntrico (con dos brazos); ii) por otro, por la unión de dos cromosomas subtelocéntricos o acrocéntricos (un brazo significativamente más largo que el otro) que previamente han sufrido una ruptura en puntos próximos a los centrómeros (Figura 1-1).

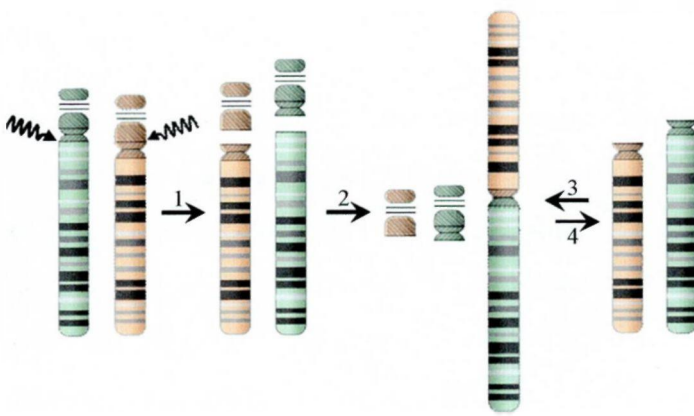


Figura 1-1. Proceso de translocación Robertsoniana. Las flechas 1 y 2 muestran el proceso de fusión céntrica de dos cromosomas acrocéntricos para formar un metacéntrico y dos pequeños fragmentos acéntricos que se perderán. El paso 3 ejemplifica la unión de dos telocéntricos para originar un metacéntrico. La flecha 4 muestra el proceso de fisión céntrica.

Si estos puntos de rotura se sitúan respectivamente en el brazo largo de uno de los cromosomas y en el brazo corto del otro se forman un cromosoma metacéntrico y un pequeño cromosoma que será eliminado. Ahora bien, si ambas fracturas sucediesen en sendos brazos largos probablemente la mutación no sería viable, ya que los fragmentos con la mayor parte de información genética (los brazos largos) quedarían sin centrómero, quedando los dos centrómeros unidos a los fragmentos cortos. En cambio, si los dos puntos de rotura se sitúan en los respectivos brazos cortos se forman un cromosoma dicéntrico (con dos centrómeros) y un pequeño fragmento acéntrico (sin centrómero) que será eliminado, de modo que se dice que la translocación recíproca es asimétrica. En este caso, la estabilidad mitótica y meiótica del cromosoma dicéntrico dependerán del grado de cooperación de ambos centrómeros (John y Freeman 1975), o bien de la inactivación funcional de uno de los dos centrómeros, de modo que el cromosoma dicéntrico se comporte en realidad como un monocéntrico (Therman et al. 1986). Aunque los mecanismos que originan estas translocaciones pueden variar de unas especies a otras (Britton-Davidian et al. 2005), se cree que los telómeros, al ser imprescindibles para mantener la estabilidad y la integridad de los cromosomas (Zakian 1997), desarrollan un importante papel en la formación de las mismas (Slijepcevic 1998). Así, por ejemplo, se ha observado que en las poblaciones naturales de ratón doméstico el telómero del brazo corto es eliminado como consecuencia de una rotura del cromosoma antes de la formación de la fusión (Garagna et al. 1995; Nanda et al. 1995). Además, también se ha visto que el acortamiento de los telómeros en la línea germinal provoca la pérdida del telómero y una elevada frecuencia de fusiones Robertsonianas en las células somáticas (Blasco et al. 1997). En la disociación céntrica sucede exactamente el proceso inverso que en la fusión céntrica, es decir, un cromosoma metacéntrico se escinde por el centrómero originando dos cromosomas telocéntricos (Figura 1-1).

Las fusiones céntricas pueden encontrarse en estado homocigoto o en estado heterocigoto (Figura 1-2). Si dos cromosomas homólogos están fusionados

respectivamente con otro par de cromosomas homólogos se dice que la fusión se encuentra

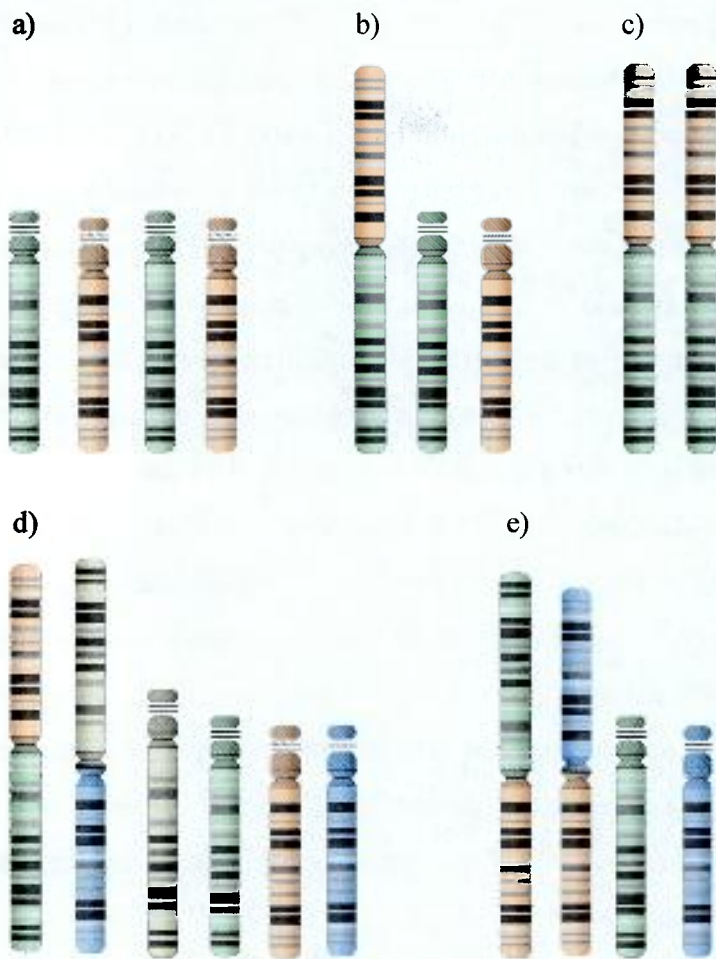


Figura 1-2. Distintos grados de heterocigosidad estructural según el número y el tipo de cromosomas metacéntricos: a) homocigoto acrocéntrico, b) heterocigoto simple, c) homocigoto metacéntrico, d) heterocigoto simple múltiple, e) heterocigoto complejo.

en estado homocigoto (Figura 1-2c), ahora bien, si de los dos pares de cromosomas homólogos un par de no homólogos está fusionado pero el otro no, se dice que la fusión está en estado heterocigoto (Figura 1-2b). A estos individuos se les denomina heterocigotos simples, y si tienen más de un metacéntrico en estado heterocigoto se les denomina heterocigotos simples múltiples (Figura 1-2d). También puede suceder que de un par de homólogos uno esté fusionado con un cromosoma y el otro con un tercer cromosoma distinto. En este caso hay dos metacéntricos distintos pero con uno de los brazos cromosómicos en común (Figura 1-2e); a este fenómeno se le denomina homología

monobraquial (Britton-Davidian et al. 2002), y el individuo portador se considera un heterocigoto complejo. Se le denomina así porque durante la meiosis se van a formar configuraciones muy elaboradas, tanto en forma de cadena como de anillo (Searle 1993). En el caso particular de *M. m. domesticus* se han descrito cadenas de hasta 13 cromosomas o anillos de 10 (Piálek et al. 2001).

Tal y como se ha visto, los procesos de translocación Robertsoniana se clasifican dentro de la categoría de cambios cromosómicos estructurales. A pesar de que pueden darse pérdidas de secuencias de ADN durante el proceso de fusión céntrica, como las detectadas en las regiones teloméricas y en el ADN satélite de los cromosomas metacéntricos de *Mus musculus domesticus* (Garagna et al. 1995), los cambios más evidentes en este tipo de variaciones cromosómicas son a nivel de reorganización del material genético. Es

cierto, sin embargo, que como consecuencia de la reorganización de los cromosomas, lo que se conoce como número diploide (simbolizado frecuentemente como $2n$) puede cambiar de unas especies a otras (Robertson 1916; White 1969) o incluso entre poblaciones de una misma especie (Capanna et al. 1976; Bauchau 1990; Searle 1993). Pero en realidad el número de brazos cromosómicos o número fundamental (Robertson 1916) se mantiene constante. Es decir, aunque el número de cromosomas varíe, este cambio es debido a una reorganización del material genético, y no a un verdadero aumento o disminución del número de cromosomas, que es lo que sucede en el caso de las aneuploidías. Robertson (1916), después de estudiar distintas familias del orden de los ortópteros (*Acrididae*, *Locustidae* y *Grillidae*), propuso la constancia del número fundamental en los grandes grupos taxonómicos. Esta hipótesis ha sido llamada ley de Robertson (Lacadena 1996) y se ha demostrado en los *Lacertidae* (Matthey 1949; Matthey 1951; Lacadena 1996), en los *Rodentia* (Matthey 1951; Yosida et al. 1974; Capanna et al. 1976), en el género *Drosophila* (White 1969), y en muchos otros grupos de animales, como moluscos, bóvidos, suidos, primates, etc. (Lacadena 1996).

Dentro de los mamíferos, dos de las especies en las que más se ha estudiado el polimorfismo cariotípico causado por procesos de translocación Robertsoniana son la musaraña bicolor o colicuadrada, *Sorex araneus*, y el ratón doméstico, *Mus musculus*, en concreto la subespecie *M. m. domesticus* (Searle 1993).

1.1.2. El ratón doméstico: un modelo en el estudio de la variación cromosómica

1.1.2.1. Taxonomía, evolución y distribución del género *Mus*

El género *Mus* (familia *Muridae*, subfamilia *Murinae*) abarca entre 30 y 40 especies de pequeños roedores terrestres de hábitos nocturnos cuya área de distribución natural se encuentra en Europa, África y Asia (Lundrigan et al. 2002). En la actualidad este género se divide en cuatro grandes taxones a los que se les suele dar categoría de subgénero, cada uno de los cuales presenta unos caracteres morfológicos, bioquímicos y cromosómicos diagnósticos: *Mus*, *Pyromys*, *Nannomys* y *Coelomys* (Musser y Carleton 1993; Lundrigan et al. 2002). El subgénero *Mus* es de lejos el más ampliamente estudiado, ya que contiene la especie comensal *Mus musculus* y otras especies utilizadas habitualmente en los estudios de laboratorio (Lundrigan et al. 2002; Chevret et al. 2005). Hasta hace poco este taxón constaba de nueve especies: *M. musculus*, *M. spretus*, *M.*

macedonicus, *M. spicilegus*, *M. cervicolor*, *M. cookii*, *M. caroli*, *M. dunni* (también llamado *M. terricolor*) y *M. booduga* (Musser y Carleton 1993); pero en los últimos años se han añadido *M. fragilicauda*, proveniente de Tailandia y de descripción reciente (Auffray et al. 2003), y *M. famulus* que previamente se incluía en el subgénero *Coelomys* (Chevret et al. 2003). El género *Mus*, y en particular el subgénero homónimo, han sido objeto de numerosos estudios filogenéticos (para revisión véase Berry y Scriven 2005; Tucker et al. 2005), los resultados de los cuales han sido resumidos por Guénet y Bonhomme (2003) en un árbol evolutivo sintético, en el que las coincidencias entre distintos datos han sido interpretadas como agrupaciones monofiléticas y las discordancias como politomías (Figura 1-3). Una de estas agrupaciones monofiléticas incluye el subgénero *Mus*, que comprende un clado paleártico y dos clados asiáticos. El clado paleártico incluye a *M.*

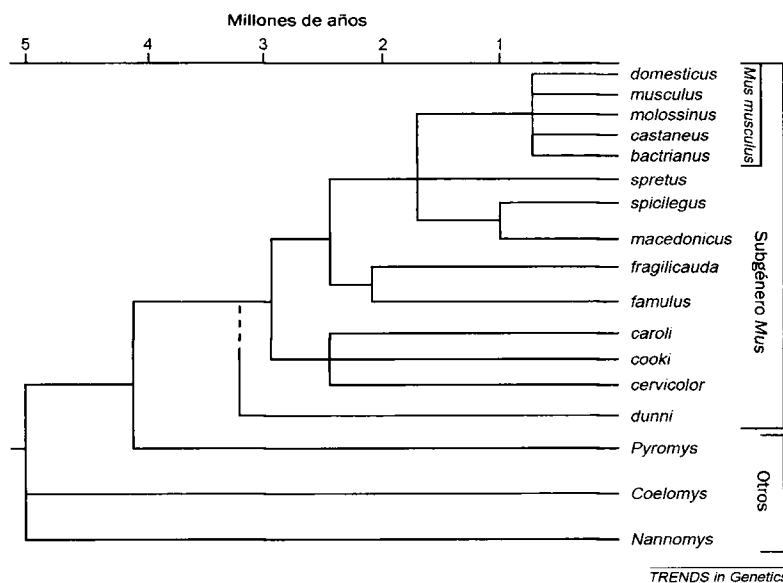


Figura 1-3. Árbol evolutivo del género *Mus*. En él se puede apreciar que el género emergió hace aproximadamente unos cinco millones de años y que la diversificación del subgénero *Mus* se dio tres millones de años atrás (modificado de Guénet y Bonhomme 2003).

segundo clado asiático, en las relaciones entre las especies paleárticas y entre las distintas subespecies de *M. musculus* (Tucker et al. 2005). Debido a sus hábitos vinculados al medio antrópico, el clado *musculus* es frecuentemente denominado “comensal” o ratón doméstico (*sensu lato*), en contraposición con las llamadas “especies aborígenes” (Berry y Scriven 2005), que no dependen ni han dependido nunca de la presencia humana para sobrevivir (Silver 1995).

Debido a la relativa homogeneidad morfológica de los ratones del género *Mus*, la sistemática del grupo ha resultado bastante confusa hasta tiempos recientes, pese a que la existencia de distintas variedades geográficas fue reconocida bastantes años atrás.

musculus y *M. spretus*, así como a dos taxones hermanos, *M. macedonicus* y *M. spicilegus*. Uno de los clados asiáticos incluye a *M. fragilicauda* y a *M. famulus* y se sitúa como grupo hermano del clado paleártico, mientras que el otro clado asiático incluye a *M. cervicolor*, *M. cookii* y *M. caroli*. Las politomías se encuentran en las relaciones entre las especies de este

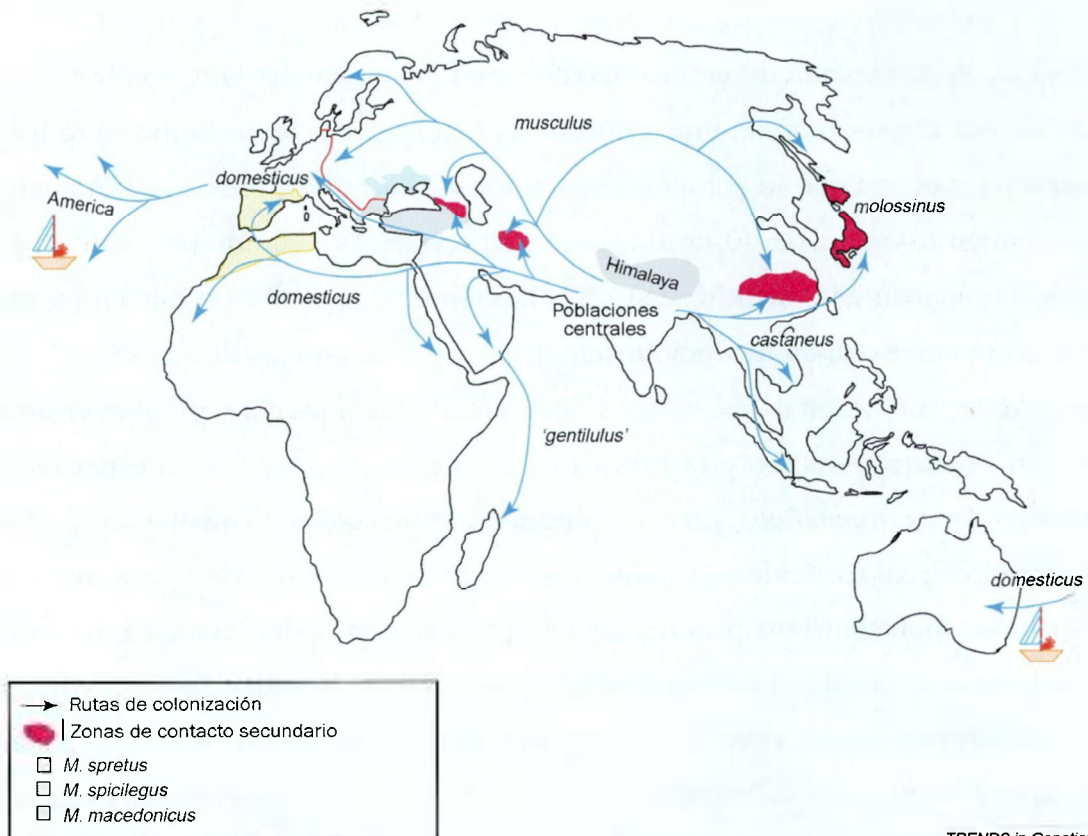
Precisamente, la gran diversidad geográfica ha sido la causa principal de que se hayan descrito más de 133 morfotipos distintos dentro del clado paleártico. Debido a la falta de consenso en las relaciones de parentesco entre los distintos morfotipos, su estatus taxonómico ha cambiado dependiendo de los autores y de la época. Así, mientras que algunos autores definían como razas o variedades locales ciertos morfotipos, otros los definían como subespecies o incluso como especies (Boursot et al. 1993). Si bien en la actualidad hay consenso en que los taxones de ratones “aborígenes” son específicamente diferentes de los comensales (Guénet y Bonhomme 2003), el estatus taxonómico de los grupos comensales sigue siendo motivo de desacuerdo. Así, mientras algunos autores los consideran como subespecies de *M. musculus*, otros se refieren a ellos como especies distintas (Berry y Scriven 2005). Mientras que los defensores del estatus subespecífico esgrimen que los taxones no están completamente aislados genéticamente y que por tanto existe introgresión (Thaler et al. 1981; Bonhomme y Guénet 1989), aquellos que los consideran especies verdaderas argumentan que a pesar de hibridar se mantienen diferenciadas, que la zona de hibridación es estrecha y la introgresión limitada (Berry y Scriven 2005). En una revisión publicada recientemente sobre el género *Mus* como modelo en estudios evolutivos, Berry y Scriven (2005) concluyen que el debate es primordialmente semántico, que los procesos de especiación dentro del taxón son dinámicos y por tanto complicados de encasillar, y que probablemente la mejor manera de describir la situación es considerando el complejo *musculus* como un círculo de razas¹ o como una especie politípica que se extendería desde las altas montañas del noroeste de la India y Afganistán hacia el oeste y entraría en contacto secundario en Europa (Bonhomme et al. 1994; Din et al. 1996; Guénet y Bonhomme 2003).

En la actualidad hay un consenso general en que el origen evolutivo de esta especie politípica se sitúa en el norte del subcontinente Indio, donde las poblaciones son muy diversas y presentan gran parte de la variabilidad genética existente en la especie (Bonhomme y Guénet 1989; Din et al. 1996; Boursot et al. 1996; Prager et al. 1998; Awasthi et al. 1998; Guénet y Bonhomme 2003; Gündüz et al. 2005). Precisamente esta gran variabilidad es uno de los factores que ha contribuido a que el estatus taxonómico de estas poblaciones centrales esté aún por determinar, y que consecuentemente se hayan propuesto distintas hipótesis (Boursot et al. 1993; Sage et al. 1993; Yonekawa et al. 1994).

¹ Traducción literal del término alemán *rassenkreis*, el cual ha sido traducido al inglés como *ring species* (especie en anillo). Este término se aplica a especies con áreas de distribución geográfica amplias y continuas en forma de anillo, en las que dos formas reproductivamente aisladas presentan un flujo genético mediante una cadena de poblaciones intermedias que se hibridan entre sí (Irwin et al. 2001). Dos ejemplos clásicos de especies en anillo son el de las gaviotas del género *Larus* y las salamandras del género *Ensatina*.

En un principio, a partir de la descripción genética de unos pocos ejemplares capturados en Kabul, se consideró que estas poblaciones centrales situadas entre Afganistán e Irán pertenecían a una nueva subespecie, la cual fue denominada *M. m. bactrianus* (Bonhomme et al. 1984). Sin embargo, en la actualidad se considera que hasta que no se conozca con mayor detalle la diversidad genética existente en la zona, los animales originarios de la misma no se pueden asignar a ningún taxón en particular (Awasthi et al. 1998).

Desde las poblaciones originarias el ratón doméstico (*sensu lato*) se extendió por todo el planeta acompañando a los humanos y originando distintos linajes (Figura 1-4). Los más representativos de los cuales son precisamente las tres subespecies de distribución más amplia y periférica: *M. m. domesticus*, común en el oeste de Europa, en África y en Oriente Próximo y transportada por los humanos a América, Australia (Auffray et al. 1990) y el continente Antártico (VanVuuren y Chown 2007); *M. m. musculus*, cuya área de distribución se extiende desde Europa del Este hasta Japón, pasando por Rusia y el norte de China; y *M. m. castaneus*, que se encuentra desde Sri Lanka al Sureste Asiático, incluyendo el archipiélago Indo-Malayo (Guénet y Bonhomme 2003).



TRENDS in Genetics

Figura 1-4. Distribución geográfica de las distintas especies del género *Mus* con las respectivas rutas de colonización desde las zonas de origen. Los ratones de los continentes Australiano y Americano fueron importados por los humanos durante la colonización (modificado de Guénet y Bonhomme 2003).

Ninguna de estas subespecies está completamente aislada genéticamente, por lo que en las regiones de contacto existen evidencias de intercambio de genes, que pueden ir desde la introgresión limitada a la hibridación total. Los casos mejor documentados de este intercambio genético son los que ocurren entre *M. m. musculus* y *M. m. domesticus*, a lo largo de una estrecha zona de hibridación en Europa, y entre *M. m. musculus* y *M. m. castaneus* en China y Japón. Precisamente en la isla nipona las dos subespecies han hibridado ampliamente, dando lugar a una población única a la que se le suele denominar *M. m. molossinus* (Yonekawa et al. 1988). Cabe destacar sin embargo, que la diversidad del grupo no está, ni mucho menos, enteramente esclarecida, por lo que en la actualidad siguen describiéndose nuevos linajes dentro de *M. musculus* (*sensu lato*). Este es el caso de las poblaciones estudiadas tanto en la Península Arábiga (Prager et al. 1998) como en Madagascar (Duplantier et al. 2002), las cuales han sido adscritas a un nuevo linaje mitocondrial al que se le ha dado categoría subespecífica y se le ha denominado *M. m. gentilulus*.

1.1.2.2. Variación cromosómica en *M. m. domesticus*

A pesar de la elevada diversidad existente en el subgénero *Mus*, lo cierto es que este grupo es, por norma general, muy conservador en lo que a su cariotipo se refiere. Así, la mayoría de especies que lo componen, incluida *M. musculus*, presentan un complemento cromosómico estándar de 40 cromosomas acrocéntricos (Figura 1-5) con un patrón de bandas G prácticamente idéntico en todas ellas (Boursot et al. 1993). Sin embargo, existen dos importantes excepciones por lo que a homogeneidad cariotípica se refiere, una de ellas es *M. terricolor*, en la que se han documentado fusiones e inversiones cromosómicas (Bardhan y Sharma 2000), y la otra es precisamente una de las subespecies del ratón doméstico, *M. m. domesticus*. En esta subespecie se ha detectado un elevado polimorfismo cariotípico, el cual es debido principalmente a la acumulación de uno a nueve pares de cromosomas metacéntricos producidos por procesos de fusión céntrica, lo que produce una reducción gradual del número diploide desde $2n = 40$ hasta $2n = 22$ (Boursot et al. 1993; Nachman y Searle 1995; Britton-Davidian et al. 2005). Aunque se ha documentado la presencia de metacéntricos en otros miembros del complejo *musculus* (Chakrabarti y Chakrabarti 1977; Moriwaki et al. 1984; Zima y Macholan 1989), la mayor parte de la variación cromosómica detectada en el grupo pertenece a *M. m. domesticus*.



Figura 1-5. Cariotipo estándar de *M. m. domesticus* teñido mediante la técnica de bandas G. El complemento diploide de las poblaciones estándar es de 40 cromosomas acrocéntricos, 19 pares de autosomas y el par de cromosomas sexuales. Los autosomas se ordenan de mayor a menor y se numeran del 1 al 19, siendo el 1 el cromosoma de mayor tamaño y el 19 el más pequeño. Cada cromosoma tiene su propio patrón de bandas, lo que permite su identificación (extraído de Silver 1995).

Aunque hasta hace pocos años se creía que el cromosoma 19, por su pequeño tamaño, no contribuía a la formación de metacéntricos (Nachman y Searle 1995; Hauffe y Piálek 1997), estudios recientes han documentado la presencia de este autosoma en tres fusiones diferentes, la Rb(2.19)² y la Rb(11.19) en Madeira (Britton-Davidian et al. 2000), y la Rb(4.19) en Bélgica (Auffray et al. 2001). Así, en *M. m. domesticus* todos los cromosomas, a excepción de los sexuales, participan de los procesos de translocación Robertsoniana (Piálek et al.

2005). Dado que los 19 autosomas están involucrados en la formación de metacéntricos, el número máximo esperado de fusiones posibles es de 171.

Hasta el momento, de estos 171 metacéntricos posibles se han descrito 103, o lo que es lo mismo el 60,2 % de las combinaciones existentes (Piálek et al. 2005). No obstante, cabe destacar que no todos los autosomas participan equitativamente de esta diversidad cromosómica, ya que los autosomas más pequeños tienden a fusionarse con menor frecuencia (Gazave et al. 2003). Así, por ejemplo el cromosoma 19 sólo se ha encontrado en tres de las 18 posibles combinaciones, mientras que otros cromosomas como son el 4, el 10 o el 11 se han encontrado en 14 de los 18 posibles metacéntricos que pueden formar (Piálek et al. 2005).

Habitualmente, los metacéntricos no aparecen ni en individuos ni en poblaciones aisladas, sino que suelen ir acompañados por otros metacéntricos, ocupando un área geográfica común y separados de otras regiones de polimorfismo cromosómico por poblaciones con cariotipo estándar de 40 cromosomas acrocéntricos, que son las más comunes (Boursot et al. 1993). Las poblaciones caracterizadas por una agrupación de metacéntricos localizadas en áreas geográficas restringidas han recibido distintos nombres,

² Esta nomenclatura se utiliza para designar los distintos metacéntricos. Cada par de números separados por un punto indica un metacéntrico distinto y hace referencia al par de acrocéntricos ancestrales que se fusionaron para dar el metacéntrico actual. Así, el metacéntrico Rb(2.19) se ha originado por fusión de los acrocéntricos 2 y 19.

pero debido a la inmensa diversidad de situaciones ha sido difícil englobar todos los casos bajo una nomenclatura única. Así por ejemplo, en estudios primerizos se habló de “sistema Robertsoniano” para hacer referencia a grupos de poblaciones metacéntricas con un origen evolutivo aparentemente común, siendo los criterios de agrupación los metacéntricos compartidos y la proximidad geográfica (Capanna et al. 1974). Posteriormente, en la literatura se ha hablado comúnmente de “raza cromosómica”³ (Boursot et al. 1993; Searle 1993; Nachman y Searle 1995), pero muchas de las poblaciones metacéntricas de ratón doméstico descritas no se ajustan a la rigurosa definición propuesta por Hausser y colaboradores (1994). Partiendo de esta problemática, recientemente se ha sugerido el término genérico de “población metacéntrica” para hacer referencia a agrupaciones geográficas de ratones que se caracterizan por poseer el mismo conjunto de cromosomas metacéntricos fijados o prácticamente fijados (Piálek et al. 2005). Sin embargo, no parece que ninguna de las opciones sea definitiva ni satisfactoria en todos los casos y en ciertas ocasiones puede llegar a ser confusa. Tomando como ejemplo el caso de la zona de estudio, en un principio fue considerada como un sistema robertsoniano formado por una única raza (Nachman y Searle 1995) y los híbridos entre esta y las poblaciones estándar (Gündüz et al. 2001). Sin embargo, hasta el momento ninguna de las poblaciones estudiadas en la zona se ajusta a la definición de raza cromosómica, lo que ha llevado a ciertos autores a sugerir la existencia de tres poblaciones metacéntricas distintas (Piálek et al. 2005). Estos cambios de nomenclatura pueden resultar confusos y pueden sugerir incrementos o decrementos en la diversidad cariotípica que no se corresponden con la descripción de nueva variación. Así por ejemplo, en el trabajo de Piálek et al. (2005) se describen un total de 97 poblaciones metacéntricas mientras que en la revisión anterior más reciente (Nachman y Searle 1995) se describen un total de 40 razas cromosómicas, menos de la mitad. Pero este cambio corresponde en gran medida al cambio de nomenclatura (menos restrictiva), y no tan sólo a la descripción de nuevas agrupaciones de metacéntricos en los años de diferencia entre ambas revisiones.

Sea cual sea la nomenclatura, lo cierto es que desde que se describiera la primera fusión, 38 años atrás (Gropp et al. 1969), la diversidad cariotípica conocida ha aumentado espectacularmente, aunque en los últimos años lo ha hecho a un ritmo más lento (Figura 1-6; Piálek et al. 2005). En la actualidad se identifican un total de once sistemas Robertsonianos, aunque no todos están completamente aislados geográficamente:

³ Una raza cromosómica Robertsoniana se ha definido como un grupo de poblaciones geográficamente contiguas o recientemente separadas que comparten por ascendencia el mismo conjunto de cromosomas metacéntricos y acrocéntricos en estado homocigoto (Hausser et al. 1994).

Escocia, Dinamarca, Croacia, España, centro y sur de Italia, Peloponesio, Grecia, Madeira, norte de Europa y norte de Suiza, norte de los Alpes, y sur de los Alpes. Además de estos sistemas existen también algunas poblaciones metacéntricas relativamente aisladas (por

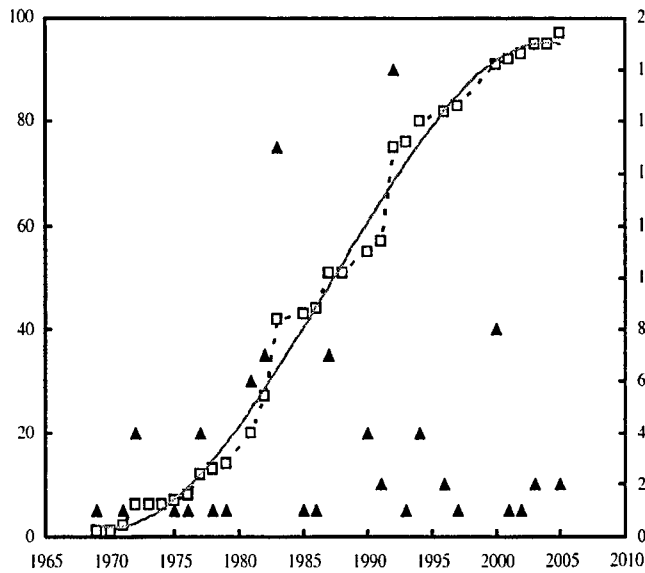


Figura 1-6. Número (escala derecha; triángulos) y frecuencia acumulada (escala izquierda; cuadrados) de poblaciones metacéntricas descritas desde 1969. La curva en forma de "S" muestra que el "boom" en la descripción de nuevas variaciones cromosómicas acaeció en la década de los 80 y desde entonces ha disminuido progresivamente (Piálek et al 2005).

ejemplo, en Túnez) que no pertenecen a ninguno de ellos (Piálek et al. 2005). La mayor parte de esta diversidad cariotípica se distribuye principalmente por Europa (Figura 1-7), especialmente en la zona de los Alpes y la región Mediterránea (Nachman y Searle 1995; Piálek et al. 2005), aunque también se han documentado algunas poblaciones metacéntricas en Madeira (Britton-Davidian et al. 2000), Túnez (Said et al. 1986), Turquía (Gündüz et al. 2000) y en la Isla Marion, en la Convergencia Antártica (Robinson 1978).

Aunque las distintas razas pueden compartir ciertos cromosomas metacéntricos, la mayoría presentan fusiones que no se encuentran en ningún otro lugar (Nachman y Searle 1995). A menudo, estas razas entran en contacto unas con otras o bien con la raza estándar y se reproducen formando zonas híbridas, las cuales son bastante abundantes. Algunas de estas zonas han sido fuente de numerosos estudios, en especial las que se encuentran en el norte de Italia (Hauffe y Searle 1993; Hauffe y Searle 1998), en el centro y sur de Italia (Spirito et al. 1980; Corti y Thorpe 1989), en Bélgica (Bauchau 1990), en Escocia (Searle

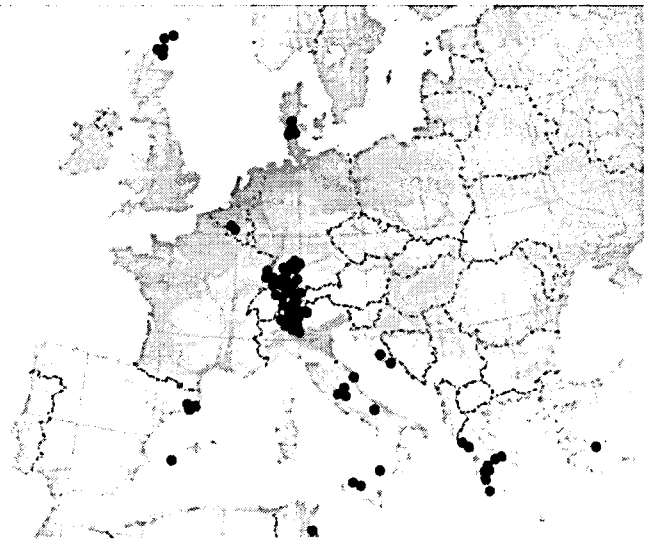


Figura 1-7. Mapa que muestra la localización de las poblaciones metacéntricas descritas en Piálek et al (2005). Obsérvese que la mayor parte de estas poblaciones se han descrito en la zona de los Alpes y la región Mediterránea.

1991), en Alemania (Adolph y Klein 1983), en Túnez (Said et al. 1986) y en Madeira (Britton-Davidian et al. 2000) entre otras.

Una zona híbrida se ha definido como una región geográfica relativamente estrecha en la que poblaciones diferenciadas genéticamente entran en contacto, se aparean y producen descendencia mixta (Barton y Hewitt 1985). Por extensión una zona híbrida cromosómica se define como una región geográfica en la que poblaciones diferenciadas cariotípicamente entran en contacto, se aparean y producen descendencia con un cariotipo mixto (Searle et al. 1993). Ahora bien, la diferenciación entre las poblaciones parentales puede haber aparecido en simpatria (se habla entonces de contacto primario), o bien en alopatria (contacto secundario; Barton y Hewitt 1985). A pesar de que conocer el origen de una zona híbrida es una tarea difícil (Barton y Hewitt 1985), las zonas de hibridación cromosómica se catalogan mayoritariamente como contactos primarios, ya que en general se considera que las razas cromosómicas de *M. m. domesticus* se han originado *in situ* (Britton-Davidian et al. 1989; Nachman et al. 1994) por una acumulación sucesiva de fusiones céntricas (Capanna 1982). Este hecho deja abierta la posibilidad que existan zonas en las que a pesar de haber aparecido cromosomas metacéntricos aún no se haya formado ninguna raza cromosómica. En estos casos hablar de zona híbrida no sería muy adecuado, ya que faltaría una de las poblaciones parentales, y por definición una zona híbrida necesita de la presencia de dos poblaciones diferenciadas. Por esta razón se ha propuesto utilizar el término de zona de polimorfismo Robertsoniano (Sans-Fuentes et al. 2005) para designar aquellas regiones donde a pesar de encontrarse cromosomas metacéntricos faltan evidencias para poder hablar de zona híbrida. De este modo, en aquellas regiones geográficas donde se observa un conjunto propio de metacéntricos pero no se ha descrito ninguna raza cromosómica distinta a la estándar se considera más apropiado hablar de población metacéntrica; y en las zonas de transición entre esta población y la raza estándar de zonas de polimorfismo Robertsoniano.

1.1.2.3. Mecanismos generadores de variación cromosómica en *M. m. domesticus*

Es sabido que las tasas de evolución cromosómica varían enormemente entre los distintos grupos de mamíferos y también que son particularmente elevadas en el grupo de los múridos (Bush et al. 1977; Searle 1993). De hecho, avances recientes en las técnicas de mapeo comparativo de los genomas han confirmado estas tasas diferenciales y han indicado que el linaje que ha dado lugar al ratón doméstico ha acumulado gran cantidad

de cambios cromosómicos, más del doble que el linaje humano por ejemplo (Burt et al. 1999). Sin embargo, el elevado polimorfismo cariotípico descrito en *M. m. domesticus* contrasta con el observado en la subespecie hermana, *M. m. musculus*, en la que prácticamente no se han detectado cambios cromosómicos (Nachman y Searle 1995). De hecho, el único caso descrito hasta el momento en *M. m. musculus* es el de tres individuos, uno homocigoto y dos heterocigotos, portadores de la fusión 5.12 que fueron capturados en Skalní Mlýn, en la República Checa (Zima y Macholan 1989). Este gran contraste entre ambas subespecies en las tasas de evolución cromosómica ha llevado a considerar el hecho que deban existir ciertas diferencias estructurales entre ellas que intervengan en los mecanismos de translocación. Aunque actualmente no se conocen con certeza cuales son estas diferencias, algunos estudios han postulado que las variaciones detectadas entre *M. m. musculus* y *M. m. domesticus* en la organización del ADN satélite centromérico podrían explicar tan notables discrepancias en la frecuencia de fusiones Robertsonianas entre ambos taxones (Redi et al. 1990).

Para poder entender la naturaleza de la variación cromosómica actual en *M. m. domesticus* debe distinguirse claramente lo que son los mecanismos generadores de nuevos cambios cromosómicos, los cuales se comentarán a continuación, de los procesos evolutivos que favorecen la fijación de las nuevas variantes en las poblaciones naturales, que se verán en el siguiente apartado. Hasta el momento tres han sido los mecanismos básicos que se considera que hayan podido introducir nuevos metacéntricos en las poblaciones de ratón: la fusión Robertsoniana, la translocación recíproca de brazos cromosómicos enteros, también conocida como WART⁴, y la “formación zonal de razas”⁵ (Searle 1993; Hauffe y Piálek 1997; Piálek et al. 2005). Mientras que los dos primeros procesos son generadores de nuevos metacéntricos, el tercero permite que metacéntricos formados por alguno de los dos procesos anteriores se establezcan en una población en la que no estaban gracias a la hibridación (Piálek et al. 2005). Un proceso adicional que podría aumentar la complejidad de la variación cromosómica en las poblaciones metacéntricas es la fisión céntrica, pero su papel parece ser mínimo (véase más abajo).

La formación de fusiones Robertsonianas implica o bien la pérdida del telómero, o bien la inactivación del mismo (Slijepcevic 1998). En el caso de *M. m. domesticus* se ha observado que el proceso de fusión se da tras una pérdida completa de los telómeros de los brazos cortos (proximales) de ambos acrocéntricos ocasionada por sendas roturas en secuencias de ADN satélite menor (Garagna et al. 1995; Nanda et al. 1995). En los

⁴ De la expresión inglesa *whole-arm reciprocal translocation*.

⁵ Conocido en la literatura anglosajona como *zonal raiation*.

metacéntricos así formados cada uno de los acrocéntricos contribuye de forma simétrica al ADN satélite menor de la nueva región centromérica única con un aporte de entre 10 y 30 kb (Garagna et al. 2001), de modo que el nuevo centrómero contiene un bloque de ADN satélite menor de 60 kb, en frente de las 365 kb de los acrocéntricos (Garagna et al. 2002). Lo que implica que se produce la pérdida de los telómeros proximales y de la mayor parte de las secuencias satélite menores de ambos cromosomas (Nanda et al. 1995). Estos datos revelan cual es la dirección de la evolución cromosómica en el ratón doméstico, del estado acrocéntrico al metacéntrico; ya que una vez dos cromosomas se han fusionado, la rotura del metacéntrico (fisión) en los dos acrocéntricos originales es poco probable debido a la dificultad de recuperar las secuencias teloméricas y de ADN satélite menor perdidas (Garagna et al. 1995), siendo ambas estructuras consideradas esenciales para la integridad y la segregación del cromosoma (Britton-Davidian et al. 2005). Sin embargo, en aquellas especies que las secuencias teloméricas persisten en las regiones centroméricas de las fusiones Robertsonianas el proceso de fisión es más probable, lo que a su vez sugiere que los mecanismos de formación de metacéntricos varían de unas especies a otras (Kasai et al. 2000; Castiglia et al. 2002; Ruiz-Herrera et al. 2002). En este sentido cabe destacar que nunca se han observado fisiones espontáneas en cepas de laboratorio de ratón doméstico (Corti et al. 1986), aunque sí se ha sugerido que puedan haberse dado en casos concretos en poblaciones salvajes (Hauffe y Searle 1993).

A diferencia de la fisión céntrica, un proceso que sí parece intervenir en la variabilidad cariotípica de *M. m. domesticus* es la translocación recíproca de brazos cromosómicos enteros. En la WART el intercambio de brazos cromosómicos se da tanto entre dos metacéntricos como entre un metacéntrico y un acrocéntrico, generando por tanto nuevos metacéntricos (Capanna y Redi 1995; Hauffe y Piálek 1997; Castiglia y Capanna 1999). Aunque la aparición espontánea de este tipo de mutación se ha observado en más de una ocasión en cruces realizados en el laboratorio con animales capturados en el medio natural (Catalan et al. 2000; Auffray et al. 2001), no se conoce exactamente cual es su importancia en el polimorfismo cariotípico de poblaciones naturales. Si bien es cierto que se han documentado animales capturados en poblaciones salvajes cuyos metacéntricos probablemente se hayan originado por este mecanismo de translocación (Capanna y Redi 1995; Castiglia y Capanna 1999). Además, trabajos recientes sobre filogenia de razas cromosómicas que habitan regiones con un elevado polimorfismo muestran que los modelos que incluyen las WART como posible mecanismo de evolución cariotípica son más parsimoniosos que los que sólo se basan en la fusión y la fisión céntrica; lo que

sugiere que estas translocaciones pueden haber tenido un papel importante en la diversificación cariotípica de estas poblaciones (Hauffe y Piálek 1997; Britton-Davidian et al. 2005).

La formación de nuevas combinaciones de metacéntricos mediante procesos de hibridación en el ratón doméstico fue propuesta por primera vez por Capanna (1982). Desde entonces ha quedado claro que la hibridación entre poblaciones diferenciadas cariotípicamente es bastante común en el ratón doméstico, y que potencialmente existe la posibilidad de que se generen nuevas combinaciones de metacéntricos en las zonas híbridas resultantes, proceso que se conoce como formación zonal de razas (Searle 1991; Hauffe y Pialek 1997; Piálek et al. 2005). Aparentemente algunas de las formas homocigotas que se encuentran en las zonas de contacto entre razas se han generado de este modo (Piálek et al. 2001; Hauffe et al. 2004).

1.1.2.4. Procesos evolutivos que dirigen la fijación de las nuevas reorganizaciones

Los mecanismos a los que se ha acudido para explicar la expansión y la posterior fijación de las nuevas fusiones Robertsonianas que aparecen en las demes⁶ de ratón han sido habitualmente insatisfactorios (Nachman y Searle 1995). Suponiendo que los heterocigotos Robertsonianos tienen una eficacia biológica menor es difícil imaginar mecanismos que se sobrepongan a esta desventaja y provoquen la fijación del estado homocigoto metacéntrico. La situación para los metacéntricos que aparecen mediante una WART es incluso peor, ya que el heterocigoto que se forma presenta configuraciones complejas, y en principio la disminución de eficacia biológica es incluso mayor que en los heterocigotos simples. Cuatro son los factores que podrían influir en la probabilidad de fijación de las nuevas variantes cromosómicas: la deriva génica, la endogamia, la ventaja selectiva de los individuos homocigotos para el cambio cromosómico de nueva aparición y la deriva meiótica (Nachman y Searle 1995; Piálek et al. 2005). Generalmente, los modelos teóricos postulan que a pesar de la disminución de eficacia los cambios cromosómicos pueden llegar a fijarse bajo ciertas condiciones restrictivas (Barton y Rouhani 1991). Aunque de los cuatro factores propuestos, teóricamente la deriva meiótica ha sido considerado el más potente en incrementar la fijación de los nuevos cambios (Hedrick 1981), lo cierto es que las evidencias empíricas distan de ser concluyentes respecto a la importancia de este factor (para revisión véase Piálek et al. 2005). Sin embargo,

⁶ Nombre que reciben las unidades sociales relativamente cerradas de *M. musculus* formadas por agrupaciones de individuos que se reproducen entre ellos (Reimer y Petras 1967).

es probable que unas elevadas tasas de mutación y la acción de la deriva genética en poblaciones pequeñas y aisladas sean suficiente para explicar la fijación de metacéntricos en poblaciones en las que no se originen heterocigotos complejos (Piálek et al. 2005).

1.1.2.5. Origen evolutivo de la variación cromosómica en *M. m. domesticus*

Después de observar la gran cantidad de variación cromosómica existente, como está organizada y cuales son los mecanismos moleculares que la originan y que intervienen en su fijación, a continuación se plantea la cuestión de la posible relación evolutiva que puede existir entre las distintas zonas de polimorfismo. Así, pese a que *M. m. domesticus* presenta una distribución cosmopolita, la mayoría de las variaciones cromosómicas descritas hasta el momento se encuentran en Europa Occidental, donde este animal llegó entre 5000 y 3000 años atrás proveniente de Oriente Medio (Auffray et al. 1990; Cucchi et al. 2005); aunque también se han descrito poblaciones metacéntricas en regiones alejadas donde llegarían más recientemente (Robinson 1978; Said et al. 1986; Britton-Davidian et al. 2000). Este escenario plantea la pregunta de si toda esta variación tiene un origen común o bien si es el resultado de múltiples eventos independientes de fusión céntrica. Por un lado, el hecho de que sistemas alejados presenten fusiones citológicamente indistinguibles hace pensar en un origen común, lo que plantea la duda de cuales han sido los procesos de aislamiento y diferenciación entre los distintos sistemas Robertsonianos; por el otro, si toda la variación existente ha aparecido de forma independiente esto implica una tasa de fijación de fusiones Robertsonianas para *M. m. domesticus* de, como mínimo, dos órdenes de magnitud superior a la de otros mamíferos (Nachman y Searle 1995).

Hasta el momento, se han postulado numerosas hipótesis acerca de las relaciones filogenéticas entre poblaciones metacéntricas. Un modelo bastante conocido que relaciona la variación cromosómica dentro de una misma región geográfica postula que la fijación de una o más fusiones dentro de un área puede originar una población metacéntrica primitiva que posteriormente al expandirse origina poblaciones metacéntricas que van acumulando nuevas fusiones en distintas partes del rango de distribución, dando lugar a poblaciones cariotípicamente diferenciadas (Capanna 1980). Sorprendentemente este modelo no ha sido verificado hasta el momento. La relación entre poblaciones metacéntricas de áreas geográficas distantes ha sido un tema más conflictivo y a la vez estudiado con mayor detalle (Tichy y Vucak 1987; Britton-Davidian et al. 1989; Bauchau 1990; Nachman et al. 1994). Básicamente se han propuesto dos hipótesis alternativas: (i) los sistemas Robertsonianos geográficamente aislados se han originado *in situ* de forma

independientemente unos de otros (Corti et al. 1986); (ii) considerando que las fusiones son eventos únicos, por lo que la probabilidad de que por azar ocurra la misma fusión es muy baja, y basándose en el intenso tráfico que habría promovido la migración de los ratones vía marítima en asociación con los humanos, especialmente en la costa Mediterránea, se ha argumentado que las fusiones se habrían originado en un número limitado de áreas desde las que se habrían extendido al resto de zonas en las que están presentes hoy en día (Tichy y Vucak 1987)

Mediante el estudio de la diversidad genética en 28 poblaciones distintas de ratón se ha sugerido que en general las poblaciones metacéntricas no comparten una composición genética que las diferencie de las poblaciones estándar, y que las poblaciones metacéntricas de una determinada región son genéticamente más similares a las poblaciones estándar circundantes que a poblaciones metacéntricas de otras regiones; lo que sugiere que las poblaciones metacéntricas geográficamente separadas han evolucionado *in situ* y tienen orígenes independientes (Britton-Davidian et al. 1989). Así, estos mismos autores sugieren la existencia de cuatro grupos independientes de variación cromosómica: poblaciones alemanas, italianas, españolas y escocesas. Los estudios realizados mediante técnicas de análisis de ADN mitocondrial también apuntan en esta dirección y sugieren que las poblaciones metacéntricas de distintas áreas geográficas tienen orígenes independientes; ya que al contrario de lo que se esperaría si tuviesen un origen común, no forman grupos monofiléticos, si no que tienden a agruparse con las poblaciones estándar circundantes (Nachman et al. 1994). En un estudio realizado más recientemente sobre el origen de una fusión ampliamente distribuida, la 5.15, se ha demostrado que esta se ha originado independientemente en España y en Italia. No obstante, en el centro y el norte de Italia el origen es común (Riginos y Nachman 1999). Por lo tanto, en *M. m. domesticus* ambas hipótesis alternativas son plausibles, y probablemente ambos procesos hayan actuado conjuntamente modelando la distribución actual de la variación cromosómica.

1.1.3. Interés de la variación cromosómica: especiación cromosómica

En la actualidad existen numerosos modelos de especiación, los cuales se clasifican principalmente en función de la importancia que tiene el aislamiento geográfico en la reducción de flujo genético entre las especies incipientes. Así bajo el criterio de la separación geográfica cuatro son los principales modelos de especiación: alopátrida, peripátrida, parapátrida y simpátrida (Figura 1-8). Mientras los dos primeros abogan por un aislamiento geográfico completo los dos últimos postulan que otros factores (p. ej.

ecológicos o cromosómicos) pueden constituir barreras de aislamiento sin que sea imprescindible una separación física que reduzca el flujo genético entre las poblaciones que se van a diferenciar.

Aunque el proceso de especiación alopátrida, es decir la formación de especies por la aparición de una barrera física extrínseca al organismo que evita el apareamiento entre poblaciones (Mayr 1942), es considerado el mecanismo más común de evolución, la importancia de los otros modelos sigue siendo aún hoy en día motivo de debate y



Figura 1-8. Esquema ilustrativo que muestra los cuatro principales modelos de especiación en función de la importancia del aislamiento geográfico. Superior, especiación alopátrida: se produce por aparición de una barrera geográfica que divide la población e impide el flujo genético entre las subpoblaciones; superior medio, especiación peripátrida: es un tipo particular de la anterior que sucede cuando una de las subpoblaciones está formada por pocos individuos; inferior medio, especiación parapátrida: se da en poblaciones continuas con amplias áreas de distribución en las que la reproducción no es al azar, si no que los individuos tienden a aparearse más frecuentemente con sus vecinos que con individuos más alejados de la misma población; inferior, especiación simpátrida: se da en poblaciones continuas, sin necesidad de una gran distancia geográfica para reducir el flujo genético, por aparición de un factor intrínseco que funciona de barrera.

desacuerdo en el seno de la comunidad científica. Dentro de estos modelos de especiación, uno de los más controvertidos ha sido el de especiación cromosómica. Desde hace años se ha observado que la mayoría de grupos de plantas y animales, incluso las especies más próximas taxonómicamente presenten diferencias en el cariotipo (King 1993). Esto junto con el hecho que los grupos con tasas más altas de cambios cromosómicos son también los grupos con tasas de especiación más elevadas (Levin y Wilson 1976; Bush et al. 1977), y que los individuos heterocigotos para estos cambios pueden sufrir una reducción de la fertilidad (White 1978a), ha llevado a sugerir que los cambios cromosómicos pueden jugar un cierto papel en los procesos de especiación (White 1969). Precisamente, estos procesos de especiación que se suponen debidos a cambios cromosómicos que funcionan como barreras al flujo genético entre poblaciones con distintos cariotipos son los llamados procesos de especiación cromosómica.

1.1.3.1. Modelos clásicos de especiación cromosómica

Entre las décadas de los 60 y 70, cuando el campo de la citología comparada de mamíferos se encontraba en pleno auge, algunos investigadores impulsaron la hipótesis

que las reorganizaciones cromosómicas estructurales -tales como inversiones, fusiones o fisiones- estaban directamente conectadas con la formación de especies (Patton 2004). Uno de los principales impulsores de esta idea fue el especialista en citogenética de ortópteros Michael J. D. White, quién con su libro "*Modes of speciation*" (White 1978a) situó a la citogenética comparativa en el centro del debate de los modelos de especiación (King 1993; Coyne y Orr 2004). A raíz del incremento del interés en este campo en pocos años aparecieron numerosos modelos de especiación cromosómica, muchos de los cuales están aún por verificar. Estos modelos, a los que agrupamos bajo la denominación de modelos clásicos, pese a que difieren en algunos detalles tienen en común una característica esencial, todos parten del supuesto que la barrera de aislamiento reproductivo entre poblaciones cariotípicamente distintas es la disminución de fertilidad que sufren los híbridos heterocigotos para los cambios cromosómicos (Rieseberg 2001). A pesar de que la esterilidad parcial de los heterocigotos parece un hecho plausible, ya que existen evidencias que las inversiones, las translocaciones y las fusiones en tándem en estado heterocigoto producen gametos con deficiencias (White 1978a), estos modelos no han tenido una aceptación general debido a que presentan una serie de deficiencias, tanto teóricas como empíricas (Coyne y Orr 1998). El problema teórico principal y más ampliamente conocido es el de la paradoja de la infertilidad híbrida. La paradoja es la siguiente: si la disminución de fertilidad que produce un cambio cromosómico en los heterocigotos es importante, es poco probable que este cambio cromosómico se establezca en la población, excepto en poblaciones pequeñas con un alto nivel de endogamia (Hedrick 1981). Si por el contrario, la disminución de fertilidad es lo bastante débil como para permitir la fijación del cambio cromosómico, esto querrá decir que como barrera al flujo genético esta reorganización será poco eficiente y por tanto poco probable que participe en procesos de diferenciación. Además, estos problemas asociados a la fijación de cambios cromosómicos que producen poca disminución de fertilidad se ven incrementados en simpatria, donde existe un flujo genético. Por esta razón no es de extrañar que la mayoría de modelos clásicos de especiación cromosómica asuman cierto grado de aislamiento geográfico (Rieseberg 2001). A estas dificultades de tipo teórico se debe añadir el hecho demostrado experimentalmente que muchos de los cambios cromosómicos tienen un efecto poco pronunciado sobre la fertilidad (Sites y Moritz 1987).

Como resultado de este complicado panorama al que se enfrenta la variación cromosómica como motor del proceso evolutivo, en los últimos 50 años se han publicado multitud de modelos de especiación basados en la infertilidad híbrida que intentan recrear

las condiciones necesarias para que poblaciones que divergen en su cariotipo puedan llegar a diferenciarse. Algunos de los más destacados modelos de especiación cromosómica se resumen a continuación:

Modelo en cadena o cascada: asume que el aislamiento reproductivo aparece como resultado de la acumulación de cambios cromosómicos que individualmente tienen un efecto poco pronunciado sobre la fertilidad (White 1978a).

Modelo de transiliencia o revolución cromosómica: sugiere que una reorganización cromosómica que provoque una fuerte disminución de fertilidad se puede fijar gracias a la deriva genética y a la endogamia en poblaciones aisladas (Templeton 1981).

Modelo de fusión monobraquial: propone que en poblaciones aisladas aparecen de forma independiente diferentes fusiones, algunas de las cuales comparten uno de los brazos cromosómicos. Mientras que en las poblaciones originales estas fusiones en heterocigosis no producirían ninguna disminución de fertilidad, o bien una disminución muy baja, en los híbridos entre las distintas poblaciones provocarían pérdidas importantes de fertilidad debido a la formación de complejas configuraciones meióticas (Baker y Bickham 1986).

Modelo recombinacional: describe un proceso en el que la hibridación entre dos poblaciones cromosómicamente divergentes lleva a la rotura del cromosoma y a la discriminación de las reorganizaciones preexistentes que diferencian las especies parentales. De este modo, si la divergencia cariotípica del nuevo recombinante respecto a ambas especies parentales es suficiente y se produce aislamiento reproductivo, el nuevo genotipo recombinante podría llegar a establecerse (Grant 1981).

Modelo de especiación cuántica: sugiere que las reorganizaciones cromosómicas pueden fijarse rápidamente en una población fundadora periférica mediante la deriva genética y la endogamia, dando lugar a un aislamiento reproductivo. Este modelo es similar al modelo de transiliencia cromosómica excepto en el hecho que la nueva organización de genes resultante del cambio cariotípico se supone adaptativa (Grant 1981).

Modelo estaspátrico: asume que una reorganización cromosómica con un efecto muy negativo sobre la fertilidad puede aparecer y fijarse en una población de pequeño tamaño que se encuentre dentro del área de distribución de la especie progenitora gracias a la deriva meiótica (White 1978a).

Modelo saltacional: este modelo propone que en poblaciones fundadoras periféricas la endogamia puede provocar una rotura del cromosoma. Sin embargo, como en la mayoría de los modelos restantes, las reorganizaciones cromosómicas que posteriormente funcionarán de barreras de aislamiento, se fijan en poblaciones pequeñas y consanguíneas

gracias a la deriva (Lewis 1966).

1.1.3.2. Modelos actuales de especiación cromosómica

A pesar de los indicios que parecen existir sobre la posible implicación de los cambios cromosómicos en la diferenciación entre especies, la teoría de especiación cromosómica ha tenido muchos detractores por el hecho que los modelos clásicos no han sabido librarse definitivamente del lastre que supone la paradoja de la infertilidad híbrida. De hecho, el punto de vista más ampliamente aceptado es que la acumulación de cambios cromosómicos es meramente incidental y paralela al proceso de especiación. Sin embargo, en los últimos años han aparecido una serie de modelos de especiación cromosómica que han revitalizado esta teoría (Noor et al. 2001; Rieseberg 2001; Ortiz-Barrientos et al. 2002; Navarro y Barton 2003a). Estos modelos argumentan que las reorganizaciones cromosómicas actuarían como barreras genéticas fuertes porque reducen la recombinación en los híbridos e incrementan los efectos de los genes de aislamiento ligados, más que porque produzcan una pérdida de fertilidad en los híbridos heterocigotos. Así pues, la disminución de recombinación en las regiones cromosómicas afectadas por las reorganizaciones funciona como barrera, evitando el flujo de los genes que se encuentran en estas regiones. La expansión de genes favorables que se encuentren en las regiones cromosómicas bajo la influencia de una reorganización se ve así limitada, incrementando el tiempo de fijación. Esto permite que alelos diferentes tengan tiempo suficiente para fijarse en distintas zonas geográficas dentro del área de distribución de la especie. Si estos alelos que se fijan en regiones geográficas diferentes son incompatibles entre ellos, a pesar de que sus distribuciones entren posteriormente en contacto es de esperar que no se encuentren juntos en un mismo individuo (o que se encuentren con una frecuencia menor a la esperada), reforzando así el aislamiento reproductivo (Navarro y Barton 2003b).

Estos modelos se ven sustentados por tres líneas principales de evidencias experimentales. En primer lugar, en muchos casos se ha visto que las zonas del cromosoma que se encuentran bajo el efecto de reorganizaciones estructurales sufren una disminución de la recombinación (Hale 1986; Davisson y Akeson 1993). En segundo lugar, mientras que ciertos genes cuantitativos asociados con el aislamiento tienen un pequeño efecto sobre las tasas de introgresión de ciertos marcadores genéticos, las reorganizaciones cromosómicas tienden a provocar la supresión de la introgresión de grandes bloques de

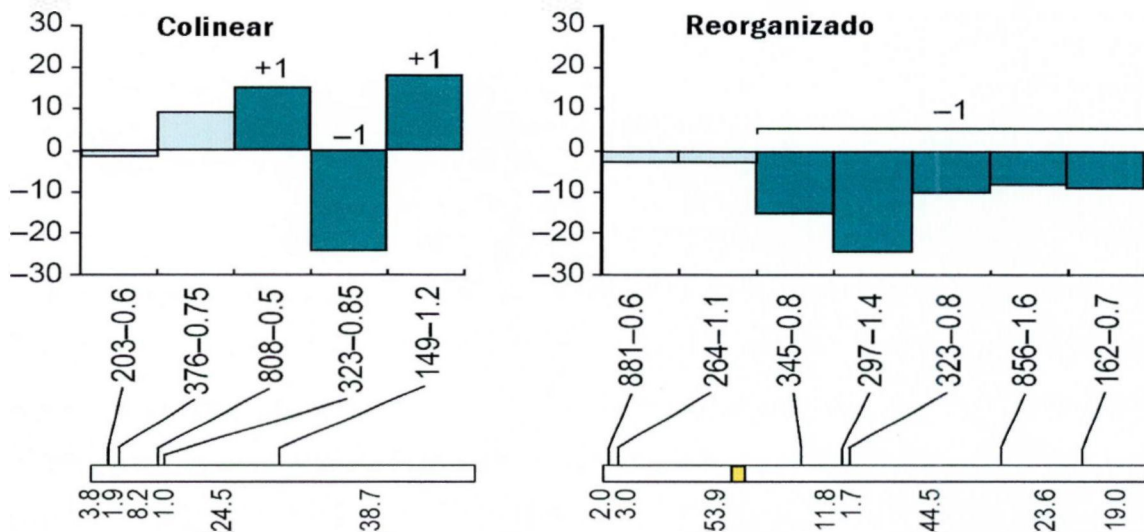


Figura 1-9. Gráficos que muestran la desviación en el número de marcadores de introgresión en tres zonas híbridas entre *Helianthus annuus* y *H. petiolaris*. En el eje de las x la numeración superior indica los marcadores moleculares mapeados y la numeración inferior la distancia entre los distintos grupos de ligamento. Los bloques cromosómicos seleccionados independientemente se indican con un +1 o un -1, dependiendo de la dirección de selección. Véase que en las regiones colineares (gráfico de la izquierda) incluso los marcadores moleculares próximos introgresan a tasas muy distintas, pero en cambio en las regiones con reorganizaciones (gráfico de la derecha) un bloque de introgresión muy amplio se comporta como una sola unidad debido a las bajas tasas de recombinación. Verde oscuro, significativo; verde claro, no significativo; amarillo, punto de rotura de la translocación (modificado de Rieseberg 2001).

ligamiento (Figura 1-9; Rieseberg 2001). Y por último, los cromosomas con reorganizaciones estructurales presentan tasas de evolución proteica mucho más elevadas que los cromosomas sin reorganizaciones (Figura 1-10; Navarro y Barton 2003b). No

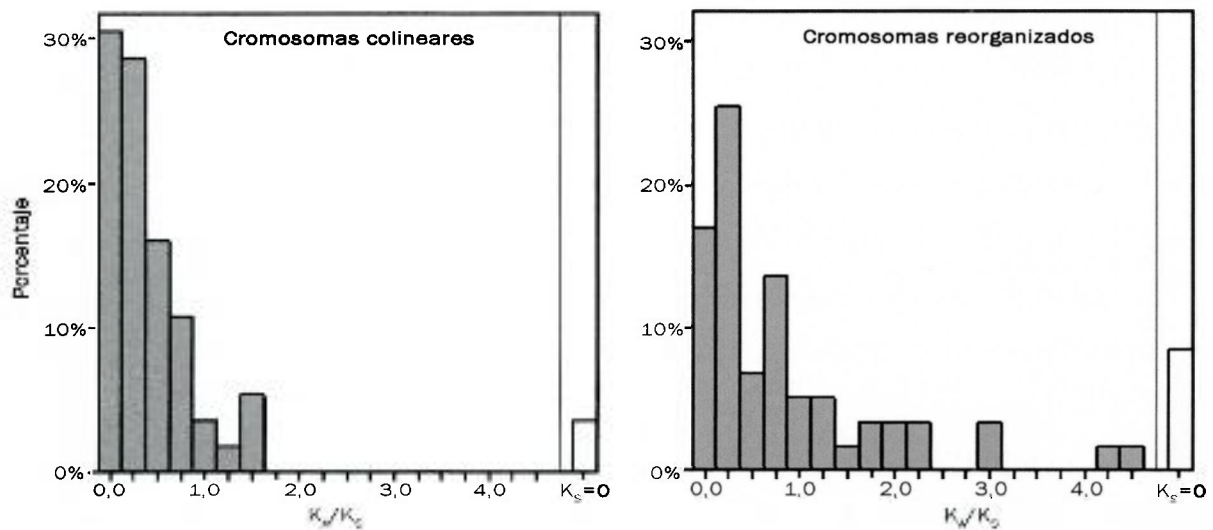


Figura 1-10. Distribución de los valores de las tasas de evolución proteica (K_A/K_S) entre los humanos y el chimpancé en cromosomas colineares y reorganizados. La tasa de evolución proteica se calcula como la razón entre la sustitución nucleotídica no sinónima por sitio no sinónimo (K_A) relativa a la tasa de mutación neutra subyacente, dada por la tasa de sustitución sinónima por sitio sinónimo (K_S). Los cambios aminoacídicos son habitualmente deletéreos debido a la acción de la selección purificadora, por lo que $K_A \ll K_S$, y por tanto K_A/K_S presentará valores habitualmente menores que 1. Sin embargo, si la selección positiva es suficientemente fuerte K_A puede aumentar e incluso exceder a K_S . Así tasas de K_A/K_S superiores a 1 sugieren una selección positiva. En los cromosomas reorganizados (gráfico de la derecha) la frecuencia de valores de K_A/K_S mayores que 1 es significativamente superior que en los cromosomas colineares (gráfico de la izquierda), en los que no ha habido reorganización cromosómica (modificado de Navarro y Barton 2003b).

sólo esto, si no que dentro de los cromosomas con reorganizaciones se ha detectado la tendencia a que los genes situados en las regiones modificadas presenten tasas de evolución proteica más altas que los genes que se encuentran fuera de estas regiones (Navarro y Barton 2003b).

1.2. Caracteres morfológicos y su aplicación en estudios evolutivos

1.2.1. Introducción

La morfología se define en términos generales como la rama de la biología que estudia la forma de los organismos y las transformaciones que ésta experimenta. Dentro de la biología muchas disciplinas necesitan abordar la variación morfológica de manera cuantitativa y rigurosa, ya sea con el objetivo de probar teorías o bien con fines más prácticos. Además, caracterizar de manera cuantitativa y rigurosa la variación fenotípica tiene múltiples ventajas. De este modo, la descripción cuantitativa es más objetiva que la cualitativa, lo que hace los resultados más fácilmente reproducibles y verificables. Adicionalmente, los métodos cuantitativos presentan un mayor poder a la hora de detectar diferencias sutiles en comparación con la simple inspección cualitativa de los datos. Estas pequeñas diferencias pueden ser relevantes desde un punto de vista biológico, por lo que disponer de métodos que detecten y describan esta variación es sumamente importante. Aunque la mayoría de los estudios biológicos que han empleado tradicionalmente la morfología se han llevado a cabo en los campos de la sistemática, la biología evolutiva y la antropología física, las aplicaciones de esta disciplina son cada vez más amplias y el número de estudios que se sirven de ella ha crecido considerablemente en campos tan diversos como pueden ser la ecología, la genética o la biología del desarrollo.

Aunque el estudio de la variación fenotípica, especialmente de la morfología comparada, se erigió como piedra angular en los trabajos de biología evolutiva desde que se estableciera la teoría darwinista, tras el descubrimiento de la base molecular de la variación heredable los estudios morfológicos empezaron a considerarse anticuados e irrelevantes ante el propósito de arrojar nuevos datos y teorías en esta área de conocimiento. Adicionalmente, la no coincidencia entre datos morfológicos y moleculares en ciertos estudios filogenéticos ha contribuido y sigue contribuyendo a crear un clima de debate que ha enfrentado a menudo a especialistas de ambas disciplinas. Debate en el que los defensores de los estudios moleculares han reclamado con más fuerza y ahínco la hegemonía de estos sobre los morfológicos (Benton 1999). De modo que las

reivindicaciones han ido desde la simple preferencia por los datos moleculares a la convicción que los estudios morfológicos deben rechazarse sin más si entran en conflicto con los datos moleculares (Goodman 1989). Por el contrario, aunque es difícil encontrar estudios morfológicos que realicen sentencias tan categóricas sobre el valor de los caracteres moleculares (Benton 1999), a menudo se ha defendido la utilidad de los datos morfológicos en el estudio de la evolución como respuesta a tan duras críticas (Doyle 1998; Smith 1998).

En la actualidad la experiencia y las pruebas existentes no apoyan en absoluto el rechazo de las evidencias morfológicas en el estudio de la evolución. Los caracteres morfológicos son distintos y no necesariamente dependientes de los moleculares, pueden estudiarse en organismos extintos, están sujetos a selección natural y pueden definir puntos de divergencia en los árboles filogenéticos, gran cantidad de ellos pueden registrarse rápida, fácil y económicamente mediante la simple observación directa de especímenes vivos o muertos, existen pocos límites en los niveles de detalle en los que pueden obtenerse y además pueden mostrar variación tanto poblacional como interespecífica (Benton 1999). Los datos morfológicos distan, obviamente, de ser perfectos. Las disputas sobre la interpretación y la codificación de los caracteres, y la falta de congruencia entre ciertos estudios así lo demuestran. Pero tampoco son perfectos los datos moleculares, y los problemas que estos presentan son frecuentemente comparables a los que deben hacer frente los morfólogos (Goodman et al. 1987; McKenna 1987; Benton 1999).

Una de las razones por las que los caracteres morfológicos han sido menospreciados como marcadores genéticos es porqué al tratarse de variables fenotípicas su expresión depende del ambiente. Considerando el modelo infinitesimal de Fisher la variación fenotípica consta de dos componentes, la variación genética y la variación ambiental (Falconer y Mackay 1996):

$$V_f = V_g + V_a$$

donde V_f es la variación fenotípica, V_g la variación debida al efecto genético y V_a la variación debida al efecto ambiental. De este modo, la variación observable en un carácter fenotípico cualquiera puede ser debida a factores no heredables (lo que se conoce genéricamente como ambiente). Sin embargo, si se tiene en cuenta que las evidencias acumuladas hasta el momento demuestran que la variación morfológica depende en menor o mayor medida de la variación genética (Rogers et al. 1999), y considerando la ecuación anterior, es obvio que la variación fenotípica debe ser proporcional a la variación genética. De hecho, una vez establecida la relación entre fenotipo, genotipo y ambiente, la pregunta

que debe formularse es si los cambios ambientales actúan siempre en la misma dirección, de tal modo que las diferencias genéticas iniciales que puedan existir entre dos poblaciones se vean significativamente sesgadas en la dirección del cambio ambiental (González-José 2003). Si se asume que la varianza ambiental es aleatoria respecto a las unidades de estudio, entonces una heredabilidad baja simplemente querrá decir que existe un considerable nivel de “ruido” en el análisis (Buikstra et al. 1990; Cheverud 1996a; Cheverud 1996b; Relethford 2002; González-José et al. 2004). Hay que tener en cuenta, también, que la mayor parte de caracteres morfométricos son de naturaleza poligénica, es decir, que están codificados por numerosos genes, de modo que las presiones selectivas que actúan sobre un determinado carácter se distribuyen entre un grupo numeroso de *loci*, lo que provoca que los efectos de estas fuerzas en un *locus* concreto sean generalmente menos importantes que la propia deriva genética (Pertoldi et al. 2006). Precisamente, la naturaleza poligénica de los rasgos morfológicos implica que en el estudio multivariable de los mismos se estén considerando a la vez el efecto de multitud de genes, lo que confiere a estos estudios un tratamiento amplio de la variación genética. Adicionalmente, la expresión de los caracteres morfológicos depende presuntamente de genes reguladores (Fitch y Atchley 1987), los cuales probablemente intervengan de forma activa en la divergencia entre poblaciones (Atchley y Hall 1991).

En el presente capítulo se pretende realizar un breve repaso a los aspectos más relevantes (al menos para el desarrollo del trabajo que nos ocupa) de la naturaleza genética y ontogénica de los distintos tipos de caracteres morfológicos y estructuras estudiadas en esta tesis, así como a su utilidad como herramientas en el estudio de la evolución. Todo ello, con la intención principal de establecer un marco teórico que represente los cimientos sobre los que se sustentará la discusión de los resultados. No es objetivo de este capítulo, sin embargo, detallar los caracteres concretos que se han empleado ni entrar en aspectos metodológicos sobre el registro, la depuración y el análisis de los mismos. Estos aspectos serán expuestos en los capítulos correspondientes (veáse índice). Los dos tipos de caracteres morfológicos que se han empleado son: rasgos no métricos del cráneo y de la mandíbula, y medidas mandibulares.

1.2.2. Caracteres no métricos

1.2.2.1. Definición y tipos de caracteres no métricos

En el contexto del estudio morfológico de vertebrados el término “*carácter no métrico*” se utiliza para hacer referencia a distintos tipos de variables discontinuas que aparecen en el esqueleto y cuya incidencia se supone independiente del crecimiento y no inducida por influencias externas directas (Ansorge 2001). Este tipo de caracteres también han sido llamados epigenéticos (Berry 1963; Hauser y De Stefano 1989; Markov 2003), discretos (Cheverud y Buikstra 1978; Leamy et al. 1998; Manzi et al. 2000; Hanihara y Ishida 2001c; Hanihara et al. 2003), discontinuos (Brasili et al. 1999; Gualdi-Russo et al. 1999; Hanihara y Ishida 2001c; Hanihara et al. 2003; Hallgrimsson et al. 2005) o casi continuos (Grüneberg 1952; Griffin 1993), merísticos (Lajus 2001) y también variables esqueléticas (o dentales) menores (Suchentrunk y Flux 1996). Si bien el término de carácter epigenético se debe al origen ontogénico de estas variables, las cuales aparecen como resultado de la interacción entre el esqueleto y los tejidos adyacentes (muscular, nervioso, sanguíneo, etc.), el resto de denominaciones hacen referencia a la naturaleza categórica del carácter, o más concretamente de la forma de establecer el estado del carácter. A pesar de que las variables discontinuas se han estudiado ampliamente en esqueletos de distintos grupos de mamíferos (Berry 1969; Markowski 1993; Suchentrunk 1993; Mikkelsen y Lund 1994; Suchentrunk et al. 1994; Suchentrunk y Flux 1996), especialmente en roedores (Berry 1963; Berry y Searle 1963; Corbet et al. 1970; Berry y Jakobson 1975; Patton et al. 1975; Berry et al. 1978; Hartman 1980; Andersen y Wiig 1982; Sikorski 1982b; Krystufek 1990; McLellan y Finnegan 1990; Ventura y Sans-Fuentes 1997; Krystufek y Macholan 1998; Leamy et al. 1998; Markov 2003) y en humanos (Berry y Berry 1967; Hauser y De Stefano 1989; Dodo y Ishida 1990; Prowse y Lovell 1996; McMillan y Boone 1999; Donlon 2000; Manzi et al. 2000; Guatelli-Steinberg et al. 2001; Hanihara y Ishida 2001c; Hanihara et al. 2003; Sutter y Mertz 2004), también se han utilizado para evaluar la variación morfológica en otros taxones animales. Este es el caso de los insectos, en los que numerosas estructuras, como las quetas o la venas alares se consideran apropiadas para este tipo de análisis (Ansorge 2001).

El cráneo ha sido y sigue siendo la parte del esqueleto más profusamente utilizada en el estudio de los caracteres no métricos. Por el contrario, el esqueleto postcraneal ha sido relegado a un papel secundario y solamente algunos estudios han tratado la variación de

este tipo de caracteres en vértebras, cinturas y esqueleto apendicular (Berry 1963; Berry 1964; Finnegan 1974; Finnegan 1978; Donlon 2000). Probablemente, esta desigualdad entre ambas partes del esqueleto sea debida principalmente a la abundancia de variables discontinuas que contiene el cráneo y a la elevada cantidad de información que de ellas puede extraerse, pero es posible que también haya influido el hecho que en las colecciones de los museos las series craneales se guardan más habitualmente que los esqueletos completos.

Cabe destacar que existen distintos tipos de caracteres no métricos. Según algunos autores la mayoría de ellos pueden clasificarse en tres categorías principales: forámenes, variables hiperostóticas y variables hipostóticas (Ossenberg 1970; Dodo 1974; Hauser y De Stefano 1989). Aunque se han descrito otras clases de rasgos no métricos, como por ejemplo las variaciones suturales supernumerarias⁷ (Hanihara y Ishida 2001a), todas ellas pueden incluirse en alguna de las tres categorías anteriores –a la de variables hipostóticas en el caso de las variaciones suturales supernumerarias (Ossenberg 1970; Manzi et al. 2000).

Los forámenes son pequeños orificios naturales que perforan el hueso y a través de los cuales circulan vasos sanguíneos y nervios (Figura 1-11). De todas las variables esqueléticas menores estas han sido las más frecuentemente utilizadas (Ansorge 2001). Habitualmente los forámenes se anotan como caracteres dicotómicos de ausencia/presencia o simple/múltiple. Sin embargo a veces se busca la presencia de un foramen accesorio menor y otras veces se cuenta el número concreto de forámenes no específicos existentes dentro de una pequeña área definida del hueso. Ocasionalmente, también puede considerarse la posición relativa de un determinado foramen dentro del hueso en el que se encuentra.



Figura 1-11. Vistas dorsal y ventral del cráneo de *M. m. domesticus* en las que se indican algunos caracteres no métricos. 1) fontanela frontal (carácter hipostótico), 2) foramen oval, 3) ala palatina (carácter hiperostótico) y 4) foramen palatino mayor.

⁷ Del inglés *supernumerary sutural variations* (Hanihara y Ishida 2001a).

Debido a la abundancia y a la importancia de los forámenes se han realizado algunos estudios en los que tan solo se tiene en cuenta la variación en este tipo de caracteres no métricos (Andersen y Wiig 1982).

Aunque los forámenes son de lejos los caracteres no métricos más ampliamente utilizados, la mayoría de estudios completan la lista de variables con otras categorías de rasgos cualitativos, como son por ejemplo las variables hiperostóticas. Tal y como su nombre indica estos rasgos aparecen por un exceso de osificación. Este crecimiento adicional del hueso puede producir distintas estructuras, como por ejemplo pequeños puentes óseos dentro de forámenes mayores o pequeños procesos óseos adicionales; y en algunos casos transformar estructuras óseas preexistentes, formándose por ejemplo canales a partir de surcos. A pesar de que la variación hiperostótica ocurre con una frecuencia relativamente baja se aplica habitualmente debido a que los caracteres se reconocen con relativa facilidad.

La variación hipostótica, al contrario que la hiperostótica, se caracteriza por la falta o la disminución del grado de osificación (Figura 1-11). Dependiendo de la severidad de esta reducción de tejido óseo pueden aparecer distintos tipos de rasgos. Así la variación hipostótica puede expresarse a modo de fenestraciones, como la que sucede en el vómer (Gao y Gaskin 1996); aberturas, como las que se dan en el proceso coronoide de la mandíbula o en el alveolo dentario de las raíces molares (Pankakoski y Hanski 1989); e incluso la ausencia total de ciertos huesos, como el interparietal (Hartl et al. 1993), o de algunos procesos óseos, como por ejemplo el pterigoideo (Berry 1963).

A pesar de que en los dientes (los cuales forman parte del esqueleto) también se pueden identificar numerosos caracteres no métricos, estos no se clasifican en ninguna de las categorías anteriores, por lo que son considerados un grupo a parte. La presencia de cúspides y raíces adicionales o reducidas, surcos, crestas y pliegues de esmalte son algunas de las estructuras dentarias que pueden ser consideradas como rasgos epigenéticos y estudiadas utilizando la misma metodología que la empleada para forámenes u otros caracteres esqueléticos discontinuos (Suchentrunk et al. 1992; Suchentrunk 1993; Griffin 1993; Suchentrunk et al. 1994; Suchentrunk y Flux 1996).

Es importante poner de relieve que la definición y clasificación de los distintos caracteres discretos no siempre es una tarea obvia. Por esta razón en numerosas ocasiones surgen problemas de nomenclatura derivados de la ambigüedad y relativa subjetividad a la hora de definir cada uno de los caracteres. Sirva de ejemplo el caso de la aparición del puente óseo que divide el foramen oval en dos forámenes menores. Mientras que algunos

autores interpretan la aparición de este puente como un carácter hiperostótico y lo denominan foramen oval dividido (Ansorge 2001), otros autores lo consideran como la aparición de un foramen accesorio y lo denominan foramen oval doble o múltiple (Berry 1963; Andersen y Wiig 1982). Este ejemplo ilustra claramente dos problemas frecuentes en el estudio de los rasgos epigenéticos. En primer lugar, que aunque existen unas categorías más o menos claras de caracteres no métricos la distinción entre una y otra no siempre es precisa. Y en segundo lugar, e implicando aspectos prácticos más importantes, la terminología puede resultar confusa ya que en ciertas ocasiones caracteres homólogos son definidos de distinto modo por distintos autores, o por el contrario caracteres no homólogos (o cuya homología no ha sido comprobada) reciben el mismo nombre por el simple hecho de estar situados en la misma región ósea.

1.2.2.2. Breve historia del estudio de los caracteres no métricos

Si bien el conocimiento de la existencia de los caracteres no métricos se remonta incluso algunos siglos atrás, no fue hasta finales del siglo XIX, principios del XX, que estos rasgos empezaron a ser reconocidos y citados como caracteres descriptivos desde una perspectiva poblacional (véanse citas en Griffin 1993; Ansorge 2001). A mediados del siglo pasado, algunos años después de la aparición de aquellos primeros trabajos, se iniciaron profundas labores de investigación destinadas a determinar la naturaleza de los procesos de génesis y heredabilidad de los caracteres no métricos, las cuales se prolongaron hasta finales de la década de los 80 (Grüneberg 1952; Searle 1954a; Searle 1954b; Searle 1954c; Berry y Berry 1967; Howe y Parsons 1967; Hilborn 1974; Self y Leamy 1978; Cheverud y Buikstra 1979; Cheverud y Buikstra 1981; Cheverud y Buikstra 1982; Richtsmeier y Mcgrath 1986). Este grupo de estudios estableció una base sólida para el uso generalizado de las variables cualitativas como fuente de polimorfismo epigenético útil para evaluar la diversidad y las diferencias existentes tanto dentro como entre poblaciones o especies. Promovida por el estudio realizado por Berry (1963) sobre polimorfismo epigenético en poblaciones de ratón doméstico, la investigación en el campo de los caracteres no métricos progresó rápidamente y se extendió abarcando un nutrido grupo de especies de mamíferos. Resultado de esta expansión se publicó una bibliografía sobre “variación no métrica en mamíferos salvajes”, que incluyó más de un centenar de artículos (Bauchau 1988). Desde entonces, el estudio de la variación en caracteres no métricos no ha parado de ampliar el espectro de sus aplicaciones prácticas. Más allá de la

diferenciación entre poblaciones, los caracteres epigenéticos han permitido descubrir asilamiento reproductivo y cuellos de botella filogenéticos (Kozakiewicz 1993), eventos históricos de colonización (Spitzenberger et al. 1999) y relaciones intraespecíficas filogenéticas o geográficas complejas (Hartl et al. 1993; Ventura y Sans-Fuentes 1997). En los últimos años, el rápido desarrollo de los análisis sobre asimetría fluctuante ha provocado que los caracteres no métricos bilaterales también hayan sido utilizados para detectar la existencia de inestabilidad del desarrollo en determinadas poblaciones (Leary et al. 1985; Lazarová 1999; Lajus 2001). Sin embargo, ciertas limitaciones prácticas y teóricas han restringido el uso de estos caracteres como estimadores de los niveles de asimetría (Swain 1987; Novak et al. 1993).

Aunque injustamente menospreciados y generalmente menos utilizados que otros tipos de rasgos morfológicos en los estudios de variabilidad poblacional, lo cierto es que los caracteres no métricos siguen aportando en la actualidad información valiosa, especialmente en el campo de la antropología biológica (Prowse y Lovell 1996; Brasili et al. 1999; Gualdi-Russo et al. 1999; McMillan y Boone 1999; Hanihara y Ishida 2001a; Hanihara y Ishida 2001b; Hanihara y Ishida 2001c; Hanihara y Ishida 2001d; Hanihara et al. 2003; Sutter y Mertz 2004; Shigematsu et al. 2004). Este hecho ha llevado a algunos autores a reivindicar la importancia de estos rasgos como herramientas morfológicas (Ansorge 2001).

1.2.2.3. Base genética de los caracteres no métricos

Aunque la existencia de una base genética en los caracteres no métricos ha sido dilucidada en muchos casos a partir de evidencias indirectas, como pueden ser las diferencias detectadas en la frecuencia de ocurrencia de determinados rasgos entre poblaciones con distintas constituciones genéticas, o la concordancia existente entre matrices de distancia basadas en estos rasgos y en otros de herencia Mendeliana simple como son los grupos sanguíneos (Szathmary y Ossenberg 1978), algunos estudios han tratado de forma directa la naturaleza genética de estos caracteres en distintos grupos de vertebrados.

Uno de los primeros estudios en tratar la base genética de la variación morfológica esquelética fue realizado a mediados del siglo pasado cruzando distintas cepas de laboratorio de ratón doméstico (Grüneberg 1952). En él se llegó a la conclusión que la variación morfológica existente en el esqueleto, aunque sensible a influencias ambientales,

era heredada de forma multifactorial (Grüneberg 1952). Concretamente, para los caracteres no métricos se propuso un modelo de tipo poligénico conocido como modelo de casi-continuidad⁸ (Grüneberg 1952), el cual postula que la expresión de cada carácter es debida a la existencia de múltiples genes con efecto aditivo modulados por la existencia de un umbral en el desarrollo que conduce a la manifestación de alternativas fenotípicas discontinuas en lugar de producir un carácter distribuido de manera continua (González-José 2003). Es decir, que la expresión de un determinado carácter depende del número de alelos con efecto positivo para ese carácter y del valor umbral a partir del cual se expresa (Figura 1-12). Si el número de alelos positivos supera el valor umbral se dará el carácter en cuestión, si por el contrario el número de alelos positivos no alcanza dicho valor el carácter no aparecerá. De este modo, dependiendo de la composición genética de la población, es decir de sus frecuencias alélicas, la frecuencia de ocurrencia de un carácter concreto será mayor o menor. Superpuesta a esta distribución genética se encuentra la influencia del ambiente en el que se desarrolla el carácter, por lo que la posición de dicho umbral, y por tanto la presencia o ausencia del carácter, puede variar dependiendo de las condiciones ambientales. Así, un individuo situado genéticamente por debajo del umbral en un ambiente, puede encontrarse justo por encima de este mismo umbral en un ambiente

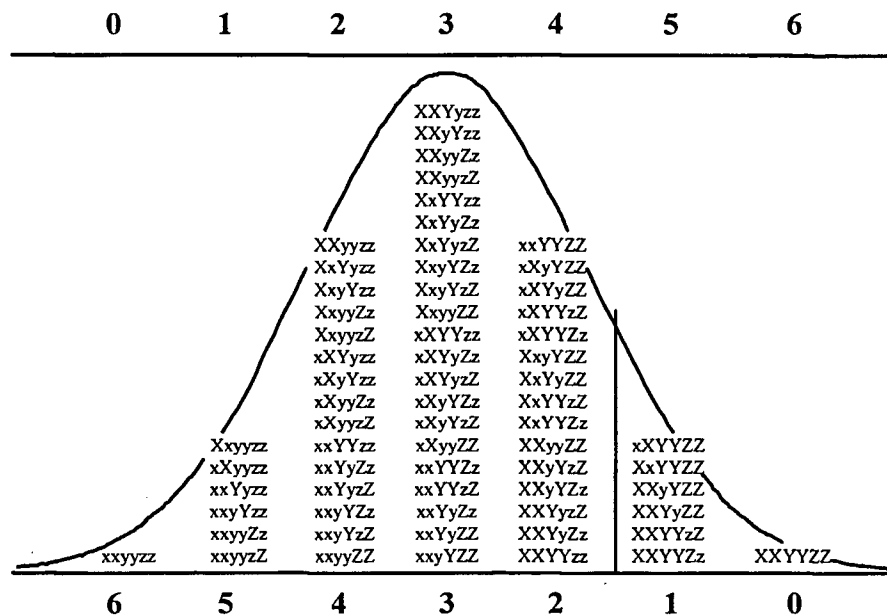


Figura 1-12. Gráfico que ilustra la distribución genotípica subyacente al modelo poligénico de casi continuidad para la expresión de los caracteres no métricos. En la expresión del carácter ejemplificado intervendrían tres genes (x, y, z), siendo X, Y, Z alelos favorables para la expresión del carácter mientras que x, y, z serían desfavorables para el mismo. La numeración superior indica el número de alelos favorables y la inferior el de desfavorables. La línea vertical es el umbral que determina que los individuos con 5 o 6 alelos favorables presentarán el carácter.

⁸ Traducción literal del término inglés *quasi-continuity* (Grüneberg 1952).

distinto (Hauser y De Stefano 1989). La importancia de este modelo radica en las implicaciones que tiene en el estudio de los caracteres epigenéticos, ya que los caracteres no son discontinuos, si no que en realidad tienen una continuidad subyacente sobre la cual el umbral impone una discontinuidad en la expresión visible. En consecuencia, las técnicas de toma de datos pueden reflejar no tan solo ausencia o presencia, si no también distintos grados de expresión del carácter (Griffin 1993).

Elaborados estudios desarrollados en cepas endogámicas de ratón y en humanos han demostrado la existencia de un complejo trasfondo multigénico en las variables esqueléticas menores (Grüneberg 1963; Berry 1968), el cual ha sido corroborado además por las elevadas heredabilidades que estos caracteres han mostrado en ciertos trabajos (Hilborn 1974; Berry 1978; Cheverud y Buikstra 1981). Así, por ejemplo, en un examen de heredabilidades relativas realizado en poblaciones de *Macaca mulatta* se observó que, en general, los caracteres no métricos tendieron a mostrar valores de heredabilidad considerablemente más altos (0,528) que las variables métricas analizadas (0,317), y que dentro de los primeros los de tipo hiperostótico e hipostótico presentaron en término medio valores más elevados (0,798) que los forámenes (0,352; Cheverud y Buikstra 1982). Aunque estos valores se obtuvieron a partir de un número de caracteres sustancialmente distinto en cada categoría, se consideran indicativos de la amplia base genética que pueden tener los caracteres no métricos. Adicionalmente, cabe mencionar que ciertos estudios han observado una estrecha correlación entre la variación métrica y la no métrica (con coeficientes que oscilan entre 0,80 y 0,95), lo que ha sido interpretado como un indicio de que ambos tipos de variables comparten rutas ontogénicas comunes (Richtsmeier et al. 1984).

No obstante, a pesar de las altas y significativas heredabilidades que los caracteres no métricos han presentado en algunos casos, en otros la base genética detectada no ha sido tan amplia, quedando patente el elevado impacto que el ambiente puede tener en la expresión de dichos caracteres (Grewal 1962; Berry y Searle 1963; Berry 1968; Self y Leamy 1978). Así, por ejemplo, en un estudio basado en cepas de laboratorio de ratón doméstico se observó que los factores no genéticos (maternos y postnatales) explicaron por término medio el 80% de la varianza en el 75% de los caracteres no métricos de la columna vertebral (Searle 1954a). Entre estos factores no genéticos que pueden afectar a la expresión de las variables discretas tienen especial relevancia aquellos relacionados con la fisiología materna (Howe y Parsons 1967), en particular con la dieta y las carencias nutritivas de la madre. Estas alteraciones fisiológicas afectan al tamaño de la camada así

como al tamaño de las crías; ejerciendo este último factor una gran influencia en la expresión de los caracteres no métricos (Deol y Truslove 1957). Así, en ratones de laboratorio alimentados con dietas extremas se ha visto que la dieta materna puede tener una influencia clara en la incidencia de ciertas variables no métricas (Searle 1954c; Deol y Truslove 1957), aunque esta influencia puede ser menos importante en poblaciones naturales (Thorpe 1981). Sin embargo, en estudios posteriores estos efectos maternos han mostrado ser cuantitativamente poco importantes. Así, en un trabajo realizado con cepas de laboratorio de ratón sobre la herencia en 11 caracteres no métricos del cráneo y la mandíbula, el efecto medio de la madre sobre la variabilidad de los caracteres se estimó en un 8%, oscilando entre el 0% del foramen oval doble y el 16 % del foramen maxilar II (Self y Leamy 1978).

La heterogeneidad de los resultados obtenidos en el estudio de la base genética de los caracteres no métricos ha llevado a algunos autores a sugerir la existencia de una relación entre el tipo funcional de carácter y su heredabilidad (Richtsmeier y Mcgrath 1986). Como explicación a esta relación se ha propuesto la hipótesis de la matriz funcional⁹, que parte del principio de que a medida que aumenta el número de fuentes ontogénicas de variación de un determinado carácter, la heredabilidad del mismo disminuye (Richtsmeier y Mcgrath 1986).

1.2.2.4. Variación no métrica y distancias poblacionales

La similitud morfológica entre dos o más poblaciones puede estimarse a partir del cálculo de distancias poblacionales basado en un tratamiento estadístico de las variables seleccionadas. En el proceso de selección de estas variables se asume que las mismas están bajo control genético y se ven mínimamente afectadas por las condiciones ambientales o nutricionales (Corruccini 1974). Además, se parte del supuesto que la muestra debe ser representativa de la población y tener un tamaño adecuado (Rosing 1982; Rosing 1984). Las medidas de distancia morfológica entre poblaciones obtenidas cumpliendo estas condiciones son útiles para inferir aspectos diversos de la biología y la demografía de los grupos estudiados, como pueden ser los patrones de residencia, de difusión y migración, y los cambios microevolutivos a lo largo del tiempo (Ubelaker 1974).

⁹ Traducción de *functional matrix hypothesis* (Richtsmeier y Mcgrath 1986).

Tradicionalmente, los investigadores han utilizado las variables métricas, y en particular los índices craneales, para estimar las distancias entre poblaciones (Howells 1966; Jantz 1972; Howells 1973; Jantz 1973; Cybulski 1975; Sikorski 1982a). Sin embargo, desde el momento en que la naturaleza genética de la variación no métrica fue puesta de relieve (Searle 1954a), corroborando por tanto la especificidad poblacional de estos rasgos, los estudios de distancias poblacionales han usado estas variables con mayor frecuencia (Berry y Berry 1972; Berry 1974; Dodo 1974; Corruccini 1974; Saunders 1978; Finnegan 1978; Sikorski 1982b; Dodo y Ishida 1990; Hartl et al. 1993; Ventura y Sans-Fuentes 1997; Hanihara y Ishida 2001a; Hanihara y Ishida 2001b; Hanihara y Ishida 2001c; Hanihara y Ishida 2001d; Hanihara et al. 2003; Sutter y Mertz 2004; Shigematsu et al. 2004). Especialmente desde que a finales de la década de los 60 se propusiera que los caracteres no métricos ofrecían estimas de similitud poblacional incluso más fiables que las propias variables métricas (Berry y Berry 1967).

De este modo, los caracteres no métricos han sido ampliamente aceptados como marcadores genéticos (Bauchau 1988; Ansorge 2001) y mientras tanto el análisis de sus frecuencias se ha erigido como una técnica sólida con abundantes ventajas en el estudio de la variación interpoblacional (Markowski 1995; Lazarová 1999), entre las que destaca con toda probabilidad la relativa sencillez de su metodología. Así, la incidencia de los caracteres no métricos puede ser registrada sin necesidad de disponer de grandes infraestructuras, siendo además los cráneos objetos habituales de estudio por su relativa abundancia en colecciones de museo. Otras ventajas en el estudio de los caracteres no métricos derivan de su propia naturaleza, ya que éstos son en buena medida independientes del sexo, la edad o el estado de desarrollo ontogénico, y además a penas están correlacionados entre ellos (Sjovold 1977; Lazarová 1999). También se ha asumido que estos caracteres están expuestos a una mínima presión selectiva, por lo que se les ha considerado neutros (Pankakoski y Hanski 1989). Parece lógico suponer que pequeñas variaciones en los caracteres esqueléticos no métricos serán de menor importancia para la supervivencia de un organismo que los cambios concernientes a otro tipo de caracteres, como por ejemplo los pertenecientes al sistema reproductivo o al digestivo, aunque debe tenerse en cuenta que esta hipótesis no se ha confirmado nunca en animales salvajes (Berry y Jakobson 1975).

Aunque hasta ahora el trasfondo genético real de muchos de los caracteres no métricos que se emplean habitualmente no ha sido esclarecido, para la mayoría de ellos se asume que están controlados genéticamente. No obstante, el hecho de que ciertos estudios hayan

mostrado heredabilidades relativamente bajas en algunos de ellos (Self y Leamy 1978; Richtsmeier y Mcgrath 1986) ha provocado un alto grado de concienciación sobre la importante influencia que pueden ejercer ciertos factores no genéticos (Berry 1978). Partiendo de la base que es prácticamente imposible demostrar que en la formación de caracteres fenotípicos estén únicamente implicados factores genéticos, debe aceptarse la existencia potencial de influencias ambientales que podrían dar lugar a diferencias entre sexos, clases de edad, o correlación entre caracteres. Por esta razón, aquellos rasgos que muestren una variación dependiente de factores ambientales deben ser eliminados del análisis (Ansorge 2001). Es más, en el examen simultáneo de un cierto número de caracteres los determinantes genéticos deben resaltar sobre las influencias ambientales (Sjovold 1977). Por consiguiente, la utilización de un número elevado de rasgos es un prerrequisito indispensable para que el estudio de la variación no métrica sea un método útil para evaluar la posible diferenciación genética entre poblaciones.

1.2.3. Caracteres métricos: la mandíbula como modelo para el estudio del desarrollo y la evolución de estructuras morfológicas complejas

1.2.3.1. Introducción

Se define como estructura morfológica “compleja” a aquella en la que su forma final resulta de la integración de distintas partes componentes, cada una de las cuales puede tener orígenes embriológicos diferentes, desarrollarse a una tasa propia y estar bajo control de factores causales distintos (Atchley y Hall 1991). El disponer de modelos que permitan integrar la biología del desarrollo, la genética y la evolución de las estructuras morfológicas es necesario para facilitar la comprensión de los entresijos que se producen durante los cambios ontogénicos y evolutivos de las mismas. Y lo que es aún más interesante desde el punto de vista evolutivo, como los cambios heredables del proceso ontogénico afectan al proceso de especiación. Puesto que en los sistemas biológicos los cambios a largo plazo son debidos a la acción de fuerzas evolutivas que actúan sobre alteraciones heredables en los procesos ontogénicos subyacentes, entender como evolucionan las estructuras morfológicas requiere conocer como se forman y como se puede generar cierta variabilidad en las mismas durante el proceso ontogénico (Atchley y Hall 1991). La mandíbula de los mamíferos, en concreto la de ratón doméstico, ha sido considerada un paradigma en el estudio de las estructura morfológicas complejas porqué a pesar de su

aparente homogeneidad estructural está formada por diversas regiones morfogenéticas (Atchley y Hall 1991). Además ha sido objeto de extensivos análisis anatómicos, embriológicos y genéticos, a la vez que herramienta fundamental para paleontólogos, antropólogos y sistemáticos (véanse citas en Atchley y Hall 1991), lo que hace de ella una estructura ideal para el estudio de la variación morfológica y dota al investigador de un marco comparativo con abundante información.

A continuación se detallan algunos de los aspectos más relevantes de la anatomía, el desarrollo, los factores de variabilidad y la base genética de la mandíbula siguiendo la pauta establecida por Atchley y Hall (1991), quienes sentaron las bases para el uso de este hueso como modelo en el estudio ontogénico y evolutivo de las estructuras morfológicas complejas.

1.2.3.2. Regiones morfogenéticas y musculatura mandibular

La mandíbula de los mamíferos se compone de dos mitades simétricas, una derecha y otra izquierda, unidas entre sí por la sínfisis mandibular. Cada una de estas mitades, denominada hemimandíbula, está formada por un hueso único: el dentario, llamado así por el hecho de albergar los dientes. Dentro de los vertebrados actuales solamente los mamíferos poseen una mandíbula formada por un único elemento óseo bilateral, ya que el resto de grupos han retenido numerosos huesos postdentarios que intervienen en la articulación con el cráneo (Sidor 2003). A pesar de la aparente homogeneidad estructural que presenta el dentario, lo cierto es que este hueso es una entidad esquelética de elevada complejidad, divisible funcional y ontogénicamente en distintas regiones. Así pues, atendiendo principalmente a criterios embriológicos el dentario de *M. musculus* se divide en cuatro regiones morfogenéticas básicas que son: el cuerpo mandibular y los procesos, condilar, coronoide y angular (Atchley y Hall 1991). A su vez, en el cuerpo mandibular pueden distinguirse el ramus horizontal y dos componentes alveolares, el incisivo y el molar, que son partes del ramus asociadas a la dentición. De este modo, se considera que la mandíbula está formada por seis unidades morfogenéticas semiindependientes menores: ramus horizontal, región alveolar incisiva, región alveolar molar, proceso coronoide, proceso condilar y proceso angular (Figura 1-13). El ramus da soporte al resto de unidades morfogenéticas y funciona por tanto como elemento cohesor. Las dos regiones alveolares se encargan de alojar los dientes, que en los roedores están altamente especializados y tienden a una reducción en el número de piezas, desapareciendo los caninos y quedando

en su lugar un espacio libre llamado diastema que separa el incisivo de un número variable de molares y premolares (Carleton 1984). Los procesos se encargan principalmente de la articulación de la mandíbula con el cráneo, que en mamíferos se da típicamente entre el dentario y el escamoso (Simpson 1960), así como de la inserción muscular. Existe una séptima unidad morfogénética situada en la cara lingual de la mandíbula (por lo que no se aprecia en la Figura 1-13), la sínfisis mandibular, que une ambas hemimandíbulas anteriormente.

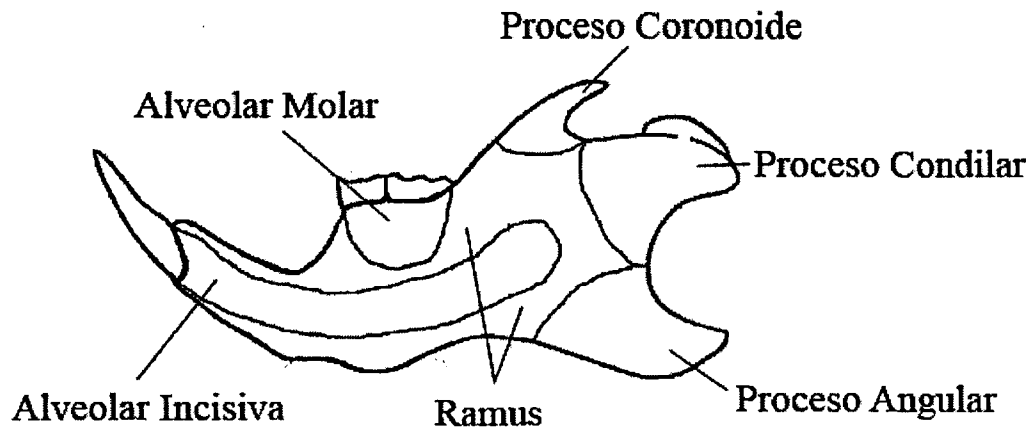


Figura 1-13. Vista labial de la hemimandíbula izquierda de ratón mostrando las seis unidades morfogénéticas básicas: los tres procesos, las dos regiones alveolares y el cuerpo mandibular (modificado de Atchley y Hall 1991).

Si bien la mandíbula está compuesta por estas siete unidades morfogénéticas menores, se considera que en conjunto la región anterior está dominada por el componente incisivo o dentario, mientras que la región posterior lo está por la unión de los músculos masticatorios (Atchley y Hall 1991). Por esta razón, bajo la perspectiva de la integración morfológica, algunos autores separan la mandíbula de los mamíferos en dos módulos funcionales principales (Figura 1-14): la región alveolar o dentaria y la región muscular o del ramus ascendente (Leamy 1993; Klingenberg et al. 2003; Klingenberg et al. 2004). Cabe destacar, sin embargo, que aunque varios trabajos han tratado el tema de la modularidad de la mandíbula de *M. musculus* (como modelo dentro de los mamíferos) y a pesar de que la división en dos

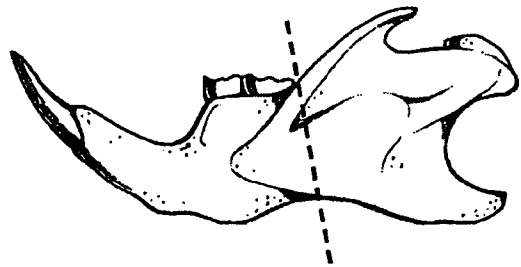


Figura 1-14. La mandíbula suele subdividirse en dos subunidades funcionales o módulos: el ramus ascendente, que sirve para la inserción de la musculatura y la articulación con el cráneo, y la región alveolar, que alberga los dientes

módulos es algo ampliamente aceptado, no existe unanimidad en cuanto a los resultados. Así, mientras los datos obtenidos en ciertos estudios apoyan la hipótesis de los dos módulos (Leamy 1993; Cheverud et al. 1997; Mezey et al. 2000), otros no permiten confirmar su existencia (Klingenberg y Leamy 2001; Klingenberg et al. 2001).

La complejidad de la mandíbula no radica solamente en la cantidad de unidades morfogénicas que la conforman, también depende de la diversidad de tejidos y de interacciones entre ellos que dan origen a las distintas regiones (estos aspectos son tratados con mayor detalle en los apartados 1.2.3.3. y 1.2.3.4.). Por ejemplo, tanto en la sínfisis como en los tres procesos existe, además de tejido óseo, cartílago secundario especializado, cuya función depende de la unidad en la que se encuentre. Así, mientras que el cartílago secundario de los procesos mandibulares se encarga de envolver el hueso y servir como superficie de articulación, el de la sínfisis interviene en la unión de los dos dentarios (Atchley y Hall 1991). Otro tejido que juega un papel crucial en el desarrollo y crecimiento mandibular es el tejido muscular de origen mesodérmico que se asocia al dentario (Noden 1987). Íntimamente unidos a la mandíbula se encuentra un nutrido grupo de músculos responsables de los movimientos de esta estructura, los cuales conforman en su conjunto la musculatura masticatoria o mandibular. Éstos músculos se insertan principalmente en la mitad posterior del dentario, ya sea en la cara labial o en la cara lingual (Figura 1-15), especialmente en los tres procesos (Atchley y Hall 1991).

La musculatura mandibular de los roedores ha sido ampliamente estudiada desde que a finales del siglo XIX fuese considerada un carácter fundamental para establecer relaciones de parentesco dentro del orden (Brandt 1855). Sin embargo, trabajos más recientes cuestionan la validez taxonómica de los grupos establecidos mediante los patrones de inserción del músculo masetero (Hartenberger 1985; Carroll 1988; Nedbal et al. 1996; Adkins et al. 2001; Huchon et al. 2002), ya que se ha observado que dichos patrones pueden haber aparecido más de una vez durante la evolución de los roedores y que la transición de una condición a otra podría ser frecuente (Hartenberger 1985; Carroll 1988). A pesar de ello, la musculatura mandibular de los roedores sigue siendo fuente de numerosos estudios (Kesner 1980; Thorington y Darrow 1996; Satoh 1997; Satoh y Iwaku 2004) debido a la importancia que se le atribuye a la mecánica de esta estructura ósea en el éxito adaptativo del grupo (Carroll 1988). La musculatura masticatoria de *M. musculus* sigue el patrón miomorfo típico, en el que la porción del masetero que se origina en el rostro pasa a través de un estrecho foramen infraorbitario, cruzando toda la cuenca ocular, para insertarse en la base del proceso coronoide (Brandt 1855). Los músculos que se

insertan en la mandíbula de los múridos son: el masetero, el temporal, el pterigoideo interno, el pterigoideo externo, los músculos suprahioides y los músculos extrínsecos de la lengua (Hiimae 1971; Kesner 1980; Satoh 1997; Satoh y Iwaku 2004). Debido a la falta de información concreta referente a la musculatura mandibular del ratón doméstico e incluso del género *Mus* (o a la imposibilidad de localizar dicha información), la división y nomenclatura de la musculatura mandibular que se utilizan a continuación son las empleadas por Satoh (1997) en su estudio sobre morfología mandibular en dos especies de múridos. En concreto, se ha utilizado la descripción para *Apodemus speciosus*, perteneciente a la subfamilia murinae, a la cual también pertenece el género *Mus* (Martin et al. 2000), adaptándola al esquema publicado por Atchley et al. (1985b) para el ratón doméstico (Figura 1-15). De todos los músculos mandibulares, el masetero es el que

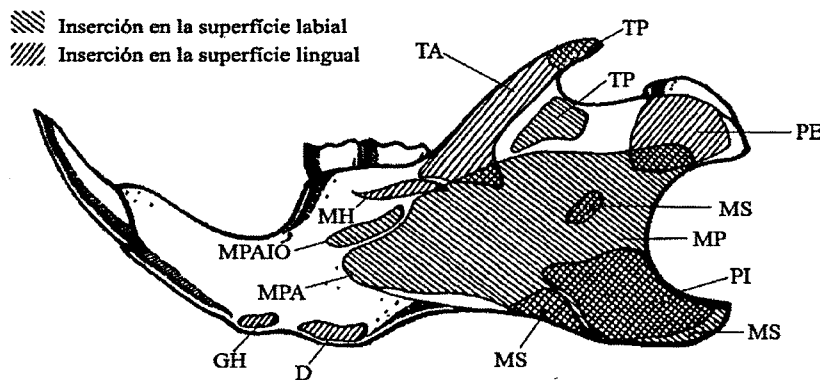


Figura 1-15. Inserciones musculares en las caras labial y lingual de la mandíbula de ratón. D: digástrico; GH: genihoideo y geniogloso; MH: milohioideo; MP: masetero profundo; MPA: masetero profundo anterior; MPAIO: rama infraorbitaria del masetero profundo anterior; MS: masetero superficial; PE: pterigoideo externo; PI: pterigoideo interno; TA: temporal anterior; TP: temporal posterior.

presenta una mayor complejidad ya que se subdivide en cuatro partes: el masetero superficial, el profundo, el anterior profundo y la parte infraorbitaria del anterior profundo (Satoh 1997). El masetero superficial se origina en una

tuberosidad situada en la parte lateral de la placa zigomática a la que se une mediante un pequeño tendón, y se inserta mayoritariamente en la parte ventral del proceso angular (Kesner 1980; Satoh 1997; Satoh y Iwaku 2004), aunque algunas fibras se insertan en la cara lingual de la parte superior de este mismo proceso (Atchley y Hall 1991; Satoh 1997). El masetero profundo se origina a lo largo de la cara ventral del arco zigomático y se inserta en la cara labial del proceso angular y del ramus mandibular (Satoh 1997). Aunque el masetero profundo anterior es continuo al masetero profundo ambos pueden distinguirse por el tipo de inserción. El masetero profundo anterior se origina en el borde superior de la placa zigomática y se inserta en la parte anterior de la cresta masetérica mediante un grueso tendón (Satoh 1997). La parte infraorbitaria del masetero profundo se origina en la concavidad existente en la parte anterior del foramen infraorbitario, pasa a través de él y se inserta en la aponeurosis situada en la base del proceso coronoide, justo

encima de el área de inserción del masetero profundo anterior (Satoh 1997). El músculo temporal se origina en el escamoso y en las áreas adyacentes del parietal y frontal, y se fija en el proceso coronoide (Satoh 1997; Satoh y Iwaku 2004). Consta de dos partes: la anterior, que se inserta en la cara lingual del proceso coronoide, y la posterior que lo hace en la parte superior de la cara labial del mismo proceso y en la fosa masetérica, por encima de la raíz del incisivo inferior (Satoh 1997). El pterigoideo interno se origina en la cara labial del proceso pterigoideo medial y en la cara lingual del proceso pterigoideo lateral, y se insiere en la cara medial del proceso angular (Satoh 1997). El músculo pterigoideo externo se origina en la cara labial del proceso pterigoideo lateral. Este músculo relativamente pequeño se fija en la cara lingual del proceso condilar, cerca de la superficie articular (Satoh 1997). Además de los cuatro músculos que acabamos de ver, se unen a la mandíbula dos series musculares más: la de los músculos suprahioideos, que está compuesta por el digástrico, el mandibular transverso, el milohioideo, el estilohioideo y el geniohioideo; y la de los músculos extrínsecos de la lengua, formada por el geniogloso, el hiogloso y el estilogloso (Satoh y Iwaku 2004).

1.2.3.3. Embriología y desarrollo mandibular

La mandíbula, junto con otros tejidos esqueléticos, musculares y conectivos de la región craneofacial del embrión, tiene su origen en el tubo neural, concretamente en las células de la cresta neural (Atchley y Hall 1991; Atchley 1993). La cresta neural está formada por una población de células pluripotentes de origen epitelial que derivan de las crestas laterales de la placa neural y que aparecen durante los primeros estadios embriológicos (Chai et al. 2000). Durante el desarrollo craneofacial estas células epiteliales sufren una serie de transformaciones y dan lugar al mesénquima embrionario que será el precursor de los tejidos esqueléticos, musculares y conectivos de la mandíbula (Hall y Hörstadius 1988; Chai et al. 2000). Durante este proceso de transformación las células se hacen más largas, sufren una reubicación de sus orgánulos que se sitúan en la parte basal, pierden contactos intercelulares apicales y establecen procesos a través de la lámina basal, de modo que pasan a tener un aspecto desorganizado y fibroblástico (Atchley y Hall 1991). Una vez transcurrido este proceso de cambio las células mesenquimáticas migran en sentido ventrolateral desde la parte dorsal de los pliegues neurales hacia el primer arco branquial o arco mandibular (Figura 1-16). Durante la migración, las células se dividen, de modo que cuando alcanzan su destinación el número de células es mayor que en el momento de partir (Hall y Hörstadius 1988). Cuando las células mesenquimáticas alcanzan

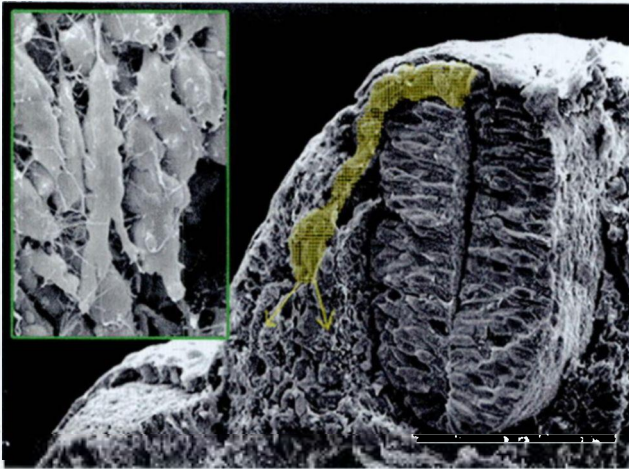


Figura 1-16. Imagen de microscopía electrónica de barrido que ilustra la migración de las células de la cresta neural que previamente han pasado por un proceso de transformación a células mesenquimáticas (cuadro superior izquierdo). Extraído de la página web http://www.med.unc.edu/embryo_images/

finalmente su destino se forman unos cúmulos llamados condensaciones celulares (Figura 1-17), que representan el punto de partida para la expresión de moléculas especializadas encargadas de definir, o como mínimo permitir, la diferenciación de los distintos tipos celulares o tejidos (Hall 2003). De aquí que las condensaciones celulares hayan sido consideradas la piedra angular del desarrollo esquelético y de otros tejidos mesenquimáticos (Hall y Miyake 2000),

así como las verdaderas unidades morfogénéticas (Atchley y Hall 1991; Hall 2003). Para que estas condensaciones aparezcan deben darse una serie de interacciones entre el mesénquima y el epitelio, y además debe haber finalizado la migración (Atchley y Hall 1991).

En la mandíbula se distinguen cuatro condensaciones de células mesenquimáticas o poblaciones celulares separadas: una odontogénica, una condrogénica y dos osteogénicas (Figura 1-18). La condensación odontogénica, que se sitúa en la región del alveolo dentario (por lo que también se llama alveolar), va a originar dos subpoblaciones celulares distintas. Una de ellas se diferenciará en osteoblastos que generaran el hueso alveolar en el que

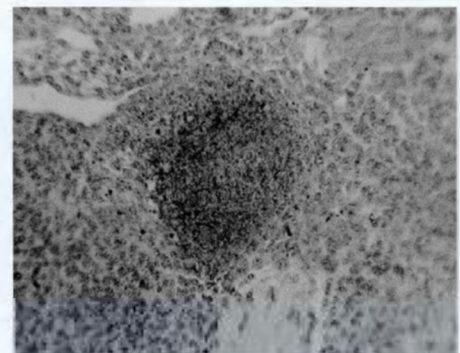


Figura 1-17. Condensación celular que originará el hueso hioideo en un embrión de ratón (Hall 2003).

se fijan los dientes, y la otra en odontoblastos, encargados de producir la dentina. La condensación celular condrogénica producirá el cartílago de Meckel (Atchley y Hall 1991). En los mamíferos el cartílago de Meckel desaparece parcialmente, pero parte del mismo da lugar a estructuras mandibulares o derivadas como son el mentón, los osículos del oído medio y algunos ligamentos (Atchley y Hall 1991). Debido a que durante el proceso de osificación de la mandíbula el hueso envuelve de manera gradual la mayor parte del cartílago de Meckel (Tomo et al. 1997; Ramaesh y Bard 2003) parece obvio pensar que este cartílago regula la morfogénesis mandibular; sin embargo, cabe indicar que no existen evidencias directas que apoyen esta hipótesis (Ramaesh y Bard 2003).

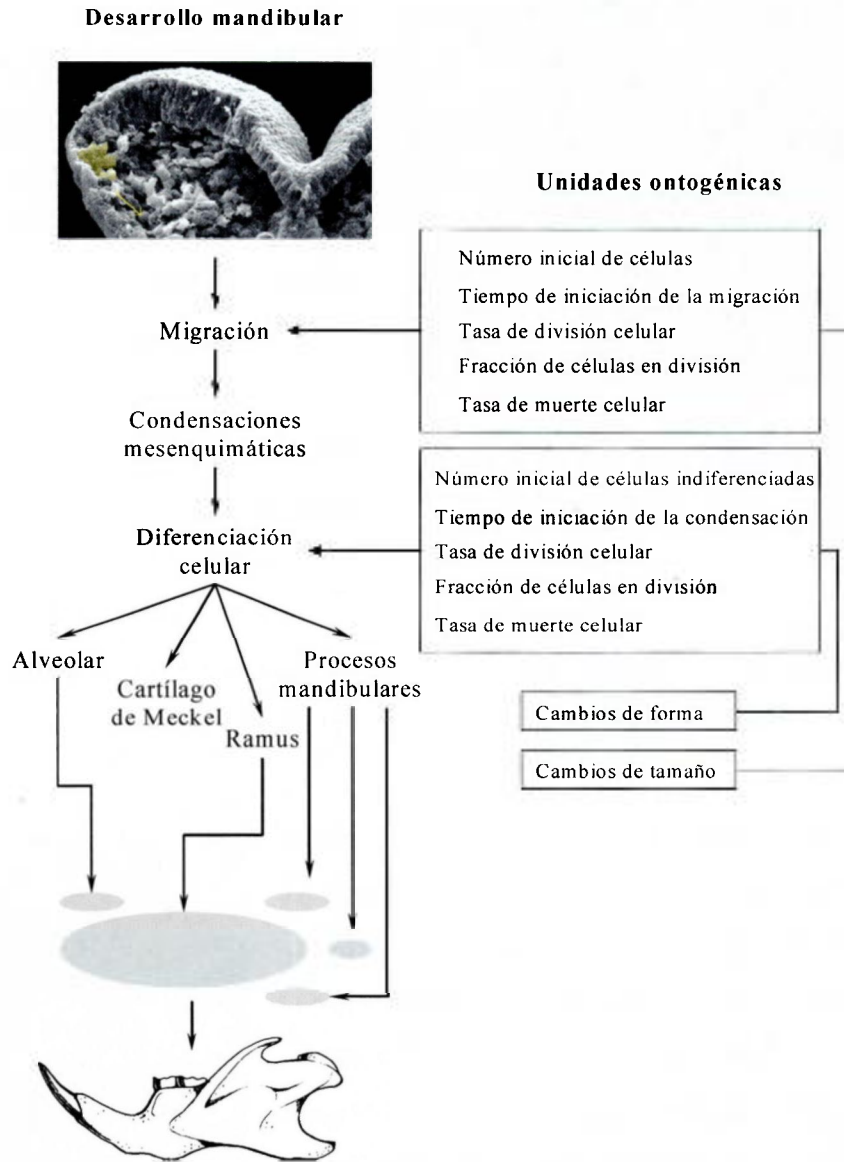


Figura 1-18. Esquema del proceso de desarrollo embrionario de la mandíbula en el que se muestran las distintas fases, las condensaciones celulares y las regiones mandibulares que originará cada una de ellas. Adicionalmente se indican las unidades ontogénicas, el momento en el que actúan y los cambios que pueden originar (adaptado de Atchley y Hall 1991).

Aun así, sí que hay ciertos indicios empíricos indirectos que apuntan en esta dirección. Por ejemplo, en el estudio realizado por Yanagisawa y colaboradores (1998) con ratones mutantes que carecían de cartilago de Meckel se observó que en estos animales se desarrollan mandíbulas altamente hipoplásicas, y en el estudio de proliferación celular de Ramaesh y Bard (2003) los patrones de incorporación de BrdU¹⁰ llevaron a estos autores a sugerir que el cartilago de Meckel secreta una señal que dirige el crecimiento

¹⁰ BrdU es la abreviatura de la 5-bromo-2'-desoxiuridina, base análoga a la timidina que se incorpora durante la fase de síntesis de DNA. Esta molécula se usa para detectar proliferación celular en tejidos vivos.

mandibular.

Una de las dos condensaciones osteogénicas que se distinguen en la mandíbula en formación va a originar el hueso del ramus. Aunque sus células son fundamentalmente osteoblásticas también pueden diferenciarse en condroblastos cuando es necesario reparar alguna fractura (Atchley y Hall 1991). La condensación osteogénica restante se va a diferenciar en osteoblastos y condroblastos secundarios que van a generar los procesos coronoide, condilar y angular. Los osteoblastos producirán hueso membranoso y endocondral, mientras que los condroblastos van a formar el cartílago secundario que cubre el hueso de cada uno de los procesos.

El desarrollo mandibular es un proceso complejo que presenta distintos sistemas o puntos de control que van a ser claves a la hora de determinar el tamaño y la forma del dentario del individuo adulto (Atchley y Hall 1991; Atchley 1993). Estos puntos de control han sido denominados unidades del desarrollo o unidades ontogénicas¹¹, las cuales se definen como aquellos fenómenos de regulación o entidades estructurales básicas necesarias para ensamblar una estructura morfológica compleja y cuya alteración puede provocar un cambio en la forma de dicha estructura, es decir una evolución morfológica (Atchley y Hall 1991). La definición de estas unidades del desarrollo se realizó con el objetivo de resaltar su importancia en el crecimiento y en la morfogénesis de las estructuras esqueléticas, y para establecer un modelo de desarrollo esquelético que permita evaluar las alteraciones respecto la norma y por tanto el cambio evolutivo (Atchley y Hall 1991; Atchley 1993). Durante la migración celular tienen lugar algunos de estos importantes puntos de control (Figura 1-18), los cuales van a influir enormemente en el tamaño de las condensaciones celulares y por tanto en el desarrollo y crecimiento de los tejidos derivados de las células de la cresta neural (Hall y Hörstadius 1988). Estos puntos incluyen: (1) el número de células de la cresta neural que inician la migración, (2) su tasa de migración, (3) la proporción de células emigrantes que se dividen, (4) el periodo mínimo de tiempo entre divisiones sucesivas, y (5) el número de células que mueren por el camino (Atchley y Hall 1991). La importancia del tamaño de las condensaciones celulares y por tanto de los distintos puntos de control queda ilustrada por distintas evidencias experimentales, como por ejemplo por el hecho que la osteogénesis no se inicia si el tamaño de la condensación es demasiado pequeño (Cottrill et al. 1987), o que condensaciones anormalmente grandes pueden originar huesos extremadamente largos (Atchley y Hall 1991). Además de los puntos de control que se dan durante la migración de las células

¹¹ Del inglés *developmental units*, utilizado por (Atchley y Hall 1991; Atchley 1993).

mesenquimáticas también existen procesos equivalentes una vez se han formado las condensaciones celulares (Atchley y Hall 1991; Atchley 1993); por lo que se espera que dichos procesos desarrollen importantes efectos de regulación en puntos más tardíos del desarrollo mandibular (Figura 1-18). De este modo se han descrito cinco unidades de desarrollo dentro de cada condensación celular: (1) el número de células indiferenciadas que hay en cada condensación, (2) el tiempo relativo de inicio de la condensación, (3) la tasa de división celular, (4) la fracción del total de la población celular que está activa a nivel mitótico, y (5) la tasa de muerte celular. La alteración de estas unidades que caracterizan cada una de las condensaciones celulares puede generar cambios potenciales en los tejidos derivados de las mismas. Si dicha alteración se da antes de la diferenciación de las células mesenquimáticas puede que se produzcan cambios en el tamaño mandibular, mientras que si la alteración sucede en procesos equivalentes una vez las células de las condensaciones ya se han diferenciado en distintos tipos celulares los cambios van a ser de forma (Atchley 1993).

A pesar de que durante las primeras etapas del desarrollo el proceso de morfogénesis mandibular presenta básicamente un control de tipo intrínseco determinado principalmente por parámetros relacionados con las condensaciones celulares, en etapas posteriores existen interacciones epigenéticas secundarias que también influyen directamente en el desarrollo y crecimiento de la mandíbula. Estos factores extrínsecos incluyen fundamentalmente procesos de interacción entre hueso y tejidos no esqueléticos (como por ejemplo muscular, nervioso, sanguíneo, o conjuntivo), como sucede durante la invasión de las condensaciones esqueléticas por parte de los vasos sanguíneos o en la unión de los músculos y los ligamentos al dentario (Atchley y Hall 1991). En particular, la musculatura mandibular influye profundamente en la morfología del dentario. Así por ejemplo, se ha observado que la detención de la miogénesis en los músculos pterigoideos que se produce en mutantes con disgénesis muscular provoca que no se forme el proceso condilar (Herring y Lakars 1981), mientras que la hipertrofia de estos mismos músculos provoca que se desarrolle un proceso condilar más grande de lo normal (Atchley y Hall 1991). Así pues, las estructuras morfológicas complejas se originan a partir de un conjunto de partes integrantes, el ensamblaje de las cuales depende de la coordinación de actividades que suceden a distintos niveles jerárquicos de organización temporal y espacial. En consecuencia, los cambios de la morfología mandibular pueden aparecer como resultado de la alteración de los patrones y los tempos de integración de las partes integrantes de esta *coreografía ontogénica*¹² (Atchley 1993).

¹² Del inglés *developmental coreography*, concepto utilizado por primera vez por Atchley et al. (1990).

1.2.3.4. Divergencia en la forma mandibular: origen y factores de variabilidad

El tamaño y la forma de la mandíbula varían enormemente entre los grandes grupos de mamíferos (Moore 1981), hecho que se ha interpretado clásicamente como una adaptación a distintas dietas y funciones. Sin embargo, la variación mandibular no se da únicamente entre los grandes grupos de mamíferos, si no que, aunque en menor medida, se observa también dentro de los propios grupos. Precisamente por el hecho de haber sido considerada un modelo para el estudio de la ontogenia y la evolución de las estructuras morfológicas complejas (Atchley y Hall 1991) la mandíbula se ha utilizado en numerosas ocasiones para determinar relaciones de parentesco entre especies próximas (Burity et al. 1999; Badyaev y Foresman 2000; Cardini 2003; Cardini 2004; Cardini y Slice 2004; Rosas y Bastir 2004; Monteiro y Dos Reis 2005; Caumul y Polly 2005) o incluso entre poblaciones de una misma especie (Loy y Corti 1996). Particularmente numerosos son los estudios realizados en *M. musculus*, donde la morfología mandibular se ha utilizado para evidenciar variación intraespecífica entre distintas cepas de laboratorio, razas cromosómicas o regiones geográficas (Festing 1972; Thorpe et al. 1982; Atchley et al. 1985a; Atchley et al. 1985b; Bailey 1986; Atchley et al. 1988; Corti y Thorpe 1989; Cheverud et al. 1991; Scriven y Bauchau 1992; Corti y Rohlf 2001).

Hasta ahora se han comentado distintos aspectos básicos sobre la morfología y el desarrollo mandibular, se ha visto el grado de complejidad de la mandíbula, las unidades fundamentales involucradas en su desarrollo, cómo puede aparecer la variación durante la ontogenia y algunos casos de divergencia en la forma de esta estructura ósea. Llegado este punto es necesario considerar el conjunto de factores que influyendo en los procesos ontogénicos pueden provocar cambios en la forma de la mandíbula. Para entender el origen y los factores de control de la variabilidad, y como esta variabilidad está involucrada en los cambios evolutivos, deben tenerse en cuenta tres características básicas del proceso ontogénico. En primer lugar, el desarrollo embrionario es regulador y está bajo control genético, por lo que la evolución del desarrollo (y la correspondiente evolución morfológica) es el resultado de cambios heredables en los patrones de regulación. Segundo, el desarrollo es un proceso de naturaleza epigenética que habitualmente incluye interacciones en cascada entre factores reguladores que actúan directa e indirectamente. Y en tercer lugar, el desarrollo es un proceso secuencial y de organización jerárquica (Atchley y Hall 1991). Habiendo expuesto esto, es importante subrayar que el desarrollo

embrionario en los mamíferos está bajo el control de dos genomas distintos (el materno y el de la progenie) y que completa sus actividades bajo la influencia de tres “ambientes” distintos (uterino, lactancia, y post-destete). Considerando estas premisas Atchley y Hall (1991) propusieron un modelo genético cuantitativo para el desarrollo mandibular del ratón doméstico con cuatro categorías principales de factores causales de control: factores genéticos intrínsecos, factores genéticos extrínsecos o epigenéticos, factores genéticos maternos (diferenciados en dos etapas, uterina y de lactancia) y factores ambientales no maternos (Figura 1-19). Cada una de estas categorías se describe brevemente a continuación.

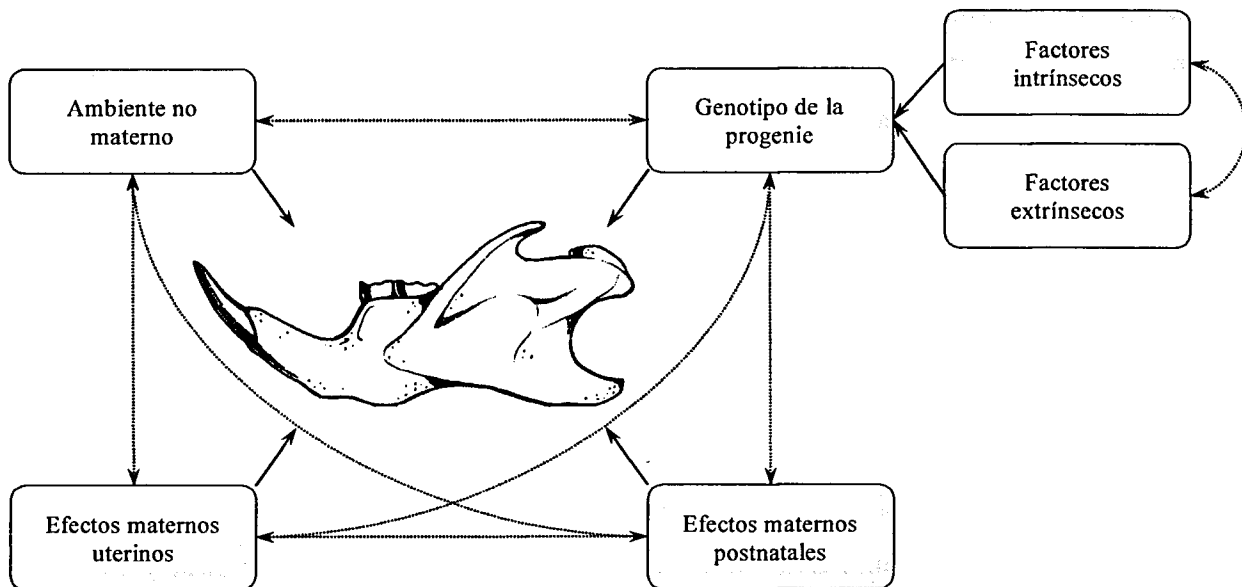


Figura 1-19. Modelo de genética cuantitativa del desarrollo mandibular que muestra los componentes genéticos, maternos uterinos, maternos postnatales y ambientales. (adaptado de Atchley y Hall 1991).

1.2.3.4.1. Factores genéticos intrínsecos

Los factores genéticos de naturaleza intrínseca incluyen principalmente aquellos genes que se expresan localmente y que codifican para proteínas estructurales que forman el esqueleto mandibular o bien para enzimas con actividades catalíticas específicas que gobiernan el desarrollo y la expresión selectiva de las células osteogénicas (Atchley y Hall 1991). El control genético intrínseco del desarrollo embrionario de mamíferos empieza en etapas muy tempranas del proceso. En el ratón por ejemplo, el genoma del feto en desarrollo se activa durante la segmentación, concretamente después de la primera división mitótica, en la fase de dos células embrionarias (Moore 1975; Sawicki et al. 1981). De hecho, se supone que la mayor parte de la regulación del crecimiento óseo debe darse mediante factores que se generan en el propio feto, ya que se ha observado

que gran cantidad de estos factores de crecimiento no pasan a través de la placenta (Marks y Popoff 1988).

Los cambios de forma implican cambios en la producción de estructuras. Sin embargo, existen numerosas razones por las que cabe esperar una menor variabilidad en los genes que controlan aspectos puramente estructurales que en los que controlan aspectos de regulación de procesos. Así, debido a las restricciones que se dan a nivel celular en la variabilidad estructural, es más probable que la divergencia evolutiva que se da en fenotipos complejos, como puede ser la forma de un determinado hueso, sea más bien el resultado de cambios en los patrones y tiempos de activación y represión génica durante el desarrollo que no el resultado de cambios realmente estructurales (Atchley y Hall 1991).

1.2.3.4.2. Factores epigenéticos

Aunque el término epigenético ha sido largamente utilizado en aspectos referentes al control del desarrollo, lo cierto es que no existe una definición ampliamente consensuada del mismo; más bien todo lo contrario, se podría decir que existen tantas definiciones como autores han abordado el concepto (Jablonka y Lamb 2002; Haig 2004). El concepto actual de epigenético fue concebido originalmente por C. H. Waddington (Waddington 1939; Waddington 1940), quien restringió su uso para hacer referencia a las interacciones causales entre los genes y sus productos durante el desarrollo embrionario (Waddington 1975). En la presente tesis se consideran los factores epigenéticos en el sentido adoptado por Atchley y Hall (1991), quienes definen el control epigenético como la influencia que tienen los genes reguladores de una célula o grupo de células sobre otra célula o grupo de células. Los factores epigenéticos son por tanto factores hereditarios que pueden actuar local o globalmente. Aquellos que actúan localmente pueden originarse por inducciones embrionarias de las células o tejidos adyacentes a la célula diana, o por la acción de órganos en desarrollo próximos. Los que actúan globalmente (e. g. hormonas) aparecen en un lugar alejado de la célula diana y pueden afectar a multitud de poblaciones celulares en desarrollo (Atchley y Hall 1991).

Como se acaba de comentar, los factores epigenéticos aparecen externamente a la célula en desarrollo y actúan de forma extrínseca. Precisamente por el hecho de ser factores externos han sido clasificados habitualmente como factores ambientales (Moss 1968), lo que ha conducido a una importante confusión del papel que tienen ambos tipos de factores en los procesos ontogénicos y evolutivos. Esta confusión surge de la falta de distinción entre el origen biológico de un efecto epigenético y la naturaleza externa de su modo de

actuación. El hecho de entender que los factores epigenéticos, aunque externos a la estructura en desarrollo, poseen una base genética que no tienen los factores ambientales conlleva importantes consecuencias evolutivas (Atchley y Hall 1991).

1.2.3.4.3. Efectos genéticos maternos

En los mamíferos los procesos de desarrollo embrionario, fetal y postnatal implican un conjunto complejo de interacciones entre el genoma del individuo en desarrollo y el genoma de la madre. Estas interacciones se conocen como efectos maternos y su magnitud y dirección pueden tener consecuencias significativas en el transcurso de la ontogenia. Los efectos maternos han sido definidos más concretamente como la influencia que ejerce la madre sobre el fenotipo de la progenie y que no se debe al efecto directo de los genes que le ha transmitido a la misma (Kirkpatrick y Lande 1989). Se han definido dos periodos principales de influencia materna: durante la gestación o prenatal, cuyo componente principal es la influencia uterina (e. g. metabolismo materno, tamaño del útero y riego sanguíneo del mismo, eficacia de la placenta en la transferencia de gases y nutrientes, etc.) y después del parto o postnatal, en el que actúa principalmente la influencia de la lactancia (e. g. cantidad y calidad de la leche, comportamiento materno, etc.). Todos estos factores condicionan la expresión del material genético de la progenie, por lo que se considera que actúan epigenéticamente. Sin embargo, debido a que los efectos maternos provienen de un genoma que no es el propio del individuo en desarrollo se consideran separadamente de los factores epigenéticos intrínsecos del individuo (Atchley y Hall 1991). Precisamente por su naturaleza epigenética, los factores maternos, igual como sucede con los factores epigenéticos propios del individuo (ver apartado anterior), también han sido considerados como factores ambientales (Willham 1963). Uno de estos factores genéticos maternos más obvios es el tamaño de camada. En poblaciones naturales el tamaño de camada puede considerarse un factor genético materno ya que contiene una componente genética significativa (Falconer 1965). Así por ejemplo, en un estudio realizado con ratones se observó que el tamaño de camada siempre tenía un efecto negativo en el tamaño de varias dimensiones mandibulares tomadas en individuos adultos, de modo que los animales de camadas más numerosas presentaron en general mandíbulas más pequeñas (Atchley et al. 1991). No solamente se han detectado factores maternos prenatales o uterinos que afecten a la morfología mandibular, si no que también se ha puesto de relieve que ciertos factores maternos postnatales relacionados con la lactancia

tienen efectos significativos en numerosos caracteres mandibulares en adultos (Atchley et al. 1985a; Atchley et al. 1985b).

1.2.3.4.4. Factores ambientales

La última categoría de factores causales que afectan al desarrollo mandibular es la de los factores ambientales, que son condiciones no heredables que se dan alrededor del individuo y que pueden tener un impacto significativo en el desarrollo. Los factores ambientales actúan local o globalmente y llegan a provocar perturbaciones significativas en los procesos de desarrollo, dando lugar incluso a fenotipos anormales (Atchley y Hall 1991). De modo que los factores ambientales no heredables pueden llegar a enmascarar la contribución de factores genéticos y epigenéticos heredables. Tanto es así que un mismo genotipo enfrentado a condiciones ambientales distintas puede generar fenotipos distintos. La monitorización de los cambios fenotípicos que sufre un mismo genotipo como función del ambiente es lo que se conoce como norma de reacción¹³ (Stearns 1989), mientras que la medida en que un ambiente modifica un genotipo es una estima de la plasticidad fenotípica del organismo (Via y Lande 1985).

1.2.3.5. Base genética de la morfología mandibular

El ratón ha tenido un papel crucial en los estudios genéticos desde que a principios del siglo XX se redescubrieran los postulados de Mendel (Silver 1995). Aunque los primeros trabajos sobre herencia se realizaron con plantas, no tardaron en aparecer estudios que demostraban la aplicabilidad de las leyes de la herencia también en mamíferos (Cuénot 1902). En este contexto, en el año 1902 el ratón doméstico fue adoptado como animal de laboratorio, y a partir de 1909 empezaron a criarse las primeras cepas de *M. musculus* (Silver 1995). Desde entonces se han desarrollado numerosos linajes endogámicos constituidos por ratones genéticamente homogéneos que se utilizan en multitud de estudios genéticos (Beck et al. 2000), se han publicado numerosos libros sobre el genotipo del ratón (Grüneberg 1952; Atchley et al. 1988; Silver 1995) e innumerables artículos científicos. En la actualidad se está secuenciado el genoma completo del ratón (Waterston et al. 2002) y las bases de datos genéticos están disponibles en numerosas páginas de Internet, como por ejemplo la Mouse Genome Database (<http://www.informatics.jax.org>;

¹³Del inglés *reaction norm*.

Blake et al. 1999) o Ensembl (<http://www.ensembl.org>; Hubbard et al. 2007). De este modo el ratón doméstico se ha convertido en el principal organismo modelo dentro del estudio de la expresión génica en mamíferos.

Los primeros estudios en tratar el componente genético de la forma y el tamaño mandibular se basaron en la comparación de distintas cepas de laboratorio de *M. musculus* con el fin de poner de manifiesto las diferencias existentes entre ellas (Bailey 1956; Bailey 1959; Festing 1972; Festing 1973; Festing 1976; Lavelle 1983; Lovell y Johnson 1983; Lovell et al. 1986). Aunque algunas de estas investigaciones se centraron en aspectos más prácticos de identificación y control de calidad de las líneas de laboratorio (Festing 1972; Festing 1973; Festing 1976) y otras abordaron el tema desde una perspectiva genética más teórica (Bailey 1956; Bailey 1959; Lavelle 1983; Lovell y Johnson 1983; Lovell et al. 1986), en conjunto pusieron de relieve la existencia de una amplia variabilidad en las dimensiones mandibulares dentro de un mismo taxón, así como el hecho que esta variabilidad pudiese presentar una base genética. Se demostró también el valor de la mandíbula y otras estructuras esqueléticas para discriminar entre cepas endogámicas de ratón (Festing 1972; Festing 1973; Lovell y Johnson 1983). Así, Festing (1972) logró clasificar correctamente el 98,4% de los especímenes analizados en sus cepas correspondientes tomando 13 medidas mandibulares, y Lovell y Johnson (1983) más del 96% con tan sólo diez medidas.

Estudios posteriores desarrollados mediante elaborados programas de cría y cruzamientos entre varias cepas de laboratorio corroboraron la existencia de un importante componente genético en la variación de la morfología mandibular y revelaron una elevada heredabilidad por lo que a caracteres mandibulares morfométricos se refiere (Bailey 1985; Atchley et al. 1985a; Atchley et al. 1985b; Bailey 1986; Atchley et al. 1988; Cheverud et al. 1991). Así, en el análisis de varias dimensiones esqueléticas, la longitud mandibular, con una heredabilidad de 0,57, fue el carácter que mostró la base genética más amplia (Leamy 1974), siendo este valor equiparable a los estimados unos años atrás para ocho medidas mandibulares, los cuales oscilaron entre 0,32 y 0,54 con una media de 0,43 (Bailey 1956). En una serie de estudios posteriores, Atchley y distintos colaboradores analizaron con detalle la base genética y la variabilidad debida a efectos maternos postnatales en varias medidas mandibulares (Atchley et al. 1985a; Atchley et al. 1985b). Los resultados obtenidos mostraron valores de heredabilidad en sentido estricto¹⁴ que oscilaron entre 0,09 y 0,44, con una media de 0,21 para todas las medidas, mientras que los efectos

¹⁴Del término inglés *narrow-sense heritability*.

maternos postnatales se movieron entre valores de 0 y 0,26, aunque la mayoría fueron muy bajos o nulos (Atchley et al. 1985b; Atchley 1993). Adicionalmente, en un estudio más tardío se observó que la proporción de la variación morfológica entre cepas de ratón que resultó ser genética en origen osciló en los mismos caracteres mandibulares entre el 44 y el 80%, con un promedio próximo al 65%, mostrando por tanto un porcentaje muy elevado de variación morfológica heredable (Atchley et al. 1988). Otro trabajo que abordó el tema de la base genética de la variación en medidas mandibulares fue el de Bailey (1986), quién consideró la varianza debida al componente cepa una estima de heredabilidad de las 24 medidas mandibulares utilizadas. Precisamente las medidas analizadas en la presente tesis (Figura 2-4) corresponden a las que se emplearon en aquel trabajo por lo que los valores de variación genética que se obtuvieron en el mismo se exponen en la Tabla 1-1.

No solamente se han utilizado medidas lineares para conocer la base genética de la morfología mandibular, también se han utilizado para tal fin otro tipos de caracteres, como son áreas o puntos morfométricos. Así, debido a que la mandíbula se divide en distintos componentes ontogénicos (véase apartado 1.2.3.2.), se ha considerado que para conocer la evolución de esta estructura se debe disponer de información sobre la base de la variabilidad existente en los componentes esqueléticos derivados de las distintas regiones morfogenéticas (Atchley 1993). Con esta finalidad se analizó la contribución relativa de los efectos genéticos aditivos, los efectos maternos postnatales y la variabilidad ambiental a la variación fenotípica de seis áreas de la mandíbula correspondientes a los derivados esqueléticos de las condensaciones mesenquimáticas (Atchley et al. 1992). Todas estas áreas presentaron una proporción estadísticamente significativa de la variabilidad fenotípica que fue debida a la variabilidad genética aditiva, mostrando heredabilidades en sentido estricto que oscilaron entre el 21 y el 41 % (Atchley et al. 1992; Atchley 1993). Otra aproximación ha sido la del estudio de las heredabilidades en la posición de determinados puntos morfométricos¹⁵ (Cheverud et al. 1991), la cual ha dado resultados parecidos a los obtenidos analizando otros caracteres. De este modo, en el análisis genético de 13 PMs de la mandíbula de ratón, las heredabilidades en sentido amplio¹⁶ obtenidas fluctuaron entre 0,30 y 0,72 (Cheverud et al. 1991).

¹⁵ Los puntos morfométricos se denominan habitualmente *landmarks* (abreviados con las siglas LM), que es la palabra inglesa que reciben los caracteres morfológicos con una localización específica registrados en forma de coordenadas. En el presente trabajo se utilizará la abreviatura PM para referirnos a ellos.

¹⁶ Del término inglés *broad-sense heritability*.

Tabla 1-1. Porcentaje del total de la varianza de cada medida mandibular explicado por distintos componentes. La proporción de varianza atribuible a la cepa es una estima de la heredabilidad, los factores madre y camada representan respectivamente efectos maternos uterinos y postnatales, y el factor individuo representa los efectos ambientales y el error de medida (Bailey 1986).

DPM	Fuente de variación			
	Cepa	Madre	Camada	Individuo
1-2	29***	0	17	53
1-12	45***	12**	8	33
2-3	67***	0	11*	21
2-12	17***	0	21*	61
3-4	48***	12**	0	38
3-5	73***	0	5	21
3-11	62***	2*	7	28
3-12	69***	4*	3	22
4-5	76***	0	2	21
4-8	79***	2	0	18
4-10	56***	0	9	33
4-11	59***	0	7	32
5-6	57***	3	0	39
5-8	70***	0	7*	21
6-7	75***	0	7*	16
6-8	40***	0	23**	36
7-8	30***	0	20*	48
7-9	72***	0	8*	18
8-9	53***	7	4	34
8-10	56***	2	2	38
9-10	51***	2	5	40
9-11	48***	1	9	40
10-11	40***	0	15	43
11-12	52***	0	13*	34

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Todos estos trabajos evidenciaron que la morfología mandibular presenta una amplia base genética, sin embargo quedaban importantes aspectos por tratar, entre los que destacaba el grado de concordancia entre los patrones de divergencia genética en la

morfología mandibular y la divergencia genética a nivel de otros *loci*, o hasta que punto los patrones de divergencia morfológica son fieles a la filogenia. Precisamente, la reciente adopción del ratón como animal de laboratorio (Silver 1995) ha propiciado que la genealogía de las cepas de laboratorio actuales se conozca detalladamente (Beck et al. 2000), lo que a su vez ha permitido disponer de un modelo inmejorable para comparar la concordancia entre datos de distinta naturaleza a la hora de calcular medidas de divergencia genética (Fitch y Atchley 1987; Atchley et al. 1988; Festing y Roderick 1989; Atchley 1993). Como resultado de los numerosos estudios genéticos realizados hasta finales de los años ochenta, principios de los noventa, algunos trabajos analizaron de forma extensiva la variación genética existente entre cepas endogámicas de ratón a nivel de numerosos *loci* codificadores de diversas proteínas, enzimas y factores inmunológicos (Atchley y Fitch 1991; Atchley y Fitch 1993). Las filogenias obtenidas en aquellos estudios probaron ajustarse de forma muy precisa al árbol genealógico de las cepas de ratón de laboratorio (Fitch y Atchley 1985; Fitch y Atchley 1987; Atchley y Fitch 1991). En este marco, y con el objetivo de esclarecer la validez de los caracteres morfológicos a la hora de recrear filogenias se comparó la divergencia genética en la forma mandibular y otros caracteres osteológicos con la divergencia genética basada en el estudio de diversos *loci* (Wayne y Obrien 1986; Fitch y Atchley 1987; Atchley et al. 1988; Festing y Roderick 1989). Los resultados obtenidos en los distintos estudios fueron hasta cierto punto contradictorios. Así, mientras que los primeros trabajos apuntaban a una ausencia de correlación entre variación morfológica y variación genética (Wayne y Obrien 1986; Fitch y Atchley 1987), en los posteriores quedó clara una estrecha relación lineal altamente significativa entre las medidas de divergencia calculadas mediante ambas bases de datos (Atchley et al. 1988; Festing y Roderick 1989). Según Festing y Roderick (1989) el hecho de que los estudios previos no detectaran tal correlación obedeció a que las muestras utilizadas incluyeron solamente dos cepas estrechamente emparentadas de ratón y a que no se corrigió correctamente para la relación no lineal que existe entre las escalas de divergencia morfométrica y genética. Así, al reanalizar los datos del artículo de Wayne y Obrien (1986) añadiendo datos de algunas cepas próximas genealógicamente y transformando a escala logarítmica las distancias morfológicas (de Mahalanobis), el coeficiente de correlación aumentó de 0,24 a 0,63, siendo este último valor altamente significativo ($p < 0,01$; Festing y Roderick 1989). Es más, se obtuvieron valores incluso más altos de correlación ($r = 0.72$) entre distancias genéticas y morfológicas al utilizar un conjunto de 11 medidas mandibulares (Figura 1-20). Sin embargo, al comparar las

filogenias obtenidas con ambos tipos de datos se observó que, aunque presentaron puntos en común, difirieron en ciertos aspectos (Atchley et al. 1988; Festing y Roderick 1989; Atchley 1993). Tales diferencias no son de extrañar cuando las distancias genéticas se estiman a partir de caracteres que difieren considerablemente en la complejidad genética y ontogénica subyacente. Así, se ha comprobado que las estimas de distancia genética obtenidas a partir de conjuntos de *loci* de distintos niveles organizativos

(por ejemplo, *loci* codificadores de proteínas versus *loci* del sistema inmunológico) pueden producir estimas de relaciones filogenéticas altamente discordantes (Atchley y Fitch 1991). Además, el número de caracteres utilizado para calcular las divergencias genéticas varió mucho entre ambos estudios, así mientras que en el análisis de diferencias genéticas global se basó en 144 *loci*, en el de divergencia genética basado en la morfología mandibular sólo se emplearon 11 rasgos. El mero hecho de analizar un número mayor de rasgos morfológicos podría mejorar el ajuste entre ambas genealogías (Atchley et al. 1988).

Otro aspecto importante a tener en cuenta referente a la base hereditaria de los caracteres es su arquitectura genética, es decir cuales son los genes y qué número de ellos controlan la síntesis de los componentes ontogénicos, la naturaleza de los productos de estos genes y como estos productos regulan el ensamblaje de estos componentes. Aunque hasta hace tan solo unos años existían muy pocos datos experimentales sobre la complejidad genética de la mandíbula de ratón, ya existían entonces dos principales líneas de argumentación. Mientras que por un lado se sugirió que las divergencias en la morfología mandibular entre distintas cepas endogámicas de ratón eran debidas literalmente a centenares de factores genéticos (Bailey 1985), por el otro, se sostenía la existencia de muy pocos genes esqueléticos en sentido estricto, ya que solamente aquellos *loci* que codifican específicamente para moléculas estructurales o enzimas que gobiernan el metabolismo de las mismas eran considerados como tales (Johnson 1986). Este último autor consideraba

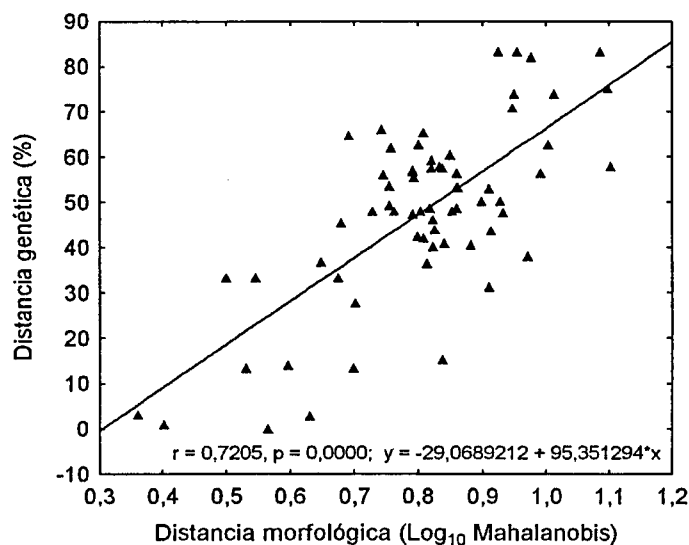


Figura 1-20. Correspondencia entre las distancias morfológicas (\log_{10} de la distancia de Mahalanobis) obtenidas a partir de 11 medidas mandibulares y las distancias genéticas (% disimilaridad) entre distintos pares de cepas endogámicas de ratón. Se muestra además la recta de regresión entre ambas medidas de distancia (adaptado de Festing y Roderick 1989).

el esqueleto como una estructura secundaria producida como resultado de múltiples interacciones durante la ontogenia, de modo que la mayoría de genes que afectarían al esqueleto lo harían de forma residual como resultado de su acción en otros procesos. No obstante, es preciso destacar que la aparente disparidad entre ambos puntos de vista ha sido considerada primordialmente semántica (Atchley 1993). Así, mientras que Bailey (1985) tenía un enfoque más poblacional y consideraba conjuntamente los factores genéticos intrínsecos y los factores epigenéticos heredables, Johnson (1986) enfocó el problema desde una perspectiva más ontogénica y diferenció claramente entre factores genéticos intrínsecos y factores epigenéticos heredables (Atchley 1993).

Lo cierto es que en los últimos años se ha avanzado notablemente en el aspecto de la arquitectura genética de la morfología mandibular. Así, numerosos estudios han abordado este aspecto desde la perspectiva del análisis y el mapeo de QTLs¹⁷ y de las regiones mandibulares a las que afecta cada *loci* (Cheverud et al. 1997; Mezey et al. 2000; Klingenberg y Leamy 2001; Klingenberg et al. 2001; Dohmoto et al. 2002; Ehrich et al. 2003; Klingenberg et al. 2004; Cheverud et al. 2004). Estos trabajos han evidenciado que existe un elevado número de *loci* que influyen en la morfología mandibular, tanto a nivel de morfometría clásica (Cheverud et al. 1997), como geométrica (Klingenberg et al. 2001). De este modo, en el análisis de 21 medidas mandibulares han sido detectadas 37 regiones cromosómicas esparcidas por los 19 autosomas que intervienen en la expresión de estos caracteres (Cheverud et al. 1997), las cuales han sido ampliadas a 40 en un estudio más reciente (Ehrich et al. 2003). De todas estas regiones cromosómicas, 22 afectan a la región del ramus ascendente, 5 a la región alveolar y 13 a la mandíbula entera, evidenciando por tanto efectos pleiotrópicos (Ehrich et al. 2003). Precisamente, el estudio detallado de los efectos pleiotrópicos de las QTLs, así como los patrones de integración y modularidad mediante estudios de genética cuantitativa de la morfología mandibular son aspectos de gran interés que se han abordado recientemente con relativa frecuencia en la literatura especializada (Ehrich et al. 2003; Klingenberg et al. 2004; Cheverud et al. 2004). Estos aspectos serán desarrollados con mayor detalle en el capítulo de integración morfológica de la mandíbula. Referente al análisis de la arquitectura genética de la forma mandibular mediante el estudio de morfometría geométrica simplemente destacar que los resultados son comparables a los obtenidos mediante morfometría clásica, así se ha detectado la existencia de 12 QTLs para el tamaño mandibular, 25 para la forma y cinco para la asimetría (Klingenberg et al. 2001).

¹⁷ Siglas provenientes de la expresión inglesa *quantitative trait loci*, que significa loci de caracteres cuantitativos.

1.3. Área de estudio: zona de polimorfismo cromosómico Barcelona

1.3.1. Antecedentes históricos

La existencia de polimorfismo cromosómico en las poblaciones de *M. m. domesticus* de las proximidades de Barcelona fue descrita por primera vez por Adolph y Klein (1981), quienes analizaron un total de 14 especímenes capturados en seis localidades distintas de la provincia de Barcelona: Moià, La Roca, Badalona, Barcelona, Valldoreix y Avinyonet. Mientras que en Moià y La Roca todos los animales cariotipados presentaron un complemento cromosómico de $2n = 40$, en las cuatro localidades restantes se encontraron animales con complementos diploides inferiores y con la presencia de cromosomas metacéntricos. Los autores atribuyeron esta situación a la existencia de fusiones Robertsonianas (Adolph y Klein 1981). En la ciudad de Badalona, uno de los dos animales estudiados presentó un cariotipo estándar de 40 cromosomas acrocéntricos y el otro un cariotipo de $2n = 39$, es decir con una única fusión céntrica en estado heterocigoto. De los animales provenientes de las otras tres localidades, los de Avinyonet fueron los que presentaron los números cromosómicos más bajos, los cuales oscilaron entre $2n = 31$ y $2n = 33$. En total, en el sistema de polimorfismo del noreste peninsular se identificaron cinco cromosomas metacéntricos distintos: Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(9.11) y Rb(12.13) (Adolph y Klein 1981).

Posteriormente, dentro de un estudio realizado con el objetivo de examinar la variación existente en el ADN mitocondrial del ratón doméstico en Europa, se cariotiparon cuatro ratones más del noreste peninsular, dos de Avinyonet y dos de la Roca (Nachman et al. 1994). En este caso sin embargo, no se aportaron nuevos datos por lo que a la estructura de la zona de polimorfismo se refiere.

Unos años más tarde, en un estudio más detallado de la zona en cuestión se encontró, además de los cinco metacéntricos descritos previamente por Adolph y Klein (1981), un nuevo metacéntrico, el Rb(3.8) (Gündüz et al. 2001). Aunque en este estudio no se recolectó ningún animal con todas las fusiones en estado homocigoto, el hecho de haber encontrado seis cromosomas metacéntricos distintos hizo suponer la existencia de una raza metacéntrica con un complemento diploide de 28 cromosomas ($2n = 28$), a la que se bautizó como “raza Barcelona”. Se estimó además el centro geográfico de la supuesta raza, el cual se situó entre las localidades de Garraf y Viladecans, y en consecuencia se consideró la zona de polimorfismo circundante como una zona híbrida entre la raza Barcelona y la raza estándar (Gündüz et al. 2001).

Más recientemente, el estudio detallado de la zona ha permitido capturar especímenes con un complemento diploide de 28 cromosomas, pero a la vez también se ha identificado una nueva fusión, la Rb(7.17) (Sans-Fuentes 2004; Sans-Fuentes et al. 2007). El hallazgo de esta nueva fusión indica que el número diploide mínimo que cabe esperar en la zona es de 26 cromosomas, siete pares de metacéntricos, cinco pares de acrocéntricos y un par de cromosomas sexuales. Cabe destacar sin embargo, que hasta el momento no se ha identificado ningún animal con 26 cromosomas, o lo que es lo mismo, con todas las fusiones en estado homocigoto; y que además la fusión Rb(7.17) se ha detectado en muy pocas localidades y en frecuencias muy bajas (inferiores al 16%) en todas ellas (Sans-Fuentes 2004; Sans-Fuentes et al. 2007). No tan sólo esto, sino que hasta el momento en toda el área no se ha detectado ninguna población que se ajuste a la definición de “raza cromosómica” propuesta por Hausser y colaboradores (1994). Precisamente por esta razón, y debido a la actual falta de evidencias que hagan suponer lo contrario, nos referimos a la zona de estudio como zona de polimorfismo Robertsoniano, en vez de hacerlo como zona híbrida cromosómica, tal y como se le había llamado previamente (Gündüz et al. 2001). Además, en una revisión reciente sobre el polimorfismo cromosómico de *M. m. domesticus*, en la que se contempla el sistema Robertsoniano peninsular, se considera que no existe ninguna raza descrita y se habla de tres poblaciones metacéntricas, que son: Garraf, Barcelona y Avinyonet (Piálek et al. 2005).

1.3.2. Estructura poblacional

1.3.2.1. Situación geográfica

La zona de polimorfismo de *M. m. domesticus* objeto del presente estudio se sitúa en la región noreste de la Península Ibérica, donde ocupa una superficie de más de 5000 km², la cual se encuentra principalmente en la provincia de Barcelona (Gündüz et al. 2001; Sans-Fuentes 2004). Aunque los límites precisos son difíciles de establecer, la zona de polimorfismo se extiende siguiendo la franja costera comprendida aproximadamente entre el norte de la provincia de Tarragona y la ciudad de Badalona. Desde esta franja litoral, la zona se expande hacia el interior en dirección noroeste, llegando a la provincia de Lleida, donde encuentra su límite occidental (Figura 1-21).

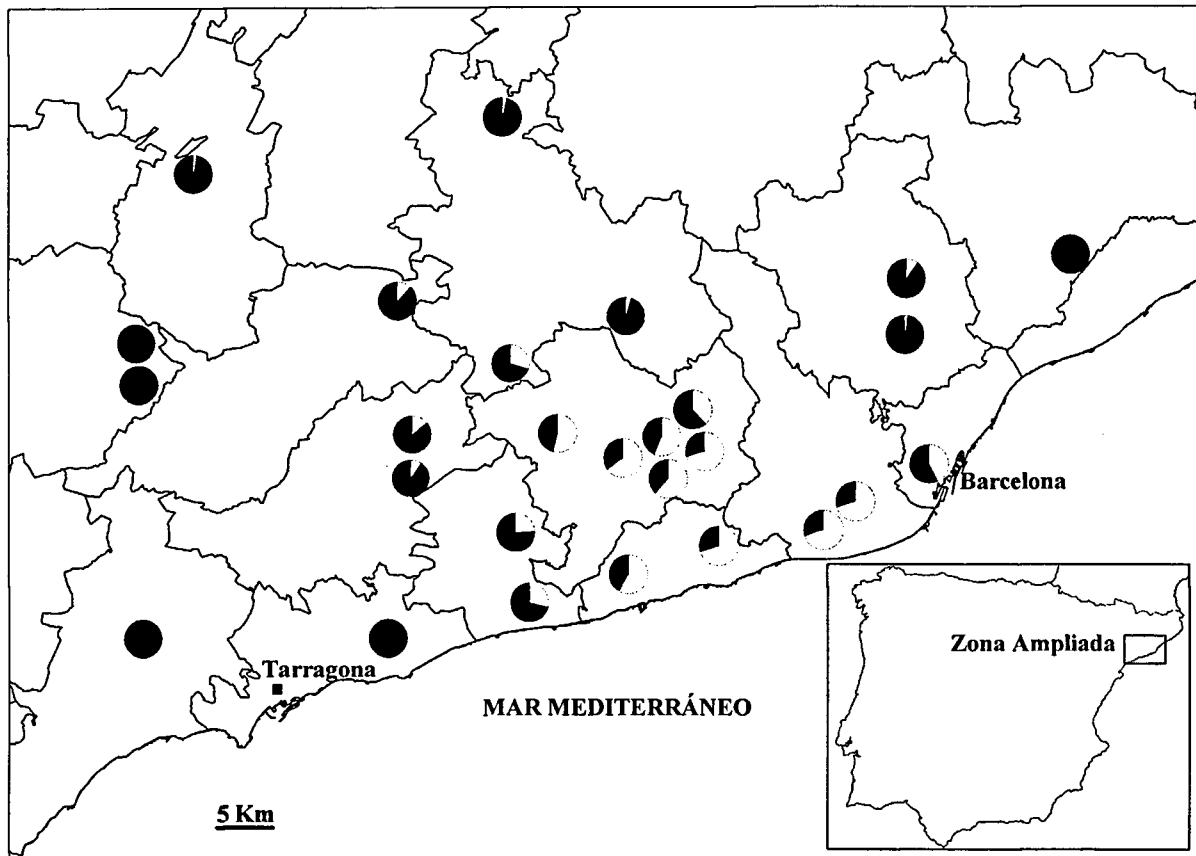


Figura 1-21. Mapa en el que se representa el número diploide medio de las localidades prospectadas hasta el momento en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona y localidades próximas. Las divisiones territoriales corresponden a los límites comarcales. Los círculos completamente negros corresponden a localidades estándar periféricas a la zona de polimorfismo. Cuanto menor el número diploide mayor porción blanca dentro del círculo. Los límites de la zona de polimorfismo se sitúan entre las localidades que aún presentan fusiones y aquellas más próximas puramente estándar.

1.3.2.2. Diversidad cariotípica

La zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona presenta una elevada variación cromosómica. Hasta el presente se han descrito más de 114 cariotipos diferentes con números diploides que oscilan entre los 27 y los 40 cromosomas (Figura 1-22). Así, a pesar de que se han descrito siete cromosomas metacéntricos diferentes -Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(9.11), Rb(12.13) (Adolph & Klein 1981), Rb(3.8) (Gündüz et al. 2001) y Rb(7.17) (Sans-Fuentes 2004; Sans-Fuentes et al. 2007)- por ahora no se ha detectado ningún individuo con todos ellos en estado homocigoto, es decir con un $2n = 26$.

Dentro del sistema Robertsoniano estudiado destaca una elevada heterocigosidad estructural. De los 322 individuos pertenecientes a la zona polimórfica que fueron analizados por Sans-Fuentes (2004) tan sólo 47 fueron homocigotos, mientras que el resto, 275, fueron heterocigotos al menos para una fusión. De estos 275, 143 fueron

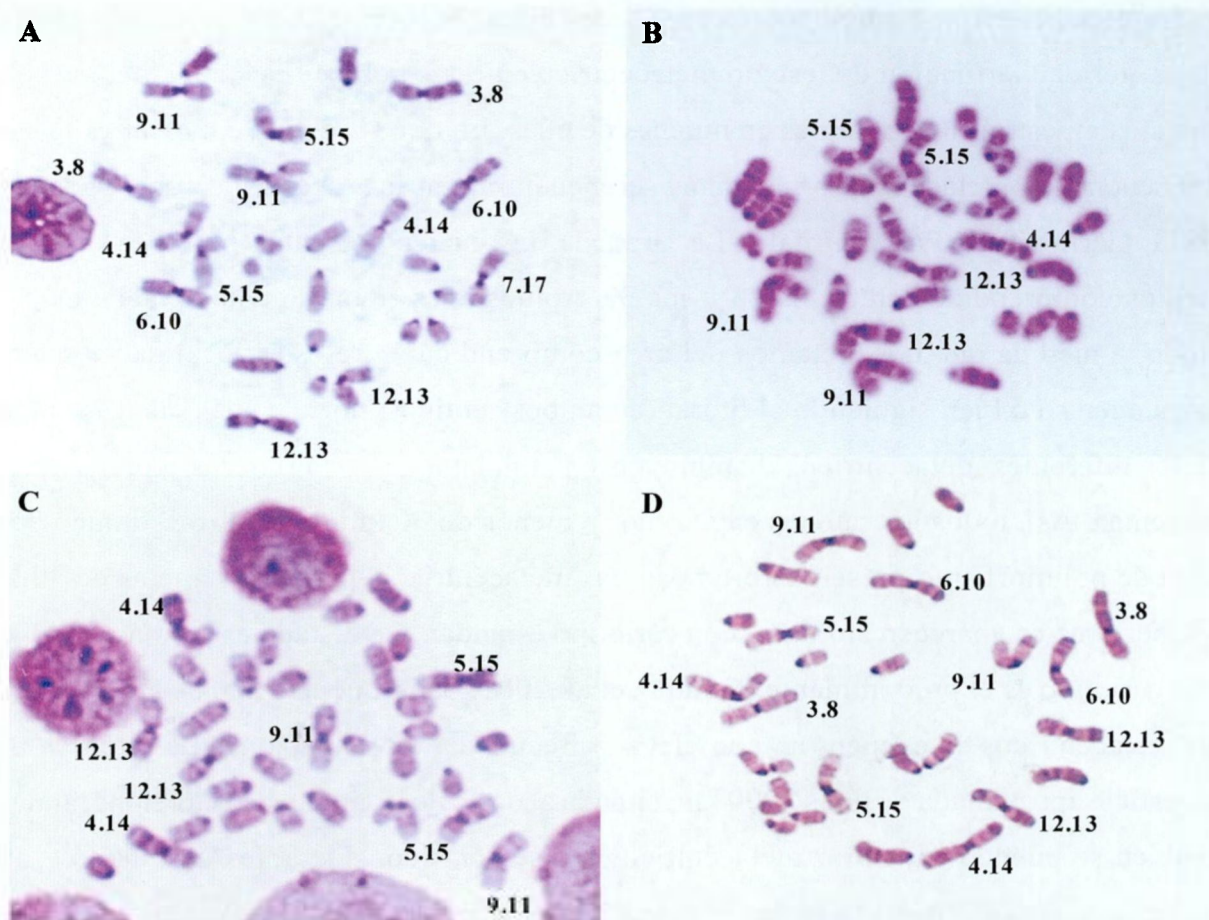


Figura 1-22. Cromosomas metafásicos teñidos mediante la técnica de bandas G procedentes de distintos ejemplares de la zona de polimorfismo Robertsoniano del noreste Peninsular. Están indicados los distintos metacéntricos. El ejemplar A presenta 13 cromosomas metacéntricos y un número diploide $2n=27$; el ejemplar B siete metacéntricos y por tanto un número diploide de $2n=33$; C, ocho metacéntricos y $2n=32$; D, 12 metacéntricos y $2n=28$.

heterocigotos para una única fusión, 88 para dos, 34 para tres, ocho para cuatro, uno para cinco y uno para seis (Sans-Fuentes 2004). Estos datos han puesto de manifiesto que, aunque en baja frecuencia, también pueden encontrarse individuos con más de tres fusiones en estado heterocigoto, situación que no había sido detectada en estudios precedentes (Gündüz et al. 2001).

1.3.2.3. Estructuración geográfica: variación clinal escalonada

En la zona de estudio se han detectado translocaciones Robertsonianas en 23 de las 28 localidades muestreadas hasta el momento. Sin embargo, en tan sólo tres de ellas se han encontrado juntas las siete fusiones: Vilanova i la Geltrú, Garraf y La Granada. Estas localidades han sido utilizadas para calcular el centro de la zona de polimorfismo (Sans-Fuentes 2004). Aunque en general la mayoría de fusiones han mostrado frecuencias de ocurrencia inferiores a uno, en algunas localidades se ha alcanzado este valor para alguno

de los metacéntricos, aunque nunca para todos ellos. No obstante, es arriesgado afirmar con seguridad la fijación del estado metacéntrico en estas poblaciones debido a los bajos tamaños muestrales disponibles en muchas de ellas. Lo que sí se puede indicar es que las frecuencias de metacéntricos más altas se encuentran en las localidades de Viladecans, Gavà, Garraf, Sant Pau d'Ordal y La Granada, las cuales presentan números diploides medios comprendidos entre los 28 y los 32 cromosomas (Sans-Fuentes 2004). De este modo, a medida que nos alejamos del área comprendida entre estas localidades, ya sea tierra adentro o bien siguiendo el litoral (en ambos sentidos, norte o sur), las frecuencias de los diferentes metacéntricos disminuyen y paralelamente los números cromosómicos aumentan. Así, todos los ratones capturados a menos de 30 km del centro estimado de la zona de polimorfismo presentan cromosomas metacéntricos, pero a distancias de 30 km o superiores ya aparecen animales con cariotipo estándar, y a distancias de más de 45 km este cariotipo es el predominante (Gündüz et al. 2001; Sans-Fuentes 2004). De modo que los metacéntricos se encuentran con elevada frecuencia en poblaciones de ratón en una superficie aproximada de unos 2000 km² situada al oeste de la ciudad de Barcelona, aunque también se pueden encontrar metacéntricos a distancias considerables de esta área. Por ejemplo, la fusión Rb(4.14), la de distribución más amplia, se ha detectado en localidades situadas a unos 80 km del centro estimado de la zona polimórfica (Gündüz et al. 2001; Sans-Fuentes 2004). Concretamente, los metacéntricos que se encuentran con mayor frecuencia son Rb(4.14), Rb(12.13), Rb(5.15) y Rb(9.11), los cuales se han detectado respectivamente en 21, 20, 18 y 15 de las 28 localidades analizadas por Sans-Fuentes (2004). Las fusiones Rb(6.10) y Rb(3.8) se han detectado en diez y nueve localidades respectivamente, mientras que Rb(7.17) tan sólo en cuatro (Sans-Fuentes 2004). Tal y como se ha comentado más arriba, el metacéntrico que presenta una extensión geográfica más amplia es Rb(4.14), que alcanza un radio de casi 80 km respecto al centro de la zona de polimorfismo (Figura 1-23); le siguen Rb(12.13) y Rb(5.15) con un radio de 44 km, Rb(9.11) y Rb(3.8) con uno de 39 km, y Rb(6.10) y Rb(7.17) con radios de 24 y 20 km, respectivamente (Sans-Fuentes 2004).

Precisamente esta organización geográfica de la variación cromosómica es debida a que la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona presenta una estructura clinal escalonada. Una clina es el cambio más o menos gradual en la frecuencia de un carácter a lo largo de un gradiente geográfico. En el caso de las zonas de polimorfismo cromosómico, las clinas analizadas pertenecen a los cambios de frecuencia de ocurrencia de cada uno de los metacéntricos a lo largo de un gradiente geográfico. En el caso de la

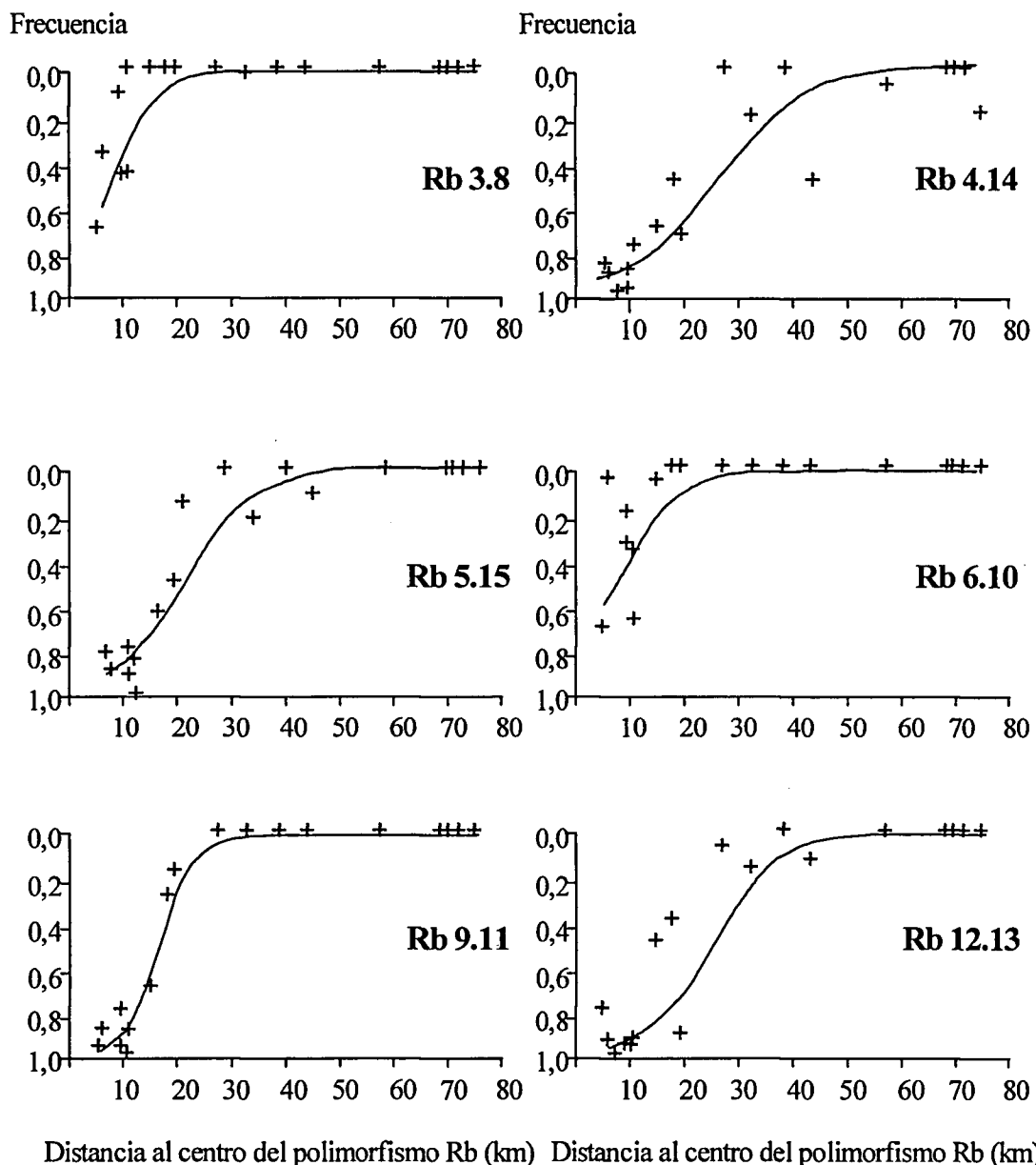
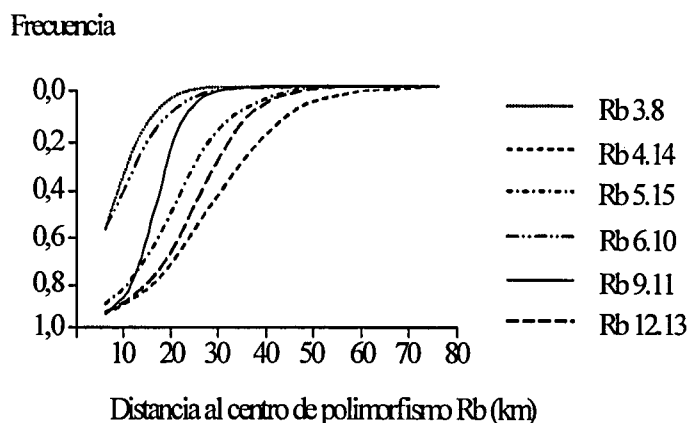


Figura 1-23. Representación gráfica de las clinas para cada una de las translocaciones Robertsonianas presentes en la zona de polimorfismo estudiada. No se muestra la clina para la translocación Rb (7.17) ya que se dispone de pocos datos. El eje de ordenadas muestra la distancia de las localidades muestreadas al supuesto centro de la zona de polimorfismo, y el eje de abscisas la frecuencia de la translocación en cada una de estas localidades (Sans-Fuentes 2004).

zona de estudio las clinas para los diferentes metacéntricos son no coincidentes y discordantes (Figuras 1-23 y 1-24) (Gündüz et al. 2001; Sans-Fuentes 2004), lo que significa que los centros y la extensión de las clinas son significativamente diferentes (Gündüz et al. 2001). Así, el metacéntrico más ampliamente distribuido es Rb(4.14) y a continuación le siguen Rb(12.13) y Rb(5.15). Los metacéntricos Rb(6.10) y Rb(3.8) presentan clinas de anchura intermedia y Rb(9.11) la clina más estrecha (Sans-Fuentes 2004). De este modo la clina de Rb(9.11) es significativamente más estrecha que las de Rb(4.14), Rb(12.13), Rb(5.15) y Rb(6.10) pero no difiere de Rb(3.8). Del resto de

combinaciones solamente difieren significativamente Rb(4.14) y Rb(3.8), lo que indica que la primera es más ancha que la segunda (Sans-Fuentes 2004). La mayoría de las clinas son significativamente no coincidentes o escalonadas, es decir, que presentan los centros de sus áreas de distribución desplazados unos respecto los otros, a excepción de los pares Rb(3.8) y Rb(6.10), y Rb(4.14) y Rb(12.13) (Sans-Fuentes 2004). Precisamente este escalonamiento y la discordancia de las clinas es uno de los principales factores responsable del elevado polimorfismo observado en la zona de estudio.

Figura 2-4. Curvas clinales ajustadas y superpuestas. Se puede apreciar como las distintas clinas muestran centros desplazados y anchuras diferentes, es decir que las clinas están escalonadas (Sans-Fuentes 2004).



1.3.3. Hipótesis sobre su origen

El origen concreto de la zona de polimorfismo cromosómico de Barcelona sigue siendo una incógnita. Como se comenta en el apartado 1.1.2.5. dos son las principales hipótesis sobre el origen de las poblaciones metacéntricas de *M. m. domesticus* en esta zona. Así, los cromosomas metacéntricos que se encuentran en ella se podrían haber formado *in situ* o bien podrían haber sido introducidos mediante animales provenientes de otras zonas de polimorfismo Robertsoniano que habrían sido transportados de forma pasiva por los humanos. Partiendo de ciertos estudios moleculares se considera que, en general, las razas cromosómicas de *Mus musculus domesticus* se han originado *in situ* (Britton-Davidian et al. 1989; Nachman et al. 1994) por una acumulación sucesiva de fusiones céntricas (Capanna 1982). En el caso particular de la zona de polimorfismo del noreste peninsular cabe tener en cuenta sin embargo que las frecuencias de metacéntricos más elevadas se encuentran en localidades muy próximas a puertos marítimos históricamente muy importantes, como fueron el de Barcelona o Vilanova i la Geltrú, lo que hace pensar en la posibilidad que algunos animales con fusiones llegasen a la Península transportados de forma pasiva por vía marítima. Un dato relevante en este sentido es que la región

mediterránea es una de las dos zona geográficas con mayor concentración de poblaciones metacéntricas de ratón doméstico (véase apartado 1.1.2.2.), lo que ha llevado a algunos autores a apoyar la teoría del desplazamiento de metacéntricos a través de las grandes rutas mediterráneas (Tichy & Vucak 1987; Winking et al. 1988). No obstante, la combinación de metacéntricos detectada en el noreste peninsular no se da en ninguno de los sistemas Robertsonianos conocidos, por lo que en principio la posibilidad de que todas las fusiones provengan de alguna zona externa queda descartada. Ahora bien, este panorama deja abiertas dos posibilidades más dentro de la hipótesis del contacto secundario. La primera sería que todos los cromosomas proviniesen de algún sistema Robertsoniano aún desconocido o que hubiese desaparecido, y la segunda que sólo alguna de las fusiones que aparecen actualmente en la zona hubiese llegado transportada de forma pasiva por los humanos. Una vez fijada esta fusión (o fusiones), el resto podrían haber aparecido *in situ*, ya que parece ser que la presencia de un metacéntrico puede incrementar de algún modo la aparición de nuevas fusiones (Nachman y Searle 1995). Las fusiones detectadas en el sistema Robertsoniano ibérico que se dan también en otras razas cromosómicas de *M. m. domesticus* son la Rb(3.8), que aparece en el centro y norte de Italia (Capanna et al. 1976; Gropp et al. 1982), sur de Alemania (Adolph y Klein 1981), Dinamarca (Nance et al. 1990) y Madeira (Britton-Davidian et al. 2000); la Rb(4.14) que ha sido documentada en Grecia (Nachman et al. 1994); la Rb(5.15) que aparece en el norte y centro de Italia, Suiza, sur de Alemania y Croacia (Gündüz et al. 2001); y la Rb(6.10) en Alemania (Adolph y Klein 1983; Piálek et al. 2005). De estos metacéntricos, el que presenta una mayor probabilidad de ser el elemento fundador en la zona de estudio es el Rb(5.15), puesto que en Europa presenta, con diferencia, una distribución más amplia que el resto de metacéntricos (Gündüz et al., 2001). No obstante, el análisis de marcadores microsatélites en este cromosoma descarta la hipótesis del monofiletismo y sugiere que el metacéntrico Rb(5.15) presente en la Península Ibérica apareció de forma independiente respecto a otras regiones (Riginos y Nachman 1999). Además, este metacéntrico no muestra la distribución más amplia dentro de la zona de polimorfismo (véase apartado 1.3.2.3.), tal y como cabría esperar en el caso de que hubiese sido el elemento fundador.

En definitiva, aunque falta aún por determinar el origen exacto del polimorfismo Robertsoniano de la Península Ibérica, la hipótesis que, por el momento, parece más probable es la del contacto primario (Gündüz et al. 2001), es decir la aparición y acumulación *in situ* de fusiones Robertsonianas en poblaciones situadas dentro de la área de distribución de la raza estándar.

1.4. Objetivos del trabajo

El objetivo general de la presente tesis doctoral es evaluar el grado de implicación de los cambios cromosómicos en la posible diferenciación morfológica existente en la zona de polimorfismo Robertsoniano de ratón doméstico (*Mus musculus domesticus*) del noreste peninsular. No obstante, teniendo en cuenta que los caracteres morfológicos son rasgos fenotípicos complejos, se han abordado aquellos aspectos de la variación morfológica que se han considerado de mayor interés para conocer los mecanismos subyacentes que pueden estar operando y promoviendo la diferenciación vinculada a las fusiones céntricas. De este modo, el trabajo se ha desglosado en tres grandes bloques que, a pesar de estar estrechamente relacionados, abordan perspectivas diferentes de la variación morfológica. En base a estos tres apartados principales, los objetivos concretos de la tesis son los siguientes:

- Determinar, mediante la variación en las frecuencias de ocurrencia de los rasgos no métricos y en la morfología mandibular, el grado de diferenciación fenotípica existente entre grupos cromosómicos. A su vez, a partir de los patrones de diferenciación obtenidos, evaluar la importancia relativa de los principales factores promotores de aislamiento en las zonas de polimorfismo cromosómico, a saber, diferenciación cariotípica y distancia geográfica. Puesto que los caracteres no métricos no han sido empleados hasta el momento en el estudio de sistemas Robertsonianos, un objetivo adicional es establecer el valor de estos rasgos en estudios sobre variación morfológica vinculada al polimorfismo cromosómico.

- Estimar a lo largo de la zona de polimorfismo los posibles cambios en los niveles de inestabilidad del desarrollo presuntamente promovidos por las reorganizaciones cromosómicas. Como indicadores de los niveles de inestabilidad se han calculado distintos índices de asimetría fluctuante, tanto en rasgos no métricos como en medidas mandibulares. De este modo, se pretende averiguar también si ambos tipos de variables son igualmente sensibles a factores estresantes de tipo génico.

- Determinar los patrones de integración morfológica de la mandíbula y evaluar su constancia a lo largo de la zona de polimorfismo Robertsoniano. Asimismo, averiguar la influencia que pueden ejercer los patrones de covariación de los caracteres mandibulares sobre los posibles cambios morfológicos en esta estructura ósea.

Capítulo 2. Material y métodos generales

2.1. Muestra utilizada

2.1.1. Captura de los ejemplares, cariotipado y obtención del material óseo

El presente trabajo se ha llevado a cabo estudiando la colección de esqueletos de *M. m. domesticus* depositada en el Departament de Biologia Animal de la Universitat de Barcelona. El material utilizado pertenece a animales que fueron capturados por distintos investigadores y colaboradores del grupo “Biología y parasitología de mamíferos terrestres” de la Generalitat de Catalunya (Ref. GRQ 1057) en campañas realizadas entre marzo de 1996 y julio de 1999. Todos los animales se capturaron vivos mediante trampas de tipo Sherman que fueron colocadas a última hora de la tarde y retiradas a la mañana del día siguiente. Los animales capturados fueron transportados inmediatamente al laboratorio donde se les mantuvo en cautividad durante un máximo de tres días hasta ser procesados (Sans-Fuentes 2004).

Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron a partir de células en división mitótica extraídas de la médula ósea del fémur (Ford 1966). Una vez realizadas las extensiones de los cromosomas en metafase, las preparaciones se mantuvieron 12 horas en una estufa a 37°C. Pasadas las 12 horas se procedió a la tinción de los cromosomas mediante la técnica de bandas G, siguiendo los protocolos de Evans (1987) en los animales capturados antes de 1998 y Mandahl (1992) en los capturados a partir de ese mismo año. La identificación de los cromosomas se realizó siguiendo los estándares que dicta el “Comité para la Nomenclatura Genética Estandarizada del Ratón” (Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice 1972) a partir del análisis microscópico de diez células y con la ayuda de fotografías de los cariotipos (Sans-Fuentes 2004). La limpieza del material óseo se realizó depositando las carcasas de los animales en un cultivo de larvas de derméstido (*Coleoptera: Dermestidae*).

2.1.2. Composición de la muestra

Para la presente tesis se han estudiado un total de 253 ejemplares de *M. m. domesticus* provenientes de 25 localidades distintas del noreste Peninsular, 21 de ellas pertenecientes a la zona de polimorfismo cromosómico y 4 a la zona de cariotipo estándar (véase Tabla 2-1 y Figura 2-1). Para el estudio de variación morfológica se han empleado dos tipos de caracteres, variables no métricas y medidas mandibulares. Mientras que los caracteres no métricos se registraron en un total de 119 ejemplares de *M. m. domesticus* procedentes

de 22 localidades distintas, las medidas mandibulares fueron analizadas en 227 ejemplares obtenidos en 24 localidades. En la mayor parte de animales utilizados en los análisis de caracteres no métricos se registraron también las medidas mandibulares, de modo que en 93 ejemplares se registraron ambos tipos de variables morfológicas, en 26 solamente los caracteres no métricos y en 134 sólo las medidas mandibulares.

Tabla 2-1. Coordenadas geográficas de las localidades de origen de los ejemplares analizados. Se muestran el rango de números diploides encontrados en cada una de ellas (Rango 2n), la distancia en kilómetros de dicha localidad al supuesto centro de la zona de polimorfismo (km) y el número de ejemplares de cada localidad analizados (n).

Código	Localidad	Latitud/Longitud	Rango 2n	km	n
AN	Anglesola	41° 40' N 1° 05' E	39-40	75,66	5
AV	Avinyonet	41° 22' N 1° 46' E	30-33	8,14	2
BE	Bellaterra	41° 30' N 2° 05' E	38-40	38,53	13
CA	Calaf	41° 44' N 1° 31' E	38-40	57,84	7
CF	Calafell	41° 13' N 1° 34' E	35-37	20,19	12
FU	Fulleda	41° 27' N 1° 01' E	40	70,29	19
GA	Garraf	41° 17' N 1° 50' E	28-35	5,98	24
GV	Gavà	41° 18' N 2° 00' E	29-32	22,39	7
EC	L'Espluga Calba	41° 29' N 1° 00' E	40	72,46	8
LG	La Granada	41° 22' N 1° 43' E	27-35	10,38	34
LL	La Llacuna	41° 28' N 1° 32' E	35-37	29,74	1
LR	La Riera	41° 11' N 1° 22' E	40	39,15	7
LV	Lavern	41° 23' N 1° 46' E	31-33	11,18	14
BC	Les Borges del Camp	41° 10' N 1° 01' E	40	69,15	4
LO	Les Ordes	41° 23' N 1° 24' E	38	34,37	1
LP	Les Pobles	41° 21' N 1° 24' E	37-40	33,12	19
LLP	Llorenç del Penedès	41° 17' N 1° 33' E	36-37	18,66	3
SA	Sabadell	41° 34' N 2° 06' E	38-39	44,23	7
SM	Sant Martí Sarroca	41° 23' N 1° 36' E	32-33	17,24	4
SP	Sant Pau d'Ordal	41° 23' N 1° 48' E	28-34	11,52	34
SS	Sant Sadurní d'Anoia	41° 25' N 1° 47' E	33-37	15,75	5
SC	Santa Coloma de Queralt	41° 32' N 1° 23' E	37-40	44,17	3
VA	Vallbona d'Anoia	41° 31' N 1° 42' E	37-40	27,79	4
VI	Viladecans	41° 19' N 2° 01' E	29-31	24,01	3
VG	Vilanova i la Geltrú	41° 15' N 1° 43' E	30-35	6,82	13

Se procuró que la muestra fuese representativa de la variación cromosómica existente, de modo que se seleccionaron localidades con distinto grado de introgresión en la zona de polimorfismo que además incluyesen animales cuyos cariotipos oscilaran desde los números diploides más bajos a los más altos. El origen geográfico y las características cariológicas de los individuos analizados se muestran en el Apéndice 1.

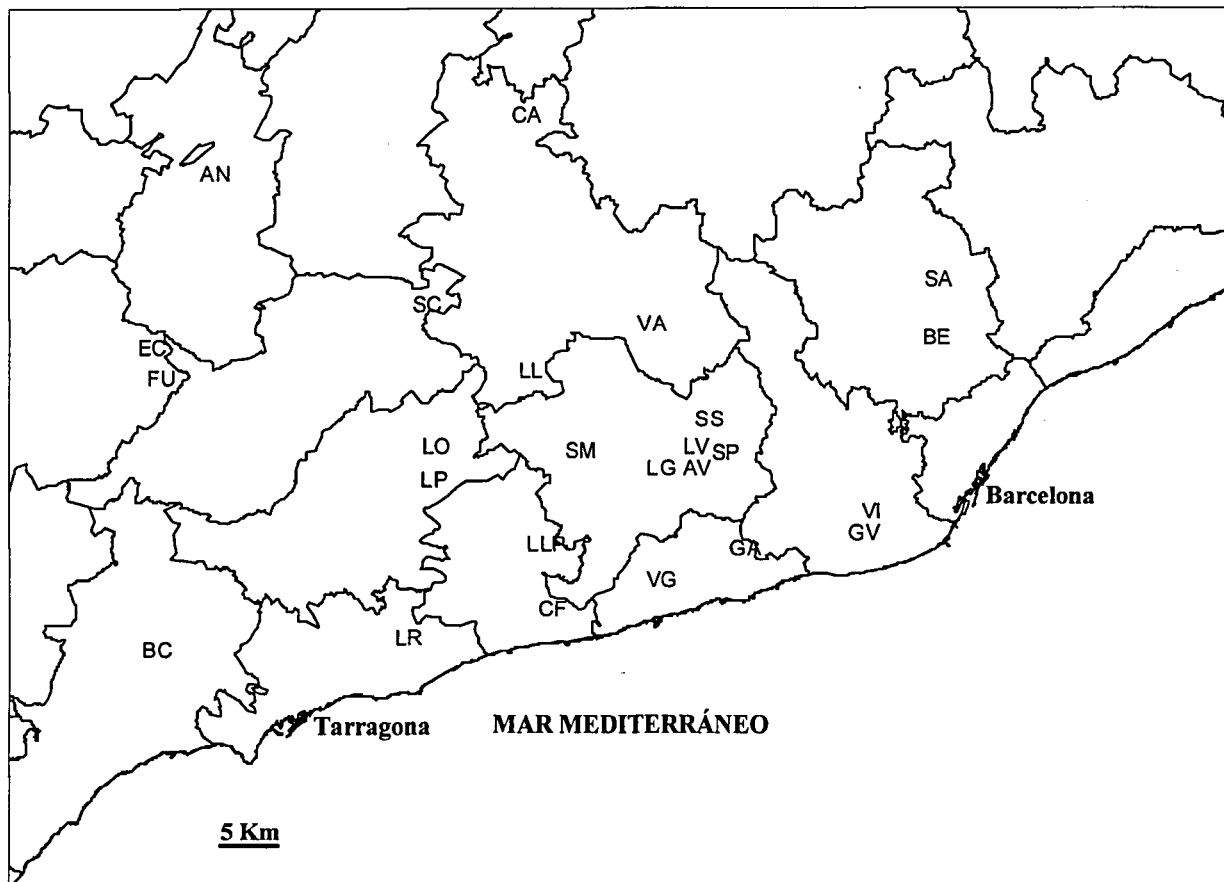


Figura 2-1. Origen geográfico de los ejemplares de *Mus musculus domesticus* analizados. Se señalan las 25 localidades de las que son originarios los animales. Todas ellas, a excepción de Fullede (FU), La Riera (LR), L'Espluga Calba (EC) y Les Borges del Camp (BC), pertenecen a la zona de polimorfismo cromosómico del noreste ibérico. Estas cuatro localidades corresponden a localidades estándar (no polimórficas) circundantes a la zona de polimorfismo cromosómico. Los códigos de las localidades, así como el rango de números diploides encontrado en cada una de ellas, la distancia al centro de la zona polimórfica y el número de ejemplares utilizados se muestran en la Tabla 2-1.

2.2. Caracteres empleados

2.2.1. Caracteres no métricos

En el estudio de los caracteres no métricos se registraron inicialmente un total de 32 rasgos del cráneo y la mandíbula, la mayoría de los cuales han sido utilizados en estudios previos de ratón doméstico, o en su defecto de otros roedores o mamíferos (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Lista de los 32 caracteres no métricos iniciales registrados para el estudio de polimorfismo con los trabajos de referencia (a excepción de aquellos que son de nueva descripción).

Carácter	Referencia
Caracteres hiperostóticos	
Nasales fusionados	Berry y Searle 1963; Sikorski 1982
Interfrontal presente	Berry 1963
Frontales fusionados	Berry 1963
Proceso pterigoideo	Berry 1963
Caracteres hipostóticos	
Huesos wormianos I	Sikorski 1982
Huesos wormianos II	nueva descripción
Frontales partidos	Berry 1963
Interparietales no fusionados	Sikorski 1982
Fontanela frontal	Berry 1963
Forámenes	
Foramen preorbital	Berry 1963
Foramen etmoidal	Sikorski 1982
Foramen frontal	Berry 1963 Andersen; y Wiig 1982
Foramen interparietal	nueva descripción
Foramen incisivo	Andersen y Wiig 1982
Foramen incisivo accesorio	Andersen y Wiig 1982
Foramen maxilar I	Berry 1963
Foramen maxilar II	Berry 1963
Foramen maxilar IV	Andersen y Wiig 1982
Foramen palatino mayor	Berry 1963
Foramen palatino menor anterior	Berry 1963
Foramen palatino menor posterior	Berry 1963
Foramen esfenoideal medio	Andersen y Wiig 1982
Foramen pterigoideo	Berry 1963
Foramen oval	Berry 1963
Foramen hipogloso	Andersen y Wiig 1982
Foramen hipogloso accesorio interno	Markowski 1993
Foramen supradentario	Sikorski 1982
Foramen mentoniano accesorio	Berry 1963
Foramen masetero	nueva descripción
Foramen del diastema	nueva descripción
Foramen post alveolar	nueva descripción
Foramen mandibular	Berry 1963

Sin embargo, cinco de estos 32 caracteres no habían sido utilizados en estudios precedentes de modo que se describen aquí por primera vez (Tabla 2-3). De estos 32 rasgos tres no presentaron variación, por lo que fueron eliminados de análisis posteriores (Donlon 2000). Estos tres caracteres fueron los huesos wormianos I -situados entre el parietal y el interparietal- (Sikorski 1982), la fontanela frontal (Berry 1963; Berry y Searle 1963) y los interparietales no fusionados (Sikorski 1982). De los 29 rasgos restantes, 3 fueron caracteres hipostóticos, 3 caracteres hiperostóticos y 23 forámenes (véase sin embargo la problemática asociada a la clasificación de los caracteres no métricos expuesta en el apartado 1.2.2.1.).

Tabla 2-3. Definición de los caracteres no métricos de nueva descripción.

Carácter	Definición
Caracteres hipostóticos	
Huesos wormianos II	Huesos pequeños simples o dobles situados en la sutura entre el hueso frontal y el parietal
Forámenes	
Foramen interparietal	Foramen bilateral situado en los márgenes laterales del interparietal
Foramen masetero	Foramen bilateral situado encima de la tuberosidad del masetero, caudalmente al foramen mentoniano (suele ser simple, a veces ausente o doble)
Foramen del diastema	Foramen bilateral situado en el margen interno del diastema inferior (es habitualmente doble, aunque en ocasiones simple o múltiple)
Foramen post alveolar	Foramen bilateral situado en la parte posterior de la región alveolar de la mandíbula, caudalmente al M ₃ (tercer molar inferior)

Con el objetivo de simplificar los análisis posteriores estos rasgos se codificaron como variables discretas, y aquellos con más de dos estados fueron dicotomizados teniendo en cuenta los estados observados (Andersen y Wiig 1982; Ventura y Sans-Fuentes 1997). En algunos casos, estados alternativos de un mismo carácter fueron considerados variables distintas para poder retener el máximo de información posible (Berry 1963; Hartman 1980). Aunque este procedimiento puede conducir al tratamiento de variables no independientes, se efectuó un estudio de correlación (véase apartado 3.2.1.3.) para detectar y eliminar las variables interdependientes. A partir de estos caracteres se extrajeron un

total de 37 variables no métricas dicotómicas (Tabla 2-4).

Tabla 2-4. Listado de los 37 caracteres dicotómicos utilizados en el análisis del polimorfismo en caracteres no métricos.

Nº	Variable dicotómica	Referencia
1	Nasales fusionados	Berry y Searle 1963; Sikorski 1982
2	Foramen preorbital doble	Berry 1963
3	Foramen etmoidal simple	Sikorski 1982
4	Foramen etmoidal triple	Sikorski 1982
5	Interfrontal presente	Berry 1963
6	Frontales partidos	Berry 1963
7	Frontales fusionados	Berry 1963
8	Foramen frontal doble	Berry 1963
9	Foramen frontal ausente	Andersen y Wiig 1982
10	Huesos wormianos II presentes	nueva descripción
11	Foramen interparietal presente	nueva descripción
12	Foramen incisivo múltiple	Andersen y Wiig 1982
13	Foramen incisivo accesorio ausente	Andersen y Wiig 1982
14	Foramen maxilar I ausente	Berry 1963
15	Foramen maxilar I doble	Berry 1963
16	Foramen maxilar II ausente	Berry 1963
17	Foramen maxilar IV ausente	Andersen y Wiig 1982
18	Foramen maxilar IV múltiple	Andersen y Wiig 1982
19	Foramen palatino mayor doble	Berry 1963
20	Foramen palatino menor anterior ausente	Berry 1963
21	Foramen palatino menor posterior ausente	Berry 1963
22	Foramen esfenoidal medio ausente	Andersen y Wiig 1982
23	Proceso pterigoideo ausente	Berry 1963
24	Foramen pterigoideo múltiple	Berry 1963
25	Foramen oval simple	Berry 1963
26	Foramen oval múltiple	Andersen y Wiig 1982
27	Foramen hipogloso doble	Andersen y Wiig 1982
28	Foramen hipogloso triple	Andersen y Wiig 1982
29	Foramen hipogloso accesorio interno presente	Markowski 1993
30	Foramen supradentario ausente	Sikorski 1982
31	Foramen mentoniano accesorio múltiple	Berry 1963
32	Foramen masetero doble	nueva descripción
33	Foramen masetero ausente	nueva descripción
34	Foramen del diastema simple	nueva descripción
35	Foramen del diastema múltiple	nueva descripción
36	Foramen post alveolar ausente	nueva descripción
37	Foramen mandibular doble	Berry 1963

2.2.2. Caracteres métricos: medidas mandibulares

Los caracteres métricos empleados fueron exclusivamente medidas mandibulares tomadas a partir de fotografías digitales. Para poder proceder a la toma de las imágenes, las dos hemimandíbulas (derecha e izquierda) de cada espécimen fueron separadas por la sínfisis mandibular. A continuación, ambas hemimandíbulas se fotografiaron por la cara lingual utilizando una cámara Pixera Professional (Pixera Corporation, Los Gatos, California, EUA) y un objetivo Nikon de 135 mm. Las fotografías fueron realizadas a una resolución de 1,2 millones de píxeles, situando las mandíbulas a una distancia constante de 53 cm (Sans-Fuentes 2004). A partir de las fotografías obtenidas y empleando la versión 1.31 del programa tpsDig (Rohlf 2001) se registraron un total de 12 puntos morfométricos en cada hemimandíbula (Figura 2-2 y Tabla 2-5). Los PMs escogidos fueron los utilizados por Bailey en su estudio sobre los genes que afectan la morfogénesis mandibular (Bailey 1986).

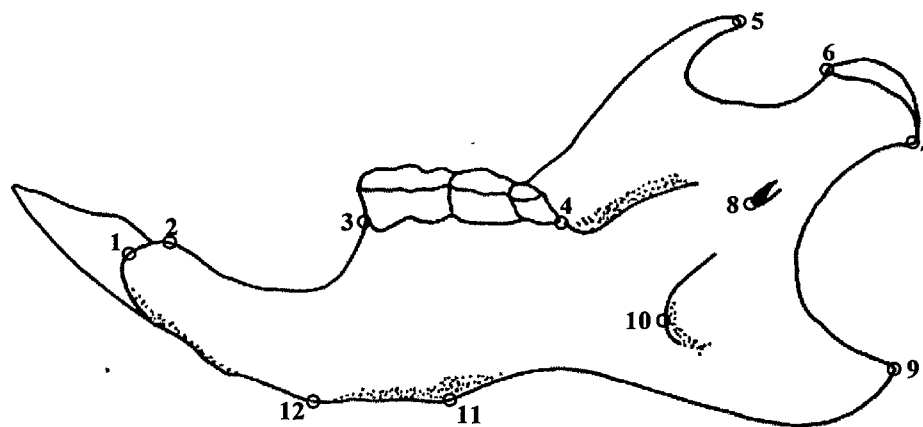


Figura 2-2. Esquema en vista lingual de la mandíbula con la localización de los 12 puntos morfométricos seleccionados.

Empleando el programa informático TMorphGen6b (Sheets 2000) se obtuvieron 24 (Figura 2-3) de las 66 posibles distancias Euclidianas (DPMs¹) entre los PMs mostrados en la Figura 2-2. Aunque 22 DPMs serían suficientes para fijar la posición relativa de 12 PMs, se seleccionaron estas 24 medidas por constituir el conjunto de medidas que cubre la superficie mandibular de la forma más eficiente para el grupo de PMs registrados (Bailey 1986). Este conjunto de variables métricas definen lo que se conoce como un esquema de triangulación (Rao y Suryawanshi 1998; Rao 2000), que se caracterizan por agrupar

¹Abreviatura adoptada para hacer referencia al término "distancia entre puntos morfométricos". En inglés se traduce como ILD (*inter-landmark distance*).

Tabla 2-5. Definición de los 12 puntos morfométricos empleados en el estudio sobre morfología mandibular.

PMs	Definición
PM-1	Punto más dorsal y anterior de la sínfisis mandibular
PM-2	Punto más dorsal y posterior de la sínfisis mandibular
PM-3	Punto más dorsal y anterior del alveolo del primer molar
PM-4	Punto más dorsal y posterior del alveolo del tercer molar
PM-5	Punto más dorsal del proceso coronoide
PM-6	Punto más dorsal del proceso condilar en la unión con el disco articular
PM-7	Punto más ventral del proceso condilar en la unión con el disco articular
PM-8	Punto más anterior del foramen mandibular
PM-9	Punto más posterior del proceso angular
PM-10	Punto más anterior a lo largo de la superficie anterior del foramen incisivo
PM-11	Tuberosidad más posterior de la inserción del músculo mandibular transverso
PM-12	Tuberosidad más anterior de la inserción del músculo mandibular transverso

medidas lo más cortas posibles (por lo que deben ser entre puntos adyacentes), que cubran todas las partes del objeto estudiado evitando solapamientos y que se tomen en diferentes direcciones sin que se crucen con otras DPMs ni formen ángulos extremadamente agudos con DPMs adyacentes (Bailey 1986; Zelditch et al. 2004). Todo ello contribuye a que los esquemas de triangulación sean considerablemente más eficaces que los esquemas clásicos de medidas, ya que describen detalladamente gran parte de la variación de forma evitando la redundancia (Zelditch et al. 2004).

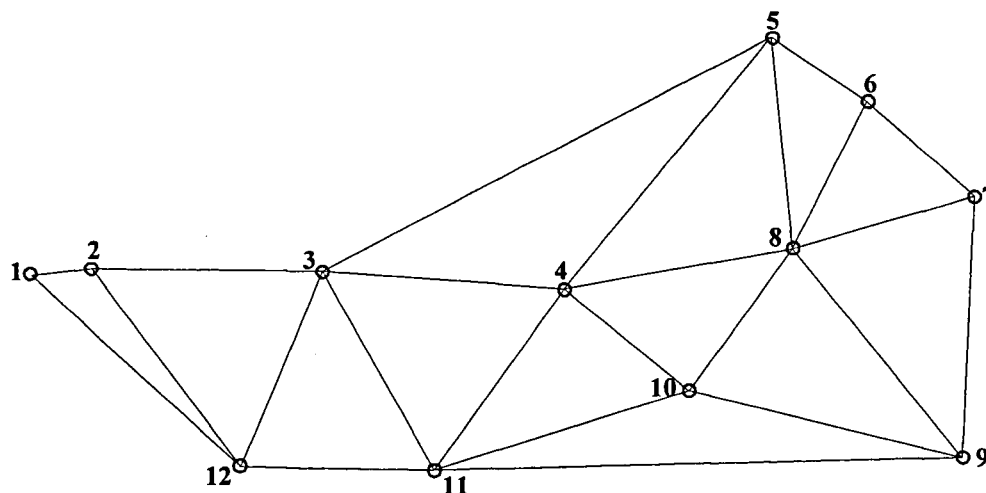


Figura 2-3. Esquema de triangulación compuesto por 24 distancias entre los 12 puntos morfométricos mostrados en la Figura 2-2.

A pesar de que la mandíbula está formada por siete subunidades morfogenéticas menores, puede dividirse en dos módulos principales (véase apartado 1.2.3.2.: la región alveolar o dentaria, y la región muscular o del ramus ascendente (Atchley y Hall 1991). Con la finalidad de poder analizar ambas regiones por separado, en los análisis comparativos 11 de los 24 caracteres fueron asignados a la región dentaria (DPMs 1–2, 1–12, 2–3, 2–12, 3–4, 3–11, 3–12, 4–10, 4–11, 10–11 y 11–12) y 11 al ramus ascendente (4–5, 4–8, 5–6, 5–8, 6–7, 6–8, 7–8, 7–9, 8–9, 8–10 y 9–10); los dos caracteres restantes (DPMs 3-5 y 9-11) conectan ambas regiones por lo que fueron considerados aparte.

2.3. Una fuente de variación no deseada: el error de medida

El error de medida se define como la variabilidad existente entre medidas (o registros) repetidas de un mismo carácter en un mismo individuo, relativa a la variación existente entre individuos de un grupo particular, y se considera una fuente importante de variación no deseada que afecta a los datos morfométricos (Bailey y Byrnes 1990). Las causas o factores que originan el error de medida son múltiples y entre ellos destacan los cambios de criterio entre observadores distintos (Palmeirim 1998), la experiencia del observador (Bailey y Byrnes 1990; Yezerinac et al. 1992; Gualdi-Russo et al. 1999), la medida y definición del carácter (Bailey y Byrnes 1990; Palmeirim 1998; Gualdi-Russo et al. 1999) o el desgaste de la estructura (Yezerinac et al. 1992). Asimismo, el error puede clasificarse atendiendo a distintos criterios. Una clasificación básica es la que distingue entre error sistemático y aleatorio (Rabinovich 1999). Mientras que el error sistemático produce un sesgo en una dirección particular, el error aleatorio produce una variación al azar, que no se orienta en ninguna dirección (Arqvist y Martensson 1998). Así, mientras el error sistemático puede confundirse con la variación biológica porque se produce de forma direccional y repetible (Arqvist y Martensson 1998), el error aleatorio añade ruido, lo que incrementa la probabilidad de los errores tipo II, o lo que es lo mismo, de aceptar una hipótesis nula falsa por falta de poder estadístico (Bailey y Byrnes 1990; Yezerinac et al. 1992). El hecho de que el error sistemático pueda confundirse con la variación de interés ha llevado a considerarlo más problemático que el error aleatorio; pero mientras que el primer tipo ocurre en situaciones particulares y existen métodos para evaluarlo y compensarlo (Rabinovich 1999), el segundo tipo de error es ubicuo y por ello un problema potencial (Arqvist y Martensson 1998). Otra clasificación habitual es la que distingue entre error debido a un mismo observador, o error intraobservador, y error debido a

observadores distintos, o error interobservador.

El error de medida ha sido estudiado tanto en caracteres métricos (Bailey y Byrnes 1990; Loughheed et al. 1991; Yezerinac et al. 1992; Palmeirim 1998), como en caracteres no métricos (Finnegan 1972; Molto 1979; Gualdi-Russo et al. 1999). En estos últimos se ha comprobado que si bien el error interobservador es una fuente importante de variación (Jamison y Zegura 1974; Page 1976), el error intraobservador es relativamente bajo o incluso nulo en muchos caracteres (Finnegan 1972; Molto 1979; Griffin 1993). Y aunque este último puede ser moderado en algunos rasgos, la posición del error no siempre provoca un error en la frecuencia utilizada en análisis posteriores ya que la dicotomización de los caracteres puede anular parte de los mismos (Finnegan 1972). En el análisis de caracteres no métricos de la presente tesis la contribución del error interobservador puede ser desestimada ya que todos los caracteres fueron registrados por el mismo observador. Referente al error intraobservador cabe destacar que ciertos estudios han detectado que la mayoría de errores son aleatorios y no sistemáticos (Molto 1979), y que además la experiencia disminuye de forma significativa la posibilidad de malinterpretar los caracteres y por tanto la incidencia del error de medida (Gualdi-Russo et al. 1999). Por esta razón el registro de los rasgos no métricos se realizó después de un período previo de aprendizaje y de familiarización con los rasgos. Adicionalmente, con la intención de evitar un posible sesgo en la toma de datos que podría desembocar en un error sistemático, tanto el registro como la codificación y dicotomización de los rasgos se realizaron sin conocer previamente a que grupo cariotípico pertenecía cada animal.

Por otro lado, en los caracteres métricos tanto el error intra como interobservador suponen una fuente importante de variación (Loughheed et al. 1991; Yezerinac et al. 1992; Palmeirim 1998). Tal y como se hizo en el caso de los caracteres no métricos, las variables fueron registradas por un único observador, por lo que la incidencia del error interobservador puede descartarse. Para evitar sesgos involuntarios en la toma de datos, los PMs se colocaron sin saber a que grupo pertenecía cada ejemplar, el orden de los mismos fue al azar y no se consultaron los datos de sesiones previas. Adicionalmente, para poder evaluar y minimizar la incidencia del error de medida la colocación de todos los PMs se realizó por triplicado en toda la muestra. Es decir que se realizaron tres sesiones independientes de colocación de PMs, cada sesión se realizó en días consecutivos y separada varios días de la siguiente sesión.

Estadísticamente el error de medida puede expresarse como el porcentaje de la variación de la muestra debido a la imprecisión en el registro de la medida, o lo que es lo

mismo, la cantidad del total de la varianza debida a la variación intraindividual respecto a la variación entre individuos (Bailey y Byrnes 1990). Con la intención de calcular estos porcentajes de error se realizó una prueba ANOVA de factores anidados con las medidas del lado derecho, de modo que se obtuvieron las varianzas intra e interindividuales (Bailey y Byrnes 1990). A partir de estos valores se calcularon los porcentajes de error de cada carácter, los cuales se muestran en el Apéndice 2. Posteriormente se calculó el valor medio de cada DPM para las tres réplicas, lo que reduce el error de medida en un 67% (Graham et al. 2003). Para el estudio de los niveles de asimetría en caracteres métricos se utilizó este valor medio de las tres réplicas de cada hemimandíbula, y además se realizó un análisis específico del error de medida respecto a la variación entre lados (véase apartado 4.4.1.1.). Sin embargo para el resto de análisis se obtuvo el valor medio de ambos lados, lo que a la práctica supone hacer el promedio para seis medidas, tres réplicas para el lado derecho y tres para el izquierdo. Hay que tener en cuenta que en los caracteres bilaterales el lado que se mide puede suponer una fuente adicional de variación intraindividual que podría afectar a los resultados en caso de existir algún tipo de asimetría (Leamy 1984), por lo que hacer la media entre los valores de ambos lados puede eliminar la variación introducida por las asimetrías (Cheverud 1996).

2.4. Corrección secuencial de Bonferroni

El hecho de trabajar con una $\alpha = 0,05$ (que es lo mismo que decir una probabilidad de error del 5%) determina que de cada veinte pruebas estadísticas relacionadas, por término medio, una sea significativa sin serlo; es decir, un falso positivo o error tipo I. Para limitar la aparición de este tipo de error, en los conjuntos de pruebas estadísticas afines se ha aplicado la corrección secuencial de Bonferroni (Rice 1989). Sin embargo, valga indicar que la aplicación estricta de esta corrección reduce drásticamente el poder de las pruebas estadísticas (Wright 1992). Por ello, para evitar hasta cierto punto esta pérdida de poder estadístico la tasa de error experimental se subió del 5% utilizado habitualmente al 10%, tal y como proponen Wright (1992) y Chandler (1995).

**Capítulo 3. Efecto del polimorfismo cromosómico sobre la
variación morfológica.**

3.1. Introducción

En la actualidad, dos son los mecanismos mediante los cuales se considera que las reorganizaciones cromosómicas pueden funcionar como barrera de aislamiento genético: la disminución de fertilidad que pueden sufrir los individuos heterocigotos para los cambios cromosómicos y la reducción de la recombinación en regiones cromosómicas próximas a las reorganizaciones en estos mismos individuos (para mayor detalle véase apartado 1.1.3.). El ratón doméstico, como organismo modelo en el estudio de la variación cariotípica, ha sido ampliamente utilizado para investigar el efecto que tienen las reorganizaciones cromosómicas en ambos mecanismos, especialmente sobre la disminución de la fertilidad (Malorni et al. 1982; Garagna et al. 1990; Britton-Davidian et al. 1990; Wallace et al. 1992; Saïd et al. 1993; Hauffe y Searle 1998; Rizzoni y Spirito 1998; Castiglia y Capanna 2000; Eaker et al. 2001; Wallace et al. 2002; Chatti et al. 2005). Aunque los heterocigotos Robertsonianos complejos (véase Figura 1-2), especialmente los machos en cuya meiosis se forman largas cadenas cromosómicas, son prácticamente estériles y sufren tasas de muerte celular elevadísimas en las líneas germinales (Searle 1993), en general los heterocigotos simples con una o pocas fusiones desapareadas presentan una fertilidad prácticamente normal o ligeramente reducida (Britton-Davidian et al. 1990; Wallace et al. 1992; Searle 1993; Underkoffler et al. 2002; Schulz et al. 2006). No obstante, la fertilidad de los heterocigotos simples disminuye a medida que el número de fusiones en heterocigosis va aumentando, tal y como lo demuestra el hecho empírico que a medida que aumenta el número de trivalentes también aumentan los problemas en el apareamiento de los cromosomas durante la profase y la metafase I, la no disyunción en la anafase I y la muerte celular en la línea germinal (Hauffe y Searle 1998; Wallace et al. 2002). Aunque este hecho parece estar ampliamente aceptado, el dilema aparece a la hora de establecer cuál es el número mínimo de fusiones en heterocigosis que producen una disminución significativa de fertilidad. Así, mientras que ciertos autores postulan que la disminución de fertilidad en los heterocigotos simples no se hace evidente en ejemplares con menos de seis metacéntricos en estado heterocigoto (Searle 1993), algunos estudios han detectado frecuencias de aneuploidía próximas al 50% en individuos con tan sólo cuatro fusiones en heterocigosis (Rizzoni y Spirito 1998). Estos resultados revelan que la disminución de fertilidad en los heterocigotos simples no depende solamente del número de metacéntricos en heterocigosis, sino que también lo hace de otros factores, como pueden ser la combinación de acrocéntricos que se unen para formar el metacéntrico

en cuestión, o las diferencias genéticas entre las poblaciones que se hibridan (Searle 1993).

En el caso particular de la zona de estudio no se han detectado metacéntricos con homología monobraquial (Sans-Fuentes 2004), lo que implica que no se puedan formar heterocigotos complejos. A pesar de ello, presumiblemente pueden encontrarse heterocigotos simples múltiples con hasta siete trivalentes, los cuales podrían sufrir importantes pérdidas de fertilidad. No obstante, valga indicar que hasta ahora no se han encontrado tales ejemplares y que solamente se ha detectado un ejemplar con seis metacéntricos en estado heterocigoto, otro con cinco y ocho con cuatro, mientras que el resto de heterocigotos han presentado un número inferior de fusiones desaparejadas (Sans-Fuentes 2004). Aún así, según se ha comentado anteriormente, la disminución de fertilidad no depende exclusivamente del número de trivalentes sino que también influyen otros factores, por lo que aún apareciendo un número relativamente bajo de metacéntricos en estado heterocigoto podrían darse reducciones significativas de fertilidad. De hecho, en la zona de polimorfismo cromosómico del noreste ibérico, el estudio comparado de la espermatogénesis en distintas clases de heterocigosidad estructural puso de manifiesto una reducción significativa de fertilidad en ejemplares con fusiones Robertsonianas, especialmente relevante en animales con tres fusiones en estado heterocigoto, los cuales aparecen en una frecuencia superior al 10% en la zona de estudio (Sans-Fuentes 2004). Los resultados obtenidos se basaron en el número de espermátocitos producidos por espermátida, método que ha sido considerado efectivo para cuantificar la muerte celular (Russell et al. 1987). Debido a que los espermátocitos se originan por división meiótica de las espermátidas, la proporción esperada para estos dos tipos celulares es de cuatro a uno del primero respecto al segundo, de tal modo que una proporción inferior será indicativa de que existe cierta tasa de muerte celular¹. En la zona de estudio los valores de $\beta:\alpha$ (véase nota al pie) difirieron significativamente entre grupos cromosómicos, siendo los heterocigotos múltiples los que presentaron valores más bajos (Figura 3-1). Así, los animales estándar, con un promedio de 3,22 espermátocitos primarios por espermátida, presentaron un valor medio significativamente más elevado que los grupos con fusiones Robertsonianas. Entre éstos, los heterocigotos triples, con un valor promedio de 2,42 espermátocitos primarios por espermátida, mostraron diferencias significativas con el resto de grupos con fusiones, los cuales presentaron valores más altos. Los dos grupos de heterocigotos simples con una única fusión en heterocigosis y el de homocigotos

¹ Denominada en inglés *Germ Cell Death*, la cual se calcula como: $100 \times [1 - (\beta \div 4\alpha)]$, siendo β el número de espermátidas redondas y α el número de espermátocitos primarios.

metacéntricos, con valores que oscilaron entre 2,95 y 2,75, no mostraron diferencias significativas entre ellos (Sans-Fuentes 2004). Todos estos resultados son indicativos de la existencia de una cierta reducción en la producción de espermatozoides en los animales con fusiones Robertsonianas, especialmente en aquellos con tres o más fusiones en heterocigosis (Sans-Fuentes 2004). Esta situación podría suponer una barrera reproductiva postcigótica que produciría una disminución del flujo genético entre poblaciones diferenciadas cariotípicamente.

El efecto de las reorganizaciones cromosómicas en la disminución de las tasas de recombinación ha sido analizado recientemente en distintas poblaciones de *M. m. domesticus* con fusiones Robertsonianas (Wallace et al. 1992; Bidau et al. 2001; Dumas y Britton-Davidian 2002; Castiglia y Capanna 2002; Panithanarak et al. 2004). Probablemente haya influido decisivamente a ello el hecho de que la disminución de la recombinación en los híbridos ha sido considerada como un mecanismo fundamental en la reducción del flujo genético entre poblaciones diferenciadas cariotípicamente (Rieseberg 2001). A pesar de que no existen datos concretos sobre los procesos de recombinación en la zona de polimorfismo aquí estudiada, los resultados obtenidos en otras zonas Robertsonianas parecen coincidir en la existencia de una recombinación menos eficiente en los animales con fusiones debido a la reducción de la recombinación y al alejamiento de los quiasmas respecto al centrómero en los bivalentes metacéntricos (Wallace et al. 1992; Bidau et al. 2001; Dumas y Britton-Davidian 2002; Castiglia y Capanna 2002; Panithanarak et al. 2004). Sin embargo, existen algunos puntos de discordancia entre estos trabajos y los realizados en condiciones de cautividad. Mientras que los experimentos basados en la introducción de metacéntricos Robertsonianos originarios de poblaciones salvajes en cepas de laboratorio de ratón doméstico han

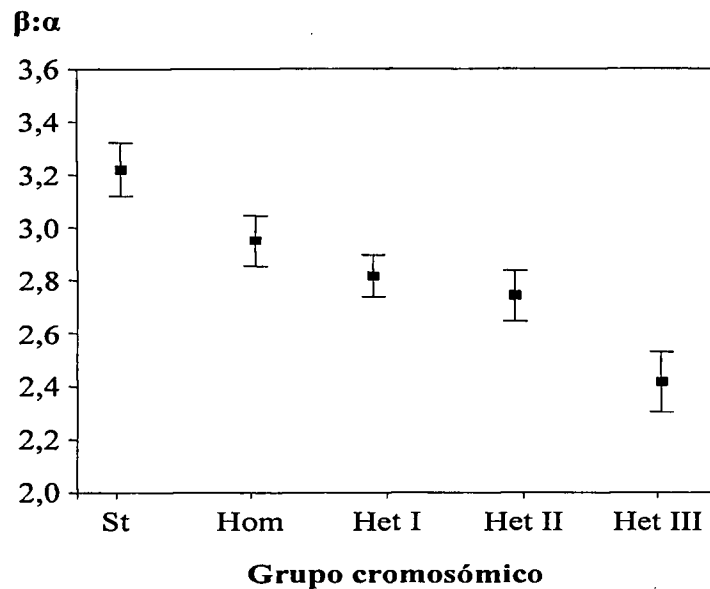


Figura 3-1. Relación espermatidas:espermatozoides por grupo de heterocigosidad estructural. St: animales con cariotipo estándar; Hom: animales con dotación cromosómica de 28 o 30 cromosomas con todos los metacéntricos en estado homocigoto; Het I: animales con $2n = 31$, cuatro metacéntricos en estado homocigoto y uno en heterocigoto; Het II: animales con $2n = 39$ y un metacéntrico en estado heterocigoto; Het III: animales con tres fusiones en heterocigosis y de una a cuatro en homocigosis (Sans-Fuentes 2004).

mostrado una supresión de la recombinación en la zona pericentromérica de ciertos metacéntricos en estado heterocigoto (Cattanach 1978; Davisson y Akeson 1993), el estudio de la recombinación en animales heterocigotos capturados en poblaciones salvajes no ha dado los mismos resultados (Bidau et al. 2001; Castiglia y Capanna 2002). En éstos se ha observado que durante la meiosis el número de quiasmas aumenta en los trivalentes originados por la unión de los metacéntricos con los acrocéntricos correspondientes, mientras que disminuye en los bivalentes (Bidau et al. 2001; Castiglia y Capanna 2002). Según algunos autores el aumento de los sitios de recombinación en estos trivalentes, especialmente en las zonas proximales e intersticiales, fracasaría a la hora de proteger las zonas pericentroméricas de la recombinación, provocando por tanto un aumento del flujo genético en dichas zonas (Bidau et al. 2001). No obstante, otros estudios apuntan que la disminución de la recombinación y de su efectividad (debido al alejamiento de los quiasmas respecto al centrómero), que ocurre en los ejemplares con reorganizaciones cromosómicas, podría limitar severamente el flujo genético de las regiones pericentroméricas desde las poblaciones estándar hacia las Robertsonianas (Dumas y Britton-Davidian 2002; Castiglia y Capanna 2002). De hecho, recientemente se ha documentado que la acumulación de diferencias genéticas entre razas cromosómicas de *M. m. domesticus* de la zona de Valtellina (en la frontera entre Alpes suizos e italianos) se ha dado primordialmente en regiones próximas a los centrómeros (Panithanarak et al. 2004). Esta misma tendencia se ha detectado en una zona de contacto amplia entre una raza Robertsoniana de 22 cromosomas y poblaciones estándar del centro de Italia (Franchini et al. 2006). Ambos estudios parecen apuntar que la disminución de la recombinación ha provocado un decremento del flujo genético en las zonas próximas a los centrómeros, promoviendo así la diferenciación en estas regiones. En consecuencia, ya sea por la supresión del cruzamiento en las regiones pericentroméricas de los metacéntricos en estado heterocigoto, o bien por la disminución y reorganización de los quiasmas debida al aumento del número de fusiones en homocigosis, lo cierto es que la alteración de los procesos de recombinación en los Robertsonianos parece limitar el intercambio genético entre poblaciones diferenciadas cariotípicamente.

Así, teniendo en cuenta que las reorganizaciones cromosómicas pueden funcionar como barrera de aislamiento genético, originando por tanto procesos de diferenciación, y que las variaciones en la morfología mandibular y en la frecuencia de ocurrencia de los caracteres no métricos pueden indicar cambios en la composición genética de las distintas poblaciones (apartado 1.2.), en el presente capítulo se pretende determinar, mediante el

análisis de la variación morfológica, si los cambios cromosómicos observados en el área de estudio pueden haber provocado una disminución del flujo genético entre poblaciones diferenciadas cariotípicamente.

No obstante, la presencia de reorganizaciones cromosómicas no es el único factor que puede funcionar como barrera de aislamiento genético en la zona de polimorfismo Robertsoniano catalana. Así, a pesar de que la zona de estudio no abarca una región muy extensa, hablando en términos de área de distribución de la subespecie, el “aislamiento por distancia”² debería considerarse como un posible factor limitante del flujo genético entre poblaciones (Wright 1943). En este sentido, cabe recordar que *M. musculus* es una especie eminentemente comensal (Silver 1995) y que los hábitats naturales le son generalmente desfavorables (Pocock et al. 2004), de modo que amplias extensiones de éstos pueden funcionar como importantes barreras geográficas. Así, aunque los ratones pueden viajar grandes distancias en asociación con los humanos (Boursot et al. 1993; Silver 1995; Pocock et al. 2005), generalmente presentan una capacidad de dispersión relativamente baja (Saïd y Britton-Davidian 1991; Boursot et al. 1993; Fragedakis-Tsolis et al. 1997; Pocock et al. 2005), especialmente aquellas poblaciones más antropófilas (Pocock et al. 2004). Además, las poblaciones comensales de *M. musculus* se organizan en unidades sociales relativamente cerradas (Silver 1995), hecho que provoca que los individuos dispersantes tengan ciertas dificultades para integrarse en las poblaciones receptoras (Anderson et al. 1964). Si bien las hembras son integradas más fácilmente que los machos, son los machos jóvenes los que presentan una mayor tendencia a la dispersión, propiciada probablemente por interacciones agresivas con los machos dominantes (Pocock et al. 2005). Aunque los estudios iniciales parecían indicar que las poblaciones de ratón estaban altamente estructuradas y subdivididas en pequeñas unidades reproductoras con poca reproducción entre ellas (llamadas demes; Anderson et al. 1964; Reimer y Petras 1967), trabajos recientes han demostrado que el aislamiento no es tan acentuado como se creía, especialmente a escala evolutiva (Pocock et al. 2005). Sin embargo, cierto grado de aislamiento podría propiciar una diferenciación genética promovida por procesos de extinción y fundación, es decir de deriva genética (Nachman y Searle 1995). De hecho, el efecto geográfico ha sido considerado con anterioridad un factor relevante en el estudio de la variación morfológica en otras zonas de polimorfismo cromosómico de ratón doméstico (Thorpe et al. 1982; Searle y Thorpe 1987; Corti y

² El término “aislamiento por distancia” (del inglés *isolation by distance*) fue introducido por Wright (1943) para describir la acumulación de diferencias genéticas locales bajo una dispersión geográfica restringida.

Thorpe 1989; Saïd et al. 1999). En particular, puesto que el flujo genético disminuye a medida que la distancia geográfica aumenta, este factor puede ser más relevante en zonas de polimorfismo (híbridas) extensas, como es el caso del área de estudio, que en zonas estrechas. Aunque la comparación morfológica de ejemplares de varias localidades estándar circundantes a la zona de polimorfismo estudiada no mostró cambios significativos de forma o de tamaño entre ellos, los resultados obtenidos mediante el análisis de la dispersión de los metacéntricos apuntaron a una dependencia de la diferenciación cromosómica respecto la distancia geográfica, siendo las poblaciones más próximas las más parecidas cromosómicamente (Sans-Fuentes 2004). Este hecho se interpretó como un indicio de que en la zona de polimorfismo Robertsoniano del noreste peninsular los ratones se dispersan siguiendo el modelo de pasadera³, en el cual la migración depende de la distancia entre las poblaciones (Kimura 1953). Sin embargo, en la zona de estudio esto no ha sido comprobado para la diferenciación morfológica. Además, a parte del interés propio que merece el aislamiento por distancia sobre los patrones de diferenciación fenotípica, el hecho de que en la zona de estudio la variación cariotípica vaya ligada a la distancia geográfica puede representar un factor de confusión a la hora de analizar el efecto de las fusiones Robertsonianas sobre los cambios morfológicos. Por todo ello, un objetivo adicional de este capítulo es establecer cual es la importancia de la distancia geográfica en el posible aislamiento y determinar si los patrones de variación morfológica concuerdan con lo observado a escala cariotípica.

3.2. Caracteres no métricos del cráneo y la mandíbula

3.2.1. Registro y análisis estadístico de los datos

3.2.1.1. Criterios de agrupación de la muestra

Los 119 animales utilizados en el estudio de caracteres no métricos (véase apartado 2.1.2. y Apéndice 1) se agruparon en función de su número diploide ($2n$) en cinco clases distintas: 40St, ejemplares con 40 cromosomas acrocéntricos procedentes de localidades estrictamente estándar; $2n = 38-40Rb$, animales de la zona de polimorfismo con ninguno, uno o dos metacéntricos; $2n = 33-37$, animales de la zona de polimorfismo con tres a siete metacéntricos; $2n = 30-32$, con ocho a 10 metacéntricos; y $2n = 28-29$, con 11 ó 12

³ Del término inglés *stepping stone model*.

metacéntricos. Esta agrupación se realizó siguiendo dos criterios básicos. En primer lugar se atendió a un criterio de introgresión en la zona de polimorfismo. Así, los grupos $2n = 28-29$ y $2n = 30-32$ están formados por animales con un elevado número de metacéntricos pertenecientes a localidades próximas al centro estimado de la zona de polimorfismo; el grupo $2n = 33-37$ está formado por animales con números diploides intermedios que se encuentran en localidades más alejadas del supuesto centro; el cuarto grupo, $2n = 38-40Rb$, por ejemplares con números diploides de 40 cromosomas o próximos a 40 capturados en localidades periféricas de la zona polimórfica; y finalmente el grupo St que incluye ratones con cariotipo estándar que pertenecen a localidades en las que no se han detectado metacéntricos. El segundo criterio de agrupación es puramente metodológico y responde estrictamente a razones de tamaño muestral. Así, los límites entre un grupo cromosómico u otro podrían haberse establecido en otros números diploides pero los tamaños muestrales hubiesen quedado claramente descompensados. De modo que los grupos establecidos en el estudio de caracteres no métricos no son exactamente los mismos que en el de caracteres métricos. En este último, al disponer de un mayor tamaño de muestra, se pudieron formar grupos con rangos más acotados.

3.2.1.2. Análisis estadísticos previos: factores de variación

Según se indicó en el apartado 1.2.2.4., en el análisis de variación en caracteres no métricos, la utilización de un elevado número de caracteres es un requisito importante para minimizar el efecto ambiental (Sjovold 1977). En consecuencia, en el presente capítulo se utilizaron un total de 37 variables (véase apartado 2.2.1.), de las cuales 31 fueron bilaterales y seis mediales. Las variables bilaterales se registraron en ambos lados, derecho e izquierdo, y sus frecuencias se calcularon en función del total de lados examinados (Green et al. 1979). Debido a que algunos cráneos presentaron partes dañadas, la frecuencia de algunos caracteres no se calculó a partir del tamaño muestral total, si no que se hizo considerando el número de lados (cráneos) registrados para el carácter en cuestión.

Teniendo en cuenta que los factores ambientales pueden afectar a los caracteres fenotípicos y que por tanto pueden sesgar los resultados y las conclusiones que de ellos se extraigan, es conveniente eliminar de posteriores análisis caracteres que se vean afectados por variables ambientales (Ansorge 2001). Por ello, antes de proceder al cálculo de las distancias fenotípicas se llevaron a cabo una serie de análisis estadísticos previos

encaminados a detectar aquellas variables susceptibles de mostrar una variación dependiente del ambiente. Con este objetivo se analizó la dependencia de cada uno de los caracteres no métricos respecto al sexo, la edad y el tamaño del cráneo (Donlon 2000). Debido a que la muestra pertenece a una zona geográfica relativamente reducida y a fin de no fragmentar demasiado la muestra, los análisis previos se realizaron sobre el total de ejemplares.

Para cada variable las diferencias entre sexos se evaluaron mediante una prueba χ^2 . En ésta y todas las sucesivas pruebas de este tipo el valor de χ^2 empleado para muestras inferiores a 20 fue el del estadístico exacto de Fisher. Cuando la frecuencia esperada de cualquiera de las celdas de la tabla de contingencia fue inferior al 5%, el valor de χ^2 se calculó mediante el ajuste de Yate (Donlon 2000).

La dependencia de cada uno de los 37 caracteres con relación a la edad se examinó también mediante una prueba χ^2 (Donlon 2000). La muestra se dividió en dos categorías de edad en función de las clases establecidas mediante el criterio del desgaste dentario propuesto por Lidicker (1966): la primera agrupó animales de las categorías 3 y 4, y la segunda animales con un desgaste dentario mayor al de la clase 4.

Con el objetivo de valorar la interdependencia entre los datos morfológicos no métricos y el tamaño general del individuo, la muestra se dividió en función de la presencia o ausencia de un determinado carácter no métrico y se compararon los valores de la longitud cóndilo-basal entre ambos grupos mediante una prueba t de Student, repitiendo el procedimiento para cada uno de los caracteres no métricos (Donlon 2000).

Aquellas variables que mostraron diferencias entre sexos, y/o entre clases de edad, y/o una asociación con la longitud cóndilo-basal fueron eliminadas de análisis posteriores.

3.2.1.3. Análisis estadísticos previos: interdependencia entre caracteres y entre lados en caracteres bilaterales

Uno de los supuestos fundamentales en el estudio cuantitativo de la frecuencia de las variables no métricas es que estas sean independientes, es decir que no estén correlacionadas entre ellas (Sikorski 1982; Hanihara et al. 2003). La interdependencia entre caracteres se calculó por separado en caracteres mediales y bilaterales mediante las pruebas de correlación de Pearson y Spearman (Sikorski 1982). Cuando un par de variables presentó una correlación significativa se optó por eliminar aquella con una menor variación entre grupos cromosómicos (Donlon 2000).

Adicionalmente, el tratamiento estadístico de los caracteres no métricos bilaterales ha sido uno de los temas metodológicos más controvertido en este tipo de estudios, ya que existen numerosos procedimientos alternativos para calcular la frecuencia de ocurrencia de éstos rasgos (Green et al. 1979). Debido a que en muchos caracteres bilaterales los valores observados en un lado están altamente correlacionados con los observados en el otro lado, calcular la frecuencia sobre el total de lados puede provocar sesgos en la varianza. Sin embargo, como en general los rasgos bilaterales no son independientes pero tampoco están perfectamente correlacionados, la utilización de ambos lados proporciona una mayor cantidad de información. Por ello se ha propuesto que el método más adecuado es el cálculo de frecuencias a partir del número total de lados pero corrigiendo por la correlación entre ambos lados (Green et al. 1979). En los 31 caracteres bilaterales empleados en este estudio, el coeficiente de correlación entre lados de un mismo rasgo se evaluó en el total de la muestra mediante la prueba de correlación de Spearman y además empleando la fórmula:

$$\Phi = \sqrt{\frac{(ad - bc)^2}{(a + b)(a + c)(d + b)(c + d)}}, (1)$$

donde a es presencia del carácter en ambos lados, b presencia en el lado izquierdo y ausencia en el derecho, c ausencia en el lado izquierdo y presencia en el derecho, y d ausencia en ambos lados (Green et al. 1979; Brasili et al. 1999). Los efectos de lateralidad se han estudiado más detalladamente en el capítulo de asimetrías (Capítulo 4).

3.2.1.4. Cálculos de frecuencias y distancias morfológicas

A continuación se calcularon las frecuencias de ocurrencia de los distintos caracteres en cada uno de los grupos cromosómicos establecidos. En aquellos casos en los que la frecuencia de ocurrencia de un carácter fue de 0 ó 1 en alguno de los grupos analizados (variables *dummy*) se realizó la siguiente corrección: cuando en un grupo de tamaño n , la frecuencia f de un determinado carácter fue $f = 0$, la frecuencia corregida f' se calculó como $f' = 1/4n$; y cuando $f = 1$, f' se calculó como $f' = 1 - 1/4n$ (Sjovold 1973).

Para los análisis posteriores sólo se utilizaron aquellas variables que mostraron cierto grado de variación entre grupos cromosómicos y se eliminaron las que mostraron una variación nula o baja, ya que considerar variables que no aportan información sólo haría que incrementara el ruido. Para ello se evaluaron mediante una prueba de χ^2 las diferencias

existentes en las frecuencias de ocurrencia de los distintos rasgos entre los dos grupos cromosómicos cuyas frecuencias fueron más dispares (Andersen y Wiig 1982). Sin embargo, teniendo en cuenta que la corrección secuencial de Bonferroni disminuye drásticamente el poder de las pruebas estadísticas (Wright 1992) y que la selección de caracteres tan sólo tiene como objetivo eliminar rasgos no informativos se optó por conservar un mayor número de variables y se escogieron aquellas que presentaron una $p < 0,05$ antes de la corrección.

Con el objetivo de estabilizar la varianza, la frecuencia de ocurrencia de cada carácter en cada subgrupo se transformó en valores angulares (Green y Suchey 1976; Green et al. 1979; Hartman 1980; McLellan y Finnegan 1990) mediante la fórmula propuesta por Freeman y Tukey (1950):

$$\theta = \frac{1}{2} \arcsin\left(\frac{1-2k}{n+1}\right) + \frac{1}{2} \arcsin\left(\frac{1-2(k+1)}{n+1}\right), (2)$$

donde k es el número de veces que aparece un determinado carácter y n es el número de ejemplares o de lados examinados.

Las distancias fenéticas entre pares de grupos cromosómicos se calcularon a partir de los valores de frecuencia transformados en radianes aplicando la medida media de divergencia (MMD) de C. A. B. Smith modificada según Green y Suchey (1976). Siendo θ la frecuencia de determinado carácter transformada en valores angulares, entonces:

$$\text{MMD} = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r (\theta_{1i} - \theta_{2i})^2 - V_{12i}, (3)$$

donde r es el número de variables considerado, θ_{1i} es la frecuencia transformada del carácter i en la población 1, θ_{2i} es la frecuencia transformada del carácter i en la población 2, y V_{12i} un factor de corrección que contempla la correlación entre ambos lados en los caracteres bilaterales. En particular, para los caracteres mediales:

$$V_{12i} = \frac{1}{n_{1i} + 0,5} + \frac{1}{n_{2i} + 0,5}, (4)$$

siendo n_{1i} el número de de ejemplares examinados para el carácter i en la población 1, y n_{2i} el número de ejemplares examinados para el carácter i en la población 2. Para los caracteres bilaterales n_{1i} y n_{2i} deben sustituirse por la expresión:

$$\frac{N_{1i}^2}{N_{1i} + 2m_{1i}\Phi_i} \text{ y } \frac{N_{2i}^2}{N_{2i} + 2m_{2i}\Phi_i} \text{ respectivamente, (5)}$$

donde N_{1i} es el número total de lados examinados para el carácter i en la población 1, m_{1i} el número de ejemplares de la población 1 con ambos lados del carácter i intactos, y Φ_i el valor del coeficiente de correlación entre ambos lados del carácter i calculado a partir de la fórmula (1). Debe destacarse que el cálculo de la MMD puede dar lugar a distancias negativas; hecho que ocurre cuando las poblaciones comparadas presentan pocas o nulas diferencias en las frecuencias de los caracteres transformadas en radianes (Sjovold 1973; Sutter y Mertz 2004). Aunque estadísticamente una distancia negativa carece de significado, en la práctica un valor negativo de MMD indica que las poblaciones comparadas presentan frecuencias muy similares en los caracteres considerados. Por esta razón, los valores negativos de MMD fueron substituidos por 0.

Con la intención de estandarizar y probar la significación estadística de las distancias obtenidas se calculó la desviación estándar de las MMDs (Andersen y Wiig 1982; Sikorski 1982; Brasili et al. 1999). La desviación estándar de la MMD se obtuvo haciendo la raíz cuadrada de la varianza de la MMD:

$$dsMMD = \sqrt{\text{varMMD}}, (6)$$

la cual a su vez se calculó mediante la fórmula:

$$\text{varMMD} = \frac{2}{r^2} \sum V_{12i}^2, (7)$$

A continuación, se obtuvieron los valores estandarizados de MMD, los cuales fueron calculados dividiendo la MMD por su desviación estándar (Sutter y Mertz 2004). Estudios previos han puesto de relieve que los valores estandarizados de MMD son más apropiados que los no estandarizados para evaluar la relación biológica entre poblaciones, especialmente cuando estas presentan distintos tamaños muestrales y algunos de los caracteres aparecen en baja frecuencia (Sjovold 1973; Sutter y Mertz 2004). Las distancias estandarizadas se consideraron estadísticamente significativas con un nivel de 0,05 si presentaban valores mayores de 2 (Sikorski 1982; Brasili et al. 1999; Sutter y Mertz 2004).

El grado de divergencia de cada grupo respecto al resto de grupos se evaluó a partir de la medida de singularidad, conocida también con las siglas MU^4 , la cual se obtiene sumando las MMDs de cada subgrupo (Andersen y Wiig 1982). La matriz de distancias morfológicas estandarizadas (stMMDs) se utilizó para realizar dos tipos de análisis de agrupación, un fenograma jerárquico mediante el algoritmo UPGMA⁵ (Sneath y Sokal

⁴ Estas siglas provienen de la expresión inglesa *measure of uniqueness*.

⁵ Del inglés *unweighted pair-group method using arithmetic averages*, que se traduce como método no ponderado de agrupación por parejas utilizando las medias aritméticas.

1973) y un análisis no jerárquico del tipo MDS⁶ no métrico, basado en la ordenación de las distancias entre puntos (Shepard y Kruskal 1964). Adicionalmente, para reflejar la estructura subyacente de los datos se calculó el algoritmo MST⁷, el cual se superpuso a la configuración tridimensional obtenida con el MDS (Gower y Ross 1969). El MST muestra las distancias entre los pares de grupos más estrechamente emparentados. Las matrices de distancias obtenidas después de realizar las agrupaciones aplicando los distintos algoritmos difieren hasta cierto punto de la matriz de distancias original. Con el objetivo de evaluar la distorsión de las primeras respecto la segunda se calcularon dos medidas de ajuste entre los dos grupos de distancias (Rohlf 1970). Estas dos medidas de ajuste fueron el estrés “s” (Kruskal 1964) y la correlación cofenética “r” (Sneath y Sokal 1973; Guiller et al. 1998). El estrés es una medida de la “imprecisión” del ajuste entre distancias originales y distancias obtenidas tras aplicar el algoritmo y se interpreta del siguiente modo: si $s \simeq 0,4$ el ajuste es pobre; si $s \simeq 0,2$ el ajuste es aceptable; si $s \simeq 0,1$ el ajuste es bueno; si $s \simeq 0,05$ es excelente; y si $s = 0,00$ el ajuste es perfecto (Kruskal 1964). El estrés sólo se calculó para el MDS no métrico. La correlación cofenética es una buena medida de la bondad de ajuste y corresponde al coeficiente r obtenido de la correlación entre los valores originales y los valores cofenéticos (Rohlf y Sokal 1981). Estos valores corresponden a las distancias euclidianas entre la matriz original y la distorsionada en el caso del MDS y las distancias ultramétricas entre ambas matrices en el caso del UPGMA (Guiller et al. 1998). La correlación cofenética se obtuvo para el UPGMA y para el MDS. Una $r \geq 0,9$ indica un nivel de ajuste muy bueno; $0,8 \leq r < 0,9$ un ajuste bueno; $0,7 \leq r < 0,8$ un ajuste pobre; y una $r < 0,7$ un ajuste muy pobre. Los métodos de ordenación, como el MDS, suelen mostrar un mejor ajuste que los de conglomerados, como el UPGMA, cuando los datos no presenten una estructura jerárquica (Rohlf 1970). Además, el escalamiento multidimensional no métrico es un procedimiento útil para producir representaciones visuales fácilmente interpretables de matrices de distancias complejas y refleja de forma fidedigna dichas matrices cuando las distancias no son euclidianas, como es el caso de MMD y stMMD (Sutter y Mertz 2004). Sin embargo, cuando los datos presenten una estructura altamente jerárquica el MDS puede presentar un ajuste bajo (Rohlf 1994). Por esta razón se realizaron ambos tipos de análisis de agrupación.

⁶ Del inglés *multidimensional scaling*, que se traduciría como ordenación multidimensional.

⁷ Del inglés *minimum-length spanning tree*, que significa árbol de expansión de longitud mínima.

3.2.1.5. Comparación de matrices

Para poder testar la relación entre la diferenciación morfológica existente y dos de sus causas potenciales, aislamiento geográfico y divergencia cariotípica, se calcularon previamente las matrices de distancia geográfica y cromosómica entre los distintos grupos. La matriz de distancias geográficas entre pares de grupos cromosómicos se obtuvo calculando las distancias euclidianas entre los centroides de los grupos cromosómicos, calculados estos últimos a partir de los valores de longitud y latitud de cada individuo. Valga indicar que aproximaciones similares han sido aplicadas en estudios filogeográficos, en los que las distancias geográficas entre taxones se definen como las distancias entre los centroides del rango geográfico ocupado por cada taxón (Taylor y Gotelli 1994; Diniz-Filho et al. 1999). Por otro lado, las diferencias cariotípicas entre los grupos cromosómicos se calcularon mediante la distancia no sesgada de Nei, la cual se estima adecuada para muestras pequeñas (Nei 1978). Para ello cada una de las fusiones se consideró como un *loci* distinto y los estados acrocéntrico y metacéntrico como alelos de este *loci*; posteriormente se calcularon las frecuencias alélicas en cada grupo cromosómico y, a partir de éstas, las distancias cromosómicas entre pares de grupos (Sans-Fuentes 2004). Para ambas matrices de distancias, geográfica y cromosómica, también se calcularon el MDS y el MST con el fin de disponer de representaciones gráficas de las afinidades entre grupos cromosómicos en función de ambas variables. De este modo, las agrupaciones obtenidas mediante las distancias morfológicas pudieron ser comparadas visualmente con las obtenidas considerando las distancias geográfica y cariotípica.

Con el objetivo de evaluar el grado de correlación existente entre pares de matrices de distancia se aplicó el procedimiento permutacional de Mantel (Mantel 1967). No obstante, tal y como se ha comentado en la introducción de este capítulo, los dos principales factores que pueden intervenir en la diferenciación morfológica entre grupos cromosómicos de la zona de polimorfismo Robertsoniano peninsular, distancia geográfica y variación cromosómica, no son independientes. Por el contrario, la variación cromosómica presenta una estructuración espacial (Gündüz et al. 2001; Sans-Fuentes 2004), por lo que el efecto del aislamiento por distancia podría confundirse con el producido por la diferenciación cariotípica. Por esta razón, con el objetivo de evaluar separadamente el efecto que ambos factores pueden tener en la diferenciación morfológica se utilizó además la prueba parcial de Mantel (Smouse et al. 1986; Oden y Sokal 1992). Esta prueba permite evaluar la correlación existente entre dos matrices teniendo en cuenta la covariación de éstas con

una tercera matriz. Aunque algunos autores han criticado la utilización de esta prueba, debido a los problemas estadísticos que puede conllevar, lo cierto es que se considera de gran utilidad para descomponer la importancia relativa de los factores implicados en la estructuración de las distancias genéticas (Telles y Diniz-Filho 2005). Las significaciones de las distintas pruebas se obtuvieron comparando los valores observados del estadístico de Mantel (Z) con las distribuciones permutacionales de Z . Una distribución permutacional de Z es la que se obtiene al comparar una matriz X con todas las posibles matrices obtenidas de permutar las variables de una segunda matriz Y . En la práctica el número de permutaciones posibles es tan elevado que solamente se utiliza una muestra al azar de matrices permutadas. En el presente apartado se utilizaron 100.000 permutaciones aleatorias para establecer las distribuciones permutacionales de Z . En este tipo de prueba el nivel de significación lo marca la posición del valor observado de Z en la distribución permutacional. Así, si dicho valor excede el 95% de los valores permutacionales de Z se considera que las matrices comparadas están significativamente correlacionadas con un nivel de significación de 0,05.

Para conocer la importancia relativa de los presuntos factores implicados en la diferenciación morfológica se calcularon los coeficientes de determinación, los cuales estiman la proporción de la variabilidad explicada por la correlación. Considerando que se partió de tres matrices de distancias (morfológica, geográfica y cromosómica) y que los dos factores explicativos están interrelacionados, se tomó como modelo la terminología empleada por Telles y Diniz-Filho (2005) de modo que: a la proporción de la variación explicada solamente por el factor geográfico se le llamó a , a la variación conjunta entre factor geográfico y cromosómico b , a la explicada solamente por el factor cromosómico c y a la variación no explicada d . El coeficiente de determinación de la prueba de Mantel entre variación morfológica y geográfica (r_{mg}^2) equivale a $(a + b)$, el de la prueba entre variación morfológica y cromosómica (r_{mc}^2) a $(b + c)$, y el coeficiente de determinación múltiple, R_T^2 a $(a + b + c)$. Este coeficiente se calculó empleando la fórmula descrita por Smouse et al. (1986), donde:

$$R_T^2 = 1 - (1 - r_{mg}^2) \times (1 - r_{mc-g}^2) = 1 - (1 - r_{mc}^2) \times (1 - r_{mg-c}^2), \quad (8)$$

siendo r_{mc-g}^2 el coeficiente de correlación de la prueba parcial de Mantel entre variación

morfológica y cromosómica con la geográfica como constante, y r_{mgc}^2 entre variación morfológica y geográfica con la cromosómica como constante. De modo que la variación no explicada (d) viene dada por $1-R_T^2$ y la variación conjunta entre factor geográfico y cromosómico (b) por $(a + b) + (b + c) - (a + b + c)$.

3.2.2. Resultados

3.2.2.1. Análisis estadísticos previos

Las frecuencias de ocurrencia de los caracteres no métricos estudiados no mostraron en ningún caso diferencias significativas entre ambos sexos (Tabla 3-1), por lo que se pudo descartar la existencia de dimorfismo sexual. En consecuencia no se eliminó ningún carácter por ir ligado al sexo, y además machos y hembras fueron tratados conjuntamente en el resto de análisis.

Tabla 3-1. Frecuencias de ocurrencia de los distintos caracteres en ambos sexos y resultados obtenidos en la comparación entre machos y hembras. l: número de lados en que aparece el carácter; n: total de lados registrados.

Carácter	Machos		Hembras		χ^2	p
	l/n	%	l/n	%		
Nasales fusionados	0/56	0,0	1/63	1,6	0,00	0,953
Foramen preorbital doble	10/112	8,9	4/126	3,2	3,55	0,060
Foramen etmoidal simple	7/112	6,3	4/126	3,2	0,67	0,413
Foramen etmoidal triple	18/112	16,1	23/126	18,3	0,20	0,656
Interfrontal presente	7/56	12,5	5/63	7,9	0,68	0,409
Frontales partidos	18/56	32,1	30/63	47,6	2,95	0,086
Frontales fusionados	2/56	3,6	1/63	1,6	0,01	0,917
Foramen frontal doble	4/112	3,6	0/126	0,0	2,67	0,102
Foramen frontal ausente	0/112	0,0	1/126	0,8	0,00	0,953
Huesos wormianos presentes	1/112	0,9	7/126	5,6	2,66	0,103
Foramen interparietal presente	52/112	46,4	58/121	47,9	0,05	0,818
Foramen incisivo múltiple	14/56	25,0	19/63	30,2	0,39	0,530
Foramen incisivo accesorio ausente	33/112	29,5	31/126	24,6	0,71	0,399
Foramen maxilar I ausente	60/112	53,6	56/124	45,2	1,67	0,197
Foramen maxilar I doble	7/112	6,3	5/124	4,0	0,60	0,439
Foramen maxilar II ausente	13/112	11,6	24/126	19,0	2,50	0,114

Tabla 3-1. Continuación.

Carácter	Machos		Hembras		χ^2	p
	1/n	%	1/n	%		
Foramen maxilar IV ausente	6/112	5,4	11/126	8,7	1,02	0,313
Foramen maxilar IV múltiple	39/112	34,8	39/126	31,0	0,21	0,644
Foramen palatino mayor doble	0/112	0,0	2/126	1,6	0,39	0,530
Foramen palatino menor anterior ausente	10/110	9,1	11/126	8,7	0,01	0,923
Foramen palatino menor posterior ausente	22/95	23,2	39/116	33,6	2,78	0,095
Foramen esfenoidal medio ausente	20/55	36,4	28/62	45,2	0,93	0,334
Proceso pterigoideo ausente	97/112	86,6	112/126	88,9	0,29	0,591
Foramen pterigoideo múltiple	41/112	36,6	59/126	46,8	2,54	0,111
Foramen oval simple	5/112	4,5	4/126	3,2	0,03	0,857
Foramen oval múltiple	35/112	31,3	29/126	23,0	2,04	0,153
Foramen hipogloso doble	40/112	35,7	44/126	34,9	0,02	0,898
Foramen hipogloso triple	4/112	3,6	4/126	3,2	0,04	0,849
Foramen hipogloso accesorio interno presente	42/112	37,5	60/126	47,6	2,48	0,115
Foramen supradentario ausente	27/110	24,5	45/126	35,7	3,46	0,063
Foramen mentoniano accesorio múltiple	16/111	14,4	11/126	8,7	1,89	0,169
Foramen masetero doble	30/111	27,0	33/126	26,2	0,02	0,884
Foramen masetero ausente	34/111	30,6	47/126	37,3	1,17	0,280
Foramen del diastema simple	23/110	20,9	39/126	31,0	3,06	0,080
Foramen del diastema múltiple	11/110	10,0	20/126	15,9	1,78	0,183
Foramen post alveolar ausente	9/111	8,1	12/126	9,5	0,15	0,702
Foramen mandibular doble	2/112	1,8	4/126	3,2	0,07	0,789

El examen del efecto de la edad sobre la ocurrencia de las variables no métricas mostró que tan solo un carácter difirió significativamente entre los dos grupos de edad establecidos tras la corrección secuencial de Bonferroni (Tabla 3-2). El rasgo en cuestión fue el foramen maxilar IV múltiple, que mostró una frecuencia de ocurrencia del 45,0 % en los ejemplares más jóvenes, frente a un 20,3 % en los ejemplares de más edad. Este carácter se eliminó para el cálculo de las MMDs.

Al examinar la relación existente entre los distintos rasgos no métricos y el tamaño (longitud cóndilo-basal) se observó que sólo dos caracteres mostraron diferencias significativas en el valor medio de longitud cóndilo-basal entre los animales que presentaron y los que no presentaron el carácter (Tabla 3-3). Estos rasgos fueron el foramen palatino menor posterior ausente y el foramen pterigoideo múltiple. Sin embargo, en

ambos casos la significación desapareció tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni (apartado 2.4.).

Tabla 3-2. Frecuencias de ocurrencia de los distintos caracteres en las dos clases de edad establecidas y resultados obtenidos en la comparación entre ambas clases. l: número de lados en que aparece el carácter; n: total de lados registrados.

Carácter	Edad I		Edad II		χ^2	p
	l/n	%	l/n	%		
Nasales fusionados	0/60	0,0	1/59	1,7	0,00	0,993
Foramen preorbital doble	9/120	7,5	5/118	4,2	1,14	0,285
Foramen etmoidal simple	6/120	5,0	5/118	4,2	0,00	0,972
Foramen etmoidal triple	24/120	20,0	17/118	14,4	1,31	0,253
Interfrontal presente	6/60	10,0	6/59	10,2	0,00	0,976
Frontales partidos	26/60	43,3	22/59	37,3	0,45	0,502
Frontales fusionados	1/60	1,7	2/59	3,4	0,00	0,988
Foramen frontal doble	3/120	2,5	1/118	0,8	0,24	0,626
Foramen frontal ausente	0/120	0,0	1/118	0,8	0,00	0,993
Huesos wormianos presentes	2/120	1,7	6/118	5,1	1,22	0,270
Foramen interparietal presente	52/119	43,7	58/114	50,9	1,20	0,273
Foramen incisivo múltiple	12/60	20,0	21/59	35,6	3,61	0,058
Foramen incisivo accesorio ausente	33/120	27,5	31/118	26,3	0,05	0,831
Foramen maxilar I ausente	59/118	50,0	57/118	48,3	0,07	0,795
Foramen maxilar I doble	4/118	3,4	8/118	6,8	0,79	0,374
Foramen maxilar II ausente	18/120	15,0	19/118	16,1	0,06	0,815
Foramen maxilar IV ausente	6/120	5,0	11/118	9,3	1,68	0,196
Foramen maxilar IV múltiple	54/120	45,0	24/118	20,3	16,42	0,000
Foramen palatino mayor doble	2/120	1,7	0/118	0,0	0,49	0,485
Foramen palatino menor anterior ausente	8/118	6,8	13/118	11,0	1,31	0,253
Foramen palatino menor posterior ausente	30/102	29,4	31/109	28,4	0,02	0,876
Foramen esfenoidal medio ausente	25/59	42,4	23/58	39,7	0,09	0,765
Proceso pterigoideo ausente	110/120	91,7	99/118	83,9	3,36	0,067
Foramen pterigoideo múltiple	40/120	33,3	60/118	50,8	7,49	0,006
Foramen oval simple	2/120	1,7	7/118	5,9	1,92	0,166
Foramen oval múltiple	30/120	25,0	34/118	28,8	0,44	0,507
Foramen hipogloso doble	48/120	40,0	36/118	30,5	2,35	0,126
Foramen hipogloso triple	4/120	3,3	4/118	3,4	0,11	0,737
Foramen hipogloso accesorio interno presente	57/120	47,5	45/118	38,1	2,13	0,144
Foramen supradentario ausente	39/118	33,1	33/118	28,0	0,72	0,396
Foramen mentoniano accesorio múltiple	14/119	11,8	13/118	11,0	0,03	0,856
Foramen masetero doble	33/119	27,7	30/118	25,4	0,16	0,687
Foramen masetero ausente	33/119	27,7	48/118	40,7	4,41	0,036
Foramen del diastema simple	29/118	24,6	33/118	28,0	0,35	0,554
Foramen del diastema múltiple	13/118	11,0	18/118	15,3	0,93	0,335
Foramen post alveolar ausente	14/120	11,7	7/117	6,0	2,37	0,124
Foramen mandibular doble	2/120	1,7	4/118	3,4	0,19	0,664

Tabla 3-3. Comparación de la longitud cóndilo-basal media (LCB_{media}) entre los ejemplares que presentan un determinado carácter y los que no lo presentan.

Carácter	Ausencia		Presencia		t	p
	n	LCB_{media}	n	LCB_{media}		
Nasales fusionados	118	20,82	1	20,23	0,08	0,937
Foramen preorbital doble	224	20,92	14	19,18	0,85	0,398
Foramen etmoidal simple	227	20,83	11	20,51	0,14	0,888
Foramen etmoidal triple	197	20,57	41	22,02	1,13	0,260
Interfrontal presente	107	20,87	12	20,33	0,24	0,814
Frontales partidos	71	21,28	48	20,14	0,81	0,420
Frontales fusionados	116	20,82	3	20,85	0,01	0,995
Foramen frontal doble	234	20,83	4	20,11	0,19	0,849
Foramen frontal ausente	237	20,82	1	20,0	0,11	0,913
Huesos wormianos presentes	230	20,83	8	20,38	0,17	0,866
Foramen interparietal presente	123	21,29	110	20,34	0,96	0,336
Foramen incisivo múltiple	86	20,99	33	20,36	0,41	0,686
Foramen incisivo accesorio ausente	174	21,08	64	20,11	0,89	0,374
Foramen maxilar I ausente	120	20,10	116	21,61	1,55	0,122
Foramen maxilar I doble	224	20,88	12	20,18	0,31	0,753
Foramen maxilar II ausente	201	20,93	37	20,21	0,54	0,588
Foramen maxilar IV ausente	221	20,89	17	19,95	0,50	0,619
Foramen maxilar IV múltiple	160	20,71	78	21,04	0,32	0,750
Foramen palatino mayor doble	236	20,81	2	21,00	0,03	0,973
Foramen palatino menor anterior ausente	215	20,89	21	20,33	0,32	0,746
Foramen palatino menor posterior ausente	150	20,22	61	22,86	2,22	0,027
Foramen esfenoidal medio ausente	69	20,12	48	21,79	1,18	0,242
Proceso pterigoideo ausente	29	20,64	209	20,84	0,14	0,892
Foramen pterigoideo múltiple	138	19,98	100	21,97	2,04	0,042
Foramen oval simple	229	20,85	9	19,98	0,34	0,731
Foramen oval múltiple	174	21,09	64	20,09	0,91	0,363
Foramen hipogloso doble	154	21,35	84	19,84	1,50	0,136
Foramen hipogloso triple	230	20,85	8	19,96	0,33	0,740
Foramen hipogloso accesorio interno presente	136	20,75	102	20,91	0,16	0,877
Foramen supradentario ausente	164	20,77	72	20,95	0,17	0,869
Foramen mentoniano accesorio múltiple	210	20,90	27	20,17	0,48	0,631
Foramen masetero doble	174	21,01	63	20,29	0,66	0,510
Foramen masetero ausente	156	20,19	81	22,04	1,82	0,071
Foramen del diastema simple	174	21,11	62	19,99	1,02	0,308
Foramen del diastema múltiple	205	20,90	31	20,28	0,43	0,665
Foramen post alveolar ausente	216	20,91	21	19,81	0,65	0,519
Foramen mandibular doble	232	20,84	6	20,04	0,26	0,796

En general el grado de interdependencia entre caracteres fue bajo. Así, en los caracteres bilaterales tan solo 38 de los 465 coeficientes de correlación calculados entre pares de variables, es decir un 8,17%, fueron significativos. Es más, tras la corrección secuencial de Bonferroni solamente tres mantuvieron esta significación, lo que indica que los valores de p previos a la corrección fueron elevados (próximos a 0,05) en la mayoría de las significaciones. Además, los valores de los coeficientes de correlación entre caracteres oscilaron entre 0,42 y 0,0002, con un valor medio de 0,062. En los caracteres mediales no se obtuvo ninguna correlación significativa y el valor medio de los coeficientes fue de 0,084 (con un máximo de 0,151 y un mínimo de 0,015). De este modo, considerando el grado de interdependencia entre caracteres y atendiendo al criterio de variabilidad entre grupos (véase más arriba y Tabla 3-5) se eliminaron tres rasgos para los cálculos de las MMDs: foramen frontal doble, foramen supradentario ausente y foramen masetero ausente.

En cuanto a la asociación entre ambos lados en los caracteres bilaterales destacar que 21 de los 31 rasgos mostraron valores significativos tras la corrección de significación (Tabla 3-4). Además, los valores de los coeficientes de correlación oscilaron entre 0,015 y 0,741 con un promedio de 0,321, lo que indica un grado intermedio de asociación entre ambos lados. Por esta razón, las MMDs de los caracteres bilaterales se calcularon aplicando la corrección propuesta por Green et al. (1979).

Tabla 3-4. Asociación entre el lado derecho y el lado izquierdo en caracteres no métricos bilaterales; a indica el número de ejemplares con presencia del carácter en ambos lados, b los que presentan el carácter en el lado izquierdo pero no en el derecho, c los que lo presentan en el derecho pero no en el izquierdo, y d los que no lo presentan en ningún lado.

Carácter	a	b	c	d	Φ	p
Foramen preorbital doble	3	3	5	108	0,398	0,000
Foramen etmoidal simple	0	6	5	108	0,048	0,602
Foramen etmoidal triple	8	15	10	86	0,269	0,003
Foramen frontal doble	0	1	3	115	0,015	0,873
Foramen frontal ausente	0	0	1	118	-	-
Huesos wormianos presentes	3	1	1	114	0,741	0,000
Foramen interparietal presente	39	17	14	46	0,464	0,000
Foramen incisivo accesorio ausente	22	10	10	77	0,573	0,000
Foramen maxilar I ausente	37	25	17	38	0,294	0,001
Foramen maxilar I doble	2	3	5	108	0,303	0,001
Foramen maxilar II ausente	8	12	9	90	0,330	0,000
Foramen maxilar IV ausente	2	9	4	104	0,192	0,037

Tabla 3-4. Continuación.

Carácter	a	b	c	d	Φ	p
Foramen maxilar IV múltiple	20	25	13	61	0,291	0,001
Foramen palatino mayor doble	1	0	0	118	-	-
Foramen palatino menor anterior ausente	3	5	10	100	0,228	0,013
Foramen palatino menor posterior ausente	19	12	11	63	0,469	0,000
Proceso pterigoideo ausente	96	6	9	7	0,415	0,000
Foramen pterigoideo múltiple	33	18	16	52	0,414	0,000
Foramen oval simple	1	3	4	111	0,193	0,035
Foramen oval múltiple	20	12	12	75	0,487	0,000
Foramen hipogloso doble	21	31	11	56	0,268	0,003
Foramen hipogloso triple	0	5	3	111	0,034	0,716
Foramen hipogloso accesorio interno presente	28	24	22	45	0,211	0,021
Foramen supradentario ausente	19	15	19	64	0,320	0,000
Foramen mentoniano accesorio múltiple	6	9	6	97	0,377	0,000
Foramen masetero doble	15	16	16	71	0,300	0,001
Foramen masetero ausente	25	10	21	62	0,432	0,000
Foramen del diastema simple	15	19	13	70	0,303	0,001
Foramen del diastema múltiple	4	9	13	91	0,163	0,079
Foramen post alveolar ausente	5	4	7	102	0,431	0,000
Foramen mandibular doble	1	3	1	114	0,338	0,000

3.2.2.2. Frecuencias y distancias morfológicas

Las frecuencias de cada uno de los rasgos para los distintos grupos cromosómicos se muestran en la Tabla 3-5 (aunque se indiquen las frecuencias de los 37 rasgos las correspondientes a los cuatro caracteres eliminados previamente no se tuvieron en cuenta). Once, de los 33 caracteres mostraron frecuencias significativamente distintas entre al menos dos grupos cromosómicos; estos rasgos se citan a continuación: foramen preorbital doble, foramen etmoidal simple, interfrontal presente, frontales partidos, foramen interparietal presente, foramen maxilar I ausente, foramen pterigoideo múltiple, foramen hipogloso doble, foramen mentoniano accesorio múltiple, foramen masetero doble y foramen del diastema simple. Estos rasgos fueron los que se emplearon para el cálculo de las distancias morfológicas y los análisis derivados de éstas, mientras que los 22 caracteres restantes fueron eliminados de análisis posteriores.

Tabla 3-5. Frecuencias de ocurrencia de los 37 caracteres no métricos dicotómicos en los distintos grupos cromosómicos. l: número de lados en que aparece el carácter; n: total de lados registrados. Los nombres de los caracteres asociados a la numeración se muestran en la Tabla 2-4.

Carácter	28-29	30-32	33-37	38-40Rb	40St	χ^2	p
	l/n	l/n	l/n	l/n	l/n		
1	0/28	1/30	0/15	0/19	0/27	0,00	0,972
2	3/56	7/60	1/30	3/38	0/54	6,71	0,010
3	2/56	2/60	4/30	2/38	1/54	4,54	0,033
4	13/56	8/60	4/30	6/38	10/54	1,91	0,167
5	0/28	2/30	1/15	4/19	5/27	6,02	0,014
6	10/28	6/30	8/15	8/19	16/27	9,24	0,002
7	1/28	0/30	0/15	0/19	2/27	2,30	0,129
8	3/56	0/60	0/30	1/38	0/54	1,52	0,218
9	0/56	1/60	0/30	0/38	0/54	0,00	0,972
10	0/56	5/60	2/30	1/38	0/54	3,07	0,080
11	18/56	26/58	11/30	16/34	38/54	16,07	0,000
12	7/28	6/30	5/15	7/19	8/27	1,69	0,193
13	18/56	15/60	11/30	7/38	13/54	2,87	0,090
14	21/56	26/58	13/30	19/38	37/54	10,61	0,001
15	6/56	3/58	0/30	2/38	1/54	3,46	0,063
16	7/56	10/60	8/30	5/38	7/54	2,72	0,099
17	5/56	4/60	3/30	4/38	1/54	3,27	0,071
18	16/56	11/60	10/30	10/38	31/54	18,65	0,000
19	0/56	0/60	0/30	0/38	2/54	0,62	0,430
20	4/56	6/60	3/30	2/38	6/52	1,07	0,302
21	12/54	21/53	9/26	8/28	11/50	3,80	0,051
22	12/28	14/30	4/15	8/19	10/26	1,67	0,197
23	52/56	51/60	24/30	36/38	46/54	3,51	0,061
24	18/56	31/60	11/30	13/38	27/54	4,53	0,033
25	2/56	3/60	0/30	1/38	3/54	0,44	0,509
26	16/56	16/60	8/30	11/38	13/54	0,29	0,593
27	20/56	24/60	16/30	15/38	9/54	12,40	0,000
28	4/56	2/60	0/30	2/38	0/54	2,22	0,136
29	19/56	26/60	14/30	16/38	27/54	2,92	0,088
30	20/55	22/60	8/29	15/38	7/54	8,42	0,003
31	4/56	6/60	2/29	4/38	11/54	4,08	0,043

Tabla 3-5. Continuación.

Carácter	28-29	30-32	33-37	38-40Rb	40St	χ^2	p
	l/n	l/n	l/n	l/n	l/n		
32	7/56	14/60	7/29	13/38	22/54	11,29	0,001
33	27/56	25/60	9/29	8/38	12/54	7,15	0,008
34	18/56	25/60	4/28	10/38	5/54	15,39	0,000
35	9/56	6/60	5/28	2/38	9/54	2,70	0,101
36	3/56	6/59	3/30	6/38	3/54	2,85	0,092
37	3/56	2/60	0/30	1/38	0/54	2,97	0,085

Las diez MMDs y las correspondientes desviaciones estándar obtenidas a partir de los 11 caracteres seleccionados se detallan en la Tabla 3-6. La Tabla 3-7 muestra a su vez los valores estandarizados de MMD y los valores de MU calculados a partir de aquéllos. Seis de los diez valores

Tabla 3-6. Medidas medias de divergencia (MMDs) entre grupos cromosómicos (matriz superior) y desviaciones estándar de cada MMD (matriz inferior).

Grupo cromosómico	28-29	30-32	33-37	38-40Rb	40St
28-29	-	0,024	0,031	0,069	0,226
30-32	0,021	-	0,071	0,030	0,198
33-37	0,032	0,031	-	0,003	0,126
38-40Rb	0,027	0,027	0,037	-	0,072
40St	0,022	0,022	0,032	0,028	-

estandarizados de MMD fueron mayores de 2, es decir, fueron significativos (Sutter y Mertz 2004). De estas seis distancias significativas, cuatro fueron entre el grupo estándar y el resto de grupos y las otras dos entre los grupos 28-29 y 38-40Rb, y entre 30-32 y 33-37. En general las distancias fenotípicas mostraron una tendencia a ser más elevadas en los grupos cromosómicos más distantes. La medida de singularidad (MU) más elevada la

Tabla 3-7. Medidas medias de divergencia estandarizadas (stMMDs) entre grupos cromosómicos. Los valores mayores de dos son significativos ($\alpha < 0,05$). En la última columna se muestra la medida de singularidad.

Grupo cromosómico	28-29	30-32	33-37	38-40Rb	40St	MU
28-29	-					14,733
30-32	1,137	-				13,618
33-37	0,986	2,300	-			7,315
38-40Rb	2,540	1,124	0,091	-		6,349
40St	10,071	9,057	3,939	2,595	-	25,662

presentó el grupo 40St (Tabla 3-7). A continuación, aunque con un salto cuantitativo importante, le siguieron los grupos 28-29 y 30-32, y por último los dos grupos con los valores más bajos de MU, que fueron respectivamente 33-37 y 38-40Rb.

Tanto el MDS no métrico como el UPGMA mostraron una correlación cofenética entre pobre y buena, pero muy similar en ambos casos (de 0,76 y 0,77 respectivamente), lo que indicó que ninguna de las representaciones fue claramente mejor que la otra. En cuanto a la medida de estrés, destacar que el valor obtenido para el MDS fue de 0,00 indicando poca distorsión respecto los datos originales. Ambos fenogramas pusieron también de relieve la clara diferenciación del grupo 40St en comparación con los grupos de la zona de polimorfismo. Así, el UPGMA reveló que los animales de este grupo quedaron claramente separados del conglomerado formado por los ejemplares originarios de la zona de polimorfismo (Figura 3-2); dentro de éstos se pudieron diferenciar dos subgrupos, uno constituido por animales con un número alto de fusiones, y por tanto números diploides bajos (28-29 y 30-32), y otro por ejemplares con relativamente pocas fusiones, o lo que es lo mismo, con números diploides medios o altos (33-37 y 38-40Rb).

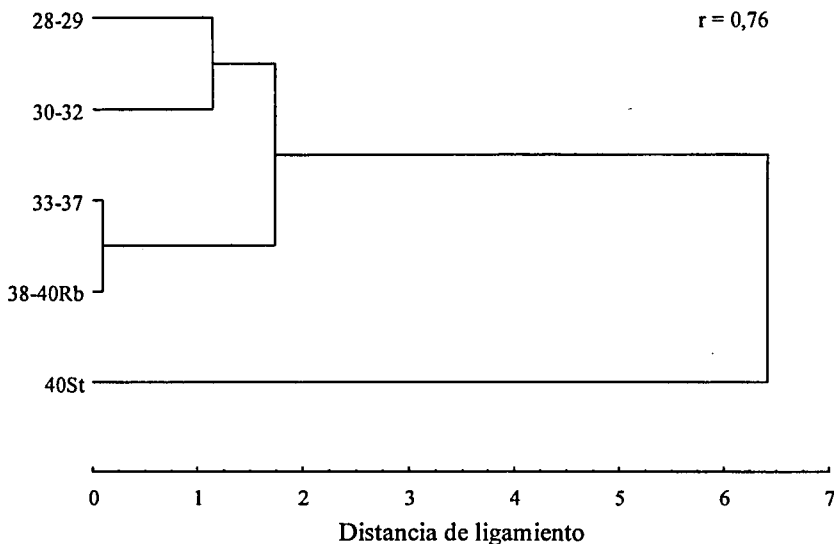


Figura 3-2. Fenograma obtenido mediante el algoritmo UPGMA en el que se muestran las afinidades entre grupos cromosómicos en función de la matriz de stMMDs (Tabla 3-6). El eje de abscisas indica las distancias morfológicas entre las distintas agrupaciones y r representa el valor de correlación cofenética.

Igualmente, la representación tridimensional obtenida mediante el MDS no métrico apuntó en la misma dirección (Figura 3-3). Así, los ejemplares procedentes de localidades estándar (40St) quedaron claramente separados de los animales originarios de la zona de polimorfismo (en la dimensión 1), incluso de aquellos más próximos cariotípica y geográficamente (38-40Rb); destacar en este sentido la evidente separación entre los primeros y los segundos en la primera dimensión del MDS y el elevado valor de MST obtenido entre 40St y su grupo más próximo, 38-40Rb (Figura 3-3). Asimismo, las dos

primeras dimensiones del MDS confirmaron la existencia de los dos subgrupos de ratones Robertsonianos detectados previamente en el UPGMA, aunque al haber añadido aquí la tercera dimensión, las relaciones entre grupos cromosómicos cambiaron ligeramente, tal y como lo muestran los valores de MST superpuestos en el gráfico tridimensional del MDS. De este modo, no se apreció el conglomerado constituido por 28-29 y 30-32 debido a que éstos divergieron claramente en la tercera dimensión, aunque sí pudo apreciarse el formado por los grupos 33-37 y 38-40Rb. Estos últimos quedaron en una posición intermedia entre los animales con un elevado número de metacéntricos y los ratones procedentes de la zona estándar.

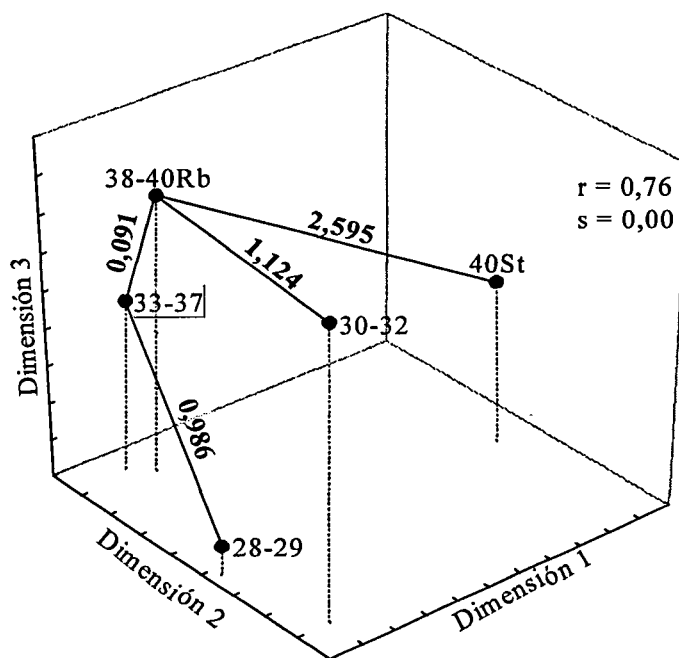


Figura 3-3. Representación tridimensional obtenida mediante el método MDS utilizando las stMMDs de la Tabla 3-6. Se han superpuesto las agrupaciones y los valores (en negrita) del MST.

3.2.2.3. Análisis de los factores de aislamiento: distancia geográfica y variación cariotípica

Tal y como se comentó en el apartado 3.2.1.5., antes de proceder a la determinación de las posibles causas de diferenciación morfológica, se calcularon las matrices de distancia geográfica y cromosómica entre pares de grupos. La localización geográfica del centroide de cada grupo cromosómico y los valores asociados de longitud y latitud se muestran en la Figura 3-4.

Asimismo, las distancias geográficas y las distancias no sesgadas de Nei entre los centroides se indican en la Tabla 3-8.

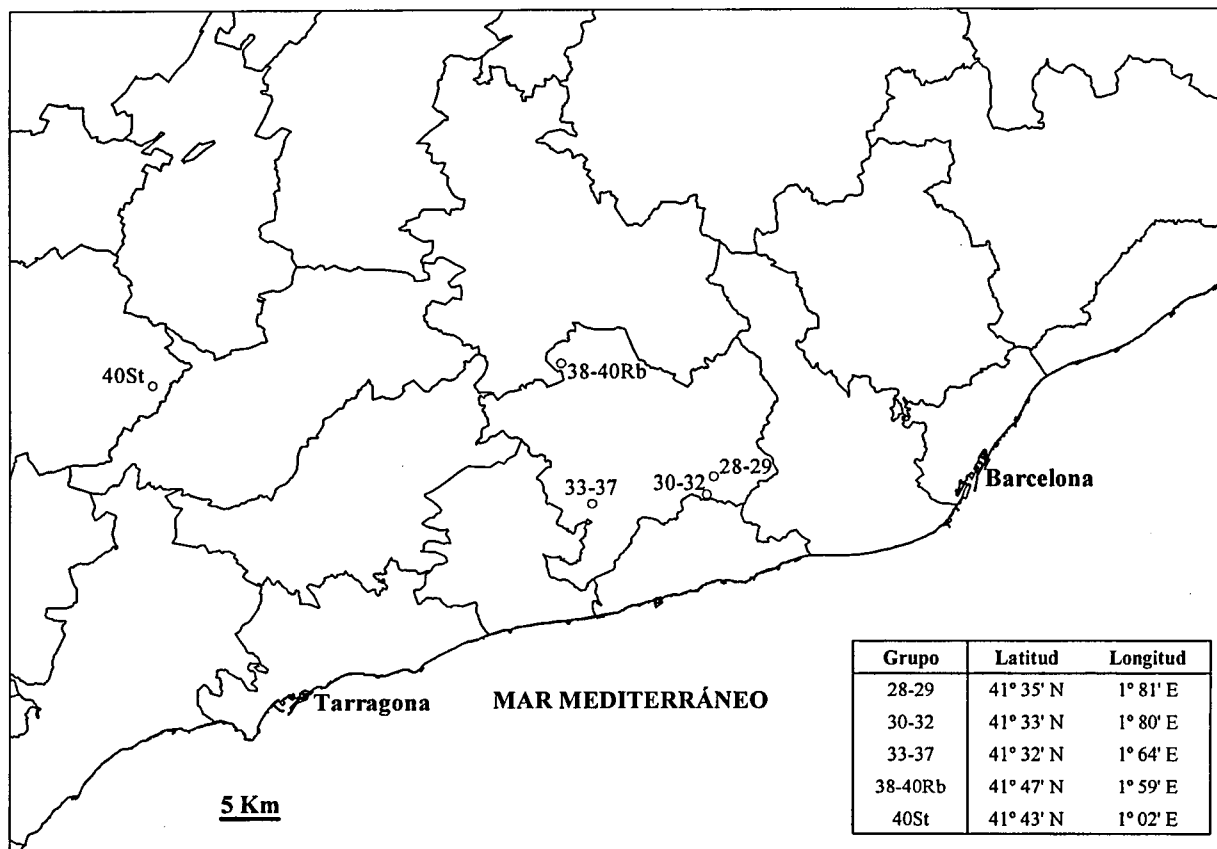


Figura 3-4. Localización geográfica de los centroides de los distintos grupos cromosómicos analizados en el estudio de polimorfismo en caracteres no métricos. En la tabla inferior se muestran las coordenadas geográficas asociadas a estos centroides.

Grupo cromosómico	28-29	30-32	33-37	38-40Rb	40St
28-29	-	0,099	0,460	1,132	1,559
30-32	2,327	-	0,168	0,620	0,913
33-37	14,685	13,530	-	0,106	0,191
38-40Rb	22,560	23,321	17,304	-	0,025
40St	66,553	66,130	53,261	47,762	-

Tabla 3-8. Distancias no sesgadas de Nei (diagonal superior) y distancias geográficas lineales en kilómetros (diagonal inferior) entre los centroides de cada grupo cromosómico.

La representación tridimensional de las afinidades entre grupos cromosómicos en función de la distancia geográfica obtenida mediante el MDS mostró una clara separación en la dimensión 1 entre 40St y el resto de grupos (Figura 3-5). No obstante, no se obtuvo el mismo resultado en el caso del MDS calculado empleando las distancias cromosómicas (Figura 3-5). En efecto, mientras que en el MST para distancia geográfica el valor más elevado, y con diferencia, fue entre 40St y 38-40Rb, en el MST para la distancia cromosómica este fue precisamente el valor más bajo. En ambos MDSs pudo observarse la agrupación entre 28-29 y 30-32, pero en el caso de las distancias geográficas la proximidad entre estos grupos fue mayor que al considerar las distancias cromosómicas

(véase también valores de MST). En general, aunque los pares de grupos cromosómicos con distancias mínimas fueron los mismos en ambos MST (los grupos más próximos fueron exactamente los mismos en ambos casos), los valores y las relaciones entre ellos fueron notablemente distintos en ambos.

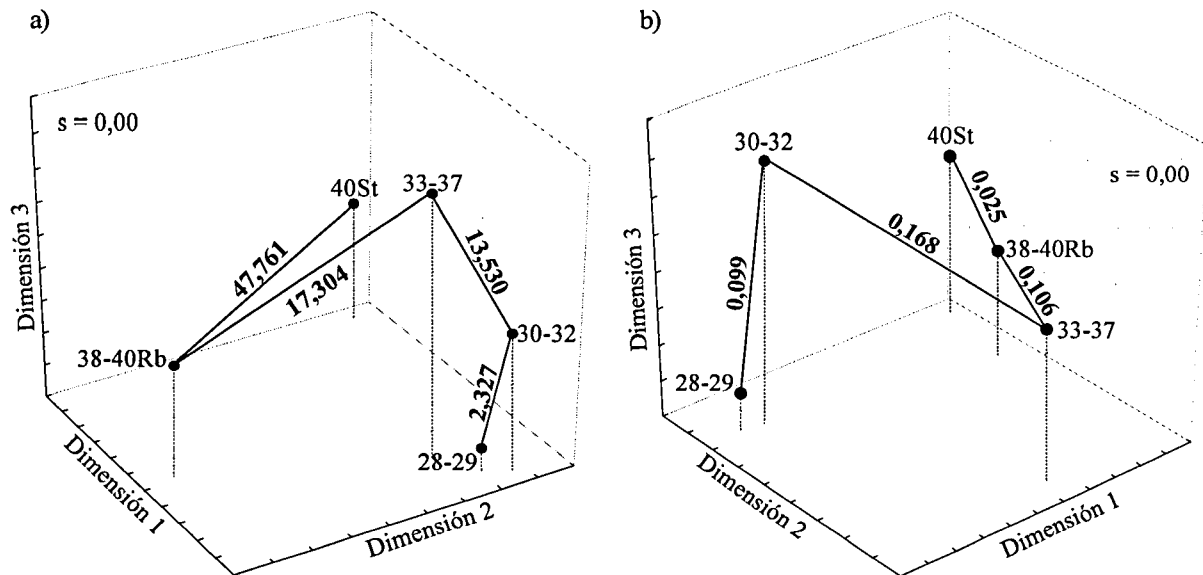


Figura 3-5. MDSs obtenidos mediante las matrices de distancias geográficas (a) y cromosómicas (b) que se muestran en la Tabla 3-8. Se han superpuesto las agrupaciones y los valores (en negrita) obtenidos por el método MST.

La comparación de las matrices predictoras con la de distancia morfológica puso de relieve que tanto la distancia geográfica como la variación cariotípica parecen influir en los cambios de las frecuencias de incidencia de los caracteres no métricos. En este sentido cabe destacar que si bien las dos pruebas de Mantel independientes entre cada una de las matrices y la matriz de distancias fenotípicas mostraron correlaciones elevadas y significativas, la prueba entre distancia morfológica y geográfica mostró un ajuste algo mejor ($r = 0,86$; $p = 0,02$) que el observado entre distancia morfológica y cromosómica ($r = 0,71$; $p = 0,04$). Aunque al comparar la matriz geográfica con la cromosómica no se detectó una correlación significativa entre ambas, el valor de α fue próximo a 0,05. Adicionalmente, estudios previos han revelado una estructuración geográfica significativa de la variación cromosómica en la zona de polimorfismo estudiada, por lo que se consideró que no se podían interpretar ambos resultados de manera independiente. Al combinar ambas matrices (geográfica y cromosómica) como predictoras de la variación morfológica mediante las pruebas parciales de Mantel, la significación entre fenotipo y distancia geográfica desapareció (aunque el valor de p se mantuvo próximo a 0,05; $r = 0,84$, $p = 0,08$), mientras que entre fenotipo y distancia cromosómica se mantuvo a pesar de disminuir perceptiblemente el coeficiente de correlación ($r = 0,66$; $p < 0,05$). El estudio de los coeficientes de determinación puso de relieve que ambos factores explicaron un

total del 86% de la variación morfológica observada ($a + b + c$), mientras que el 14% fue variación no explicada por el modelo (d ; Figura 3-6). Del total de la variación, un 35% fue explicado sólo por la distancia geográfica (a), un 40% fue explicado conjuntamente por variación geográfica y cromosómica (b), y un 11% únicamente por la variación cromosómica (c).

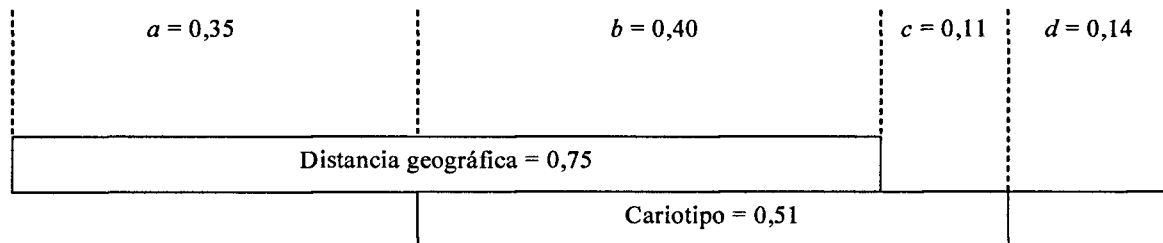


Figura 3-6. Esquema gráfico que representa los resultados de las pruebas parciales de Mantel empleando las distancias geográfica y cariotípica como variables predictoras de la divergencia morfológica entre los cinco grupos cromosómicos establecidos en el análisis de los caracteres no métricos. a , b , c y d se definen en el apartado 3.2.1.5.

3.3. Medidas mandibulares

3.3.1. Análisis estadísticos en caracteres métricos

3.3.1.1. Agrupación de la muestra

En el estudio de la variación morfométrica e escala mandibular se emplearon un total de 227 ejemplares cuya procedencia geográfica y características cariológicas aparecen descritas en el apartado 2.1.2. y en el Apéndice 1. En este caso, los animales también fueron agrupados considerando su número diploide. Sin embargo, por disponer de un mayor tamaño muestral se realizó una agrupación con rangos más acotados y categorías más homogéneas, estableciéndose un grupo más. De este modo, los ejemplares se clasificaron en seis grupos cromosómicos: 40St, animales con un $2n = 40$ procedentes de poblaciones estándar; 40Rb, animales también con cariotipo estándar pero capturados en poblaciones de la zona de polimorfismo; $2n = 38-39$, animales con uno o dos metacéntricos; $2n = 34-37$, animales con 6-3 metacéntricos; $2n = 31-33$, animales con 9-7 metacéntricos; $2n = 28-30$, animales con 12-10 metacéntricos.

3.3.1.2. Análisis estadísticos previos: normalidad, valores atípicos y factores de variación

Tal y como se expuso en el apartado 2.3., para el análisis de la variación mandibular se

utilizó el valor promedio de las dos hemimandíbulas, utilizando como valor de cada una de ellas la media de las tres réplicas realizadas. A continuación se procedió a la detección de los valores atípicos y los valores extremos, definidos respectivamente como aquéllos comprendidos entre 1,5 y 3 veces por encima o por debajo de la amplitud del cuartil, y más de tres veces por encima o por debajo de la amplitud del cuartil. Para ello se procedió a la inspección visual de los diagramas de cajas de cada carácter en los distintos grupos cromosómicos. Adicionalmente, la significación estadística de dichos valores se calculó mediante la prueba de Grubbs (Sokal y Rohlf 1995). Solamente se eliminaron aquellos valores atípicos o extremos significativos que fueron presumiblemente propiciados por daños o deformaciones en las estructuras óseas, o bien por un elevado error de medida (Palmer 1994).

Seguidamente, para detectar posibles desviaciones de normalidad en las distribuciones de valores obtenidas para cada carácter en cada grupo cromosómico se aplicó una prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de significación de Lilliefors y una prueba de Shapiro-Wilk para muestras pequeñas ($n \leq 50$; Sokal y Rohlf 1995).

Tal y como se hizo previamente en el estudio de las variables no métricas, para el análisis de las medidas mandibulares también se realizaron una serie de pruebas previas para detectar posibles factores de variación no deseados que pudieran sesgar los resultados, tales como el dimorfismo sexual, la edad o el tamaño corporal. Con el objetivo de revelar posibles diferencias entre sexos, dentro de cada grupo cromosómico se comparó la morfología mandibular de machos y hembras mediante un MANCOVA, en la que las DPMs se consideraron como variables dependientes, el sexo como factor independiente y la LCC (longitud de cabeza y cuerpo) como covariable. Adicionalmente, se evaluaron las posibles diferencias en la longitud corporal y el peso entre machos y hembras mediante ANOVAs.

La edad es otro factor que presuntamente podría influir en los cambios de morfología de la mandíbula. Aunque en teoría los estudios de variación morfológica deberían restringirse a ejemplares en idéntica etapa de crecimiento (Thorpe y Leamy 1983), en los estudios de campo esta tarea es prácticamente imposible. No obstante, en la práctica la variación ontogénica en los análisis morfométricos puede minimizarse evitando los animales más jóvenes, que son los que presentan un crecimiento más rápido (Lovell et al. 1984). Por esta razón, la muestra utilizada en este apartado sólo incluyó ejemplares de las clases de edad 3 a 8 (véase Lidicker 1966; Davis 1983; Hauffe et al. 2002). A pesar de ello, se procedió a la detección de los posibles cambios de morfología mandibular

vinculados a la edad. Para tal fin se empleó un MANCOVA con las DPMs como variables dependientes, la edad como variable predictora y la LCC como covariable. Adicionalmente, también se evaluaron las diferencias de peso y LCC de las distintas clases de edad mediante ANOVAs.

3.3.1.3. Análisis estadísticos previos: el tamaño corporal

La morfometría, por definición, implica el estudio cuantitativo de la forma en sentido amplio, la cual se descompone a su vez en dos componentes: tamaño y forma en sentido estricto⁸. Por tanto, en el estudio de la forma el análisis del tamaño es de gran relevancia. Aunque intuitivamente se entiende que la “*form*” está constituida por “*shape*” y “*size*”, lo cierto es que las medidas que se toman para estudiar la “*form*” contienen información que pertenece a una combinación de ambos componentes (Richtsmeier et al. 2002). A pesar de que se han dedicado grandes esfuerzos para desarrollar métodos que separen dichos componentes, estos intentos frecuentemente eliminan información biológica interesante de los análisis (Oxnard 1978). Por esta y otras razones, existe cierto debate alrededor de la utilización de medidas en bruto o corregidas por el tamaño en los estudios craneométricos clásicos (Burity et al. 1999). Mientras que algunos autores han aportado argumentos para la utilización de medidas corregidas por el tamaño (Corruccini 1973; Thorpe 1976) y se han propuesto numerosos métodos para alcanzar este propósito (véase Rising y Somers 1989), otros consideran difícil e incluso arbitrario separar “*size*” de “*shape*” (Bookstein 1989).

En el presente apartado se procedió en primer lugar a averiguar la posible existencia de diferencias en el tamaño corporal entre los grupos cromosómicos mediante ANOVAs individuales, utilizando la LCC y el peso corporal como variables dependientes. Las diferencias entre pares de grupos se evaluaron mediante una prueba de comparación múltiple HSD⁹ de Tukey para muestras de tamaño desigual (Spjotvoll y Stoline 1973). No obstante, aunque el tamaño de una estructura ósea concreta (como la mandíbula) depende hasta cierto punto del tamaño corporal, la existencia de diferencias en este parámetro no implica *a priori* diferencias en el tamaño de la estructura. Para estudiar la

⁸ En inglés, el concepto general de forma (forma *sensu lato*) se denomina *form*. Ésta, a su vez, está compuesta por tamaño (*size*) y forma *sensu stricto* (*shape*). En castellano no existen términos equivalentes para diferenciar entre *form* y *shape*, por lo que la terminología puede resultar confusa. Por esta razón al utilizar estos conceptos se emplearán los términos ingleses, que resultan más precisos.

⁹ Siglas que corresponden a la expresión inglesa *honestly significant difference*, que significa diferencia honestamente significativa.

variación de tamaño en la mandíbula se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de grupos múltiples con los datos transformados logarítmicamente (Thorpe 1988; Ventura et al. 2002). La primera componente principal obtenida en dicho análisis, llamada PC1 o vector medida (Thorpe 1988), se considera un buen estimador de la variación de tamaño si cumple ciertos requisitos (Bookstein 1989; Rising y Somers 1989; Dosreis et al. 1990; Dujardin et al. 1999). Las diferencias entre grupos cromosómicos en el tamaño mandibular se analizaron comparando los valores del vector medida mediante un ANOVA y una prueba HSD de Tukey. Adicionalmente, con la intención de comprobar que la existencia de diferencias entre grupos cromosómicos en la morfología mandibular no era debida exclusivamente al tamaño corporal, se realizó un MANCOVA con las DPMs como variables dependientes y la LCC como covariable. Teniendo en cuenta que la edad influye en el tamaño corporal (véase apartado 3.3.2.1.), todas estas pruebas se realizaron separadamente para las clases de edad 4 y 5 (las más representadas en la muestra analizada).

Considerando la problemática asociada a la separación entre “*size*” y “*shape*” y puesto que algunos grupos cromosómicos difirieron tanto en el tamaño corporal como en el mandibular (véase apartado 3.3.2.1.) se decidió analizar los datos corregidos y sin corregir por el tamaño, y posteriormente comparar los resultados. Así, los análisis que se detallan a continuación se llevaron a cabo por duplicado; por un lado utilizando las medidas sin corregir, y por otro utilizando los valores de los factores obtenidos en el análisis de componentes principales de grupos múltiples excluyendo el vector medida (Thorpe 1988; Ventura et al. 2002).

3.3.1.4. Obtención de distancias morfológicas y fenogramas

Con la finalidad de establecer las relaciones existentes entre grupos cromosómicos se emplearon los análisis de función discriminante y de variables canónicas. Por un lado, el discriminante se recomienda para el estudio de dos o más grupos en los que se han tomado como mínimo los valores de dos parámetros (Sokal y Rohlf 1995), ya que permite determinar cuáles son las mejores variables para discernir entre grupos y clasificar los distintos especímenes en sus grupos correspondientes (Burity et al. 1999). Por otro lado, el análisis canónico es una herramienta de gran utilidad en los estudios morfológicos en los que se comparan grupos con una elevada variabilidad individual, ya que maximiza la variación entre grupos respecto a la variación dentro de los grupos (Albrecht 1980). A

continuación se obtuvieron las distancias de Mahalanobis al cuadrado (D^2) entre los centroides de los distintos grupos cromosómicos, y a partir de éstas, calculando la raíz cuadrada, las distancias morfológicas de Mahalanobis (D). Tal y como se hizo en el estudio de los caracteres no métricos, la matriz de distancias morfológicas se empleó para elaborar dos tipos distintos de fenogramas, uno jerárquico mediante el UPGMA y uno no jerárquico aplicando el MDS. Asimismo, también se calculó el MST y se superpuso a la representación tridimensional obtenida mediante el MDS.

Según se expuso en el apartado 1.2.3.2., la mandíbula se considera una estructura compleja que puede dividirse en dos módulos funcionales principales: la región alveolar y el ramus ascendente (Atchley y Hall 1991). Con el objetivo de detectar posibles diferencias entre ambas regiones morfogenéticas en los patrones de variación entre grupos cromosómicos, todos los análisis expuestos en el presente apartado se realizaron separadamente para el total de la mandíbula, para los caracteres de la región alveolar y para los caracteres del ramus ascendente (véase apartado 2.2.2.)

3.3.1.5. Análisis de los factores de aislamiento

En los análisis de los factores de aislamiento se obtuvieron nuevamente las matrices de distancias geográficas y cromosómicas entre los distintos grupos, y a partir de éstas la representación gráfica de las afinidades entre grupos cromosómicos. Igualmente, las matrices de distancias se compararon aplicando la metodología explicada en el apartado 3.2.1.5. La comparación de matrices se realizó en cada una de las regiones mandibulares por separado y en el total de la mandíbula. Adicionalmente, se analizó el efecto geográfico y cromosómico en la variación de cada carácter por separado. Para los análisis geográficos se empleó una regresión múltiple en cada carácter, utilizando las coordenadas geográficas (longitud y latitud) del centroide del grupo como variables predictoras (Diniz-Filho et al. 1999). Para evaluar el efecto cromosómico se utilizó el método que Diniz-Filho et al. (1998) proponen emplear en estudios filogenéticos, sustituyendo la matriz de distancias filogenéticas por la matriz de distancias cromosómicas. Este método consiste en realizar un análisis de coordenadas principales (Sneath y Sokal 1973) con la matriz de distancias filogenéticas (cromosómicas en nuestro caso) a la que se le ha aplicado la transformación del doble centro¹⁰, extrayendo así unos vectores y unos valores propios. Posteriormente, debido a que los vectores propios resumen la variación entre los grupos cromosómicos,

¹⁰ Del inglés *double-center transformation*.

éstos se utilizaron como variables predictoras en análisis de regresión independientes para cada carácter (Diniz-Filho et al. 1999).

3.3.2. Resultados

3.3.2.1. Análisis estadísticos previos

Por lo que respecta a las pruebas estadísticas previas, destacar en primer lugar que aunque diecinueve ejemplares mostraron valores significativamente atípicos o extremos para algunas DPMs, ninguno de ellos fue eliminado de análisis posteriores debido a que no se encontraron evidencias de que estos valores fuesen debidos a algún tipo de error de medida o a algún desperfecto o deformación del hueso dentario (Palmer 1994). Adicionalmente, las pruebas de normalidad no rechazaron en ningún caso la hipótesis nula de que los valores poblacionales de las distintas DPMs presentasen distribuciones normales.

Respecto al dimorfismo sexual, poner de relieve que los machos y las hembras no difirieron significativamente en la longitud del cuerpo y en el peso corporal en ninguno de los grupos cromosómicos. Además, de los seis grupos estudiados mediante análisis múltiples de la covarianza (MANCOVA) solamente uno ($2n = 31-33$) mostró diferencias significativas entre machos y hembras en las medidas mandibulares ($F = 2,38$; $p < 0,05$). Teniendo en cuenta estos resultados, y para evitar reducir en exceso el tamaño muestral, se decidió analizar conjuntamente los datos correspondientes a machos y hembras.

Si bien las ANOVAs indicaron que el peso corporal y LCC difirieron significativamente entre clases de edad, el análisis múltiple de la covarianza mostró que las medidas mandibulares no lo hicieron; aunque si dependieron del tamaño corporal.

3.3.2.2. Análisis del tamaño

Tanto el peso como la longitud total del cuerpo (LCC) difirieron significativamente entre los distintos grupos cromosómicos de la clase de edad 4 ($F = 3,07$; $p < 0,05$ y $F = 3,53$; $p < 0,05$ respectivamente) pero no entre los de la clase 5. Concretamente, las diferencias en la clase 4 se detectaron entre el grupo 40St y los grupos $2n = 28-30$ y $2n = 31-33$ ($p < 0,05$ en ambos casos), indicando que los ratones estándar fueron significativamente más grandes que los que presentaron de 7 a 12 fusiones (Figura 3-7).

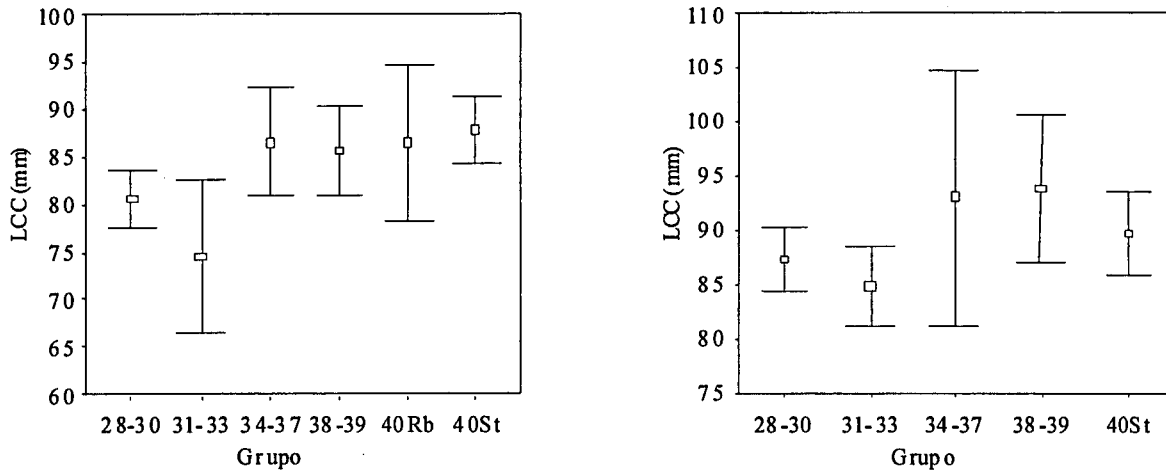


Figura 3-7. Valores de la longitud cabeza-cuerpo (LCC) de cada uno de los grupos cromosómicos en las clases de edad 4 (izquierda) y 5 (derecha). Las barras indican dos veces el error típico.

En cuanto al análisis del tamaño mandibular, poner de relieve que la PC1 acumuló el 49,19% del total de la varianza, que todos sus factores estuvieron positivamente correlacionados (es decir, que presentaron el mismo signo) y que oscilaron entre -0,307 y -0,038. Este hecho puso de manifiesto que a pesar de no acumular un porcentaje muy elevado de la varianza, el vector medida se ajustó hasta cierto punto a los requisitos de tamaño (Bookstein 1989). Al comparar los valores de PC1 entre los distintos grupos cromosómicos sólo se detectaron diferencias significativas en la clase de edad 4 ($F = 4,24$; $p < 0,01$). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey puso de relieve que dichas diferencias se dieron entre $2n = 31-33$ y $2n = 38-39$, y entre 40St y los grupos $2n = 28-30$ y $2n = 31-33$ (las 3 comparaciones con $p < 0,05$; Figura 3-8). A pesar de existir diferencias significativas de tamaño entre algunos grupos cromosómicos, la MANCOVA evidenció también la presencia de diferencias en la morfología mandibular no vinculadas al tamaño corporal ($F = 2,89$; $p < 0,05$).

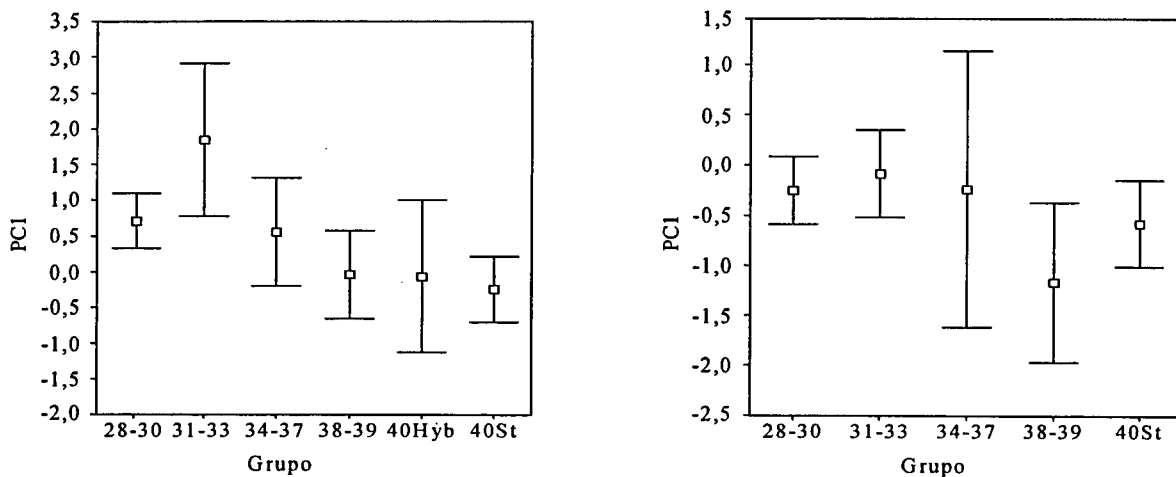


Figura 3-8. Valores de la PC1 de cada grupo cromosómico en las clases de edad 4 (izquierda) y 5 (derecha). La PC1 se correlacionó negativamente con todas las DPMs, por lo que los grupos con valores más pequeños de PC1 presentan mandíbulas más grandes.

3.3.2.3. Distancias morfológicas y patrones de diferenciación

Mandíbula completa

El análisis canónico de las medidas sin corregir por tamaño mostró que las dos primeras variables canónicas fueron significativas y que entre ambas acumularon el 77% del total de la varianza. La primera variable canónica explicó el 63% de esta varianza (lambda de Wilks = 0,26; $\chi^2 = 280,65$; gdl= 120; $p < 0,01$) y aunque implicó de manera bastante equitativa numerosas DPMs, las cinco que más se ajustaron fueron 2-3, 2-12, 3-5, 6-8 y 4-5. La varianza explicada por la segunda variable canónica fue del 14% (lambda de Wilks = 0,55; $\chi^2 = 125,06$; gdl= 92; $p < 0,05$) y las cinco DPMs que más se ajustaron a esta variación fueron por orden de importancia: 7-8, 4-5, 6-8, 8-9 y 2-3. En el análisis de variables canónicas realizado empleando las medidas corregidas por tamaño también las dos primeras variables fueron significativas, aunque en este caso el porcentaje de varianza explicado entre ambas fue ligeramente menor (73%). La primera explicó el 58% del total de la varianza (lambda de Wilks = 0,31; $\chi^2 = 246,89$; $df = 115$; $p < 0.01$), y la segunda el 15% (lambda de Wilks = 0,57; $\chi^2 = 117,40$; $df = 88$; $p < 0.05$). El análisis de función discriminante permitió clasificar correctamente el 55,95% de los individuos en las medidas sin corregir y el 57,71% en las medidas corregidas por el tamaño. En ambos análisis el grupo que presentó una mayor proporción de casos bien clasificados fue el grupo 40St, mientras que el grupo que presentó un menor porcentaje de especímenes correctamente clasificados fue 2n = 38-39 (Tabla 3-9). En ambos análisis aproximadamente el 35% de los ejemplares de este grupo fueron asignados al grupo 2n = 31-33. El resto de grupos cromosómico mostraron porcentajes intermedios de ejemplares clasificados correctamente.

De las quince distancias de Mahalanobis (D) obtenidas, ocho fueron significativas en el análisis de medidas sin corregir y siete usando las medidas corregidas después de aplicar la corrección secuencial de Bonferroni (Tabla 3-10).

Tabla 3-9. Porcentajes de ejemplares clasificados en su correspondiente grupo cromosómico en los discriminantes calculados empleando medidas sin corregir y medidas corregidas por tamaño.

Grupo cromosómico	Medidas sin corregir	Medidas corregidas
28-30	53,85	53,85
31-33	72,31	75,38
34-37	36,00	40,00
38-39	25,93	25,93
40Rb	34,78	34,78
40St	80,00	82,86
Total	55,95	57,71

Tabla 3-10. Distancias de Mahalanobis (D) entre grupos cromosómicos obtenidas para el total de la mandíbula empleando las medidas no corregidas por tamaño (diagonal superior) y las corregidas por tamaño (diagonal inferior). ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; tras la corrección secuencial de Bonferroni (N=15).

Grupo cromosómico	28-30	31-33	34-37	38-39	40Rb	40St
28-30	-	1,289	1,809*	1,836*	2,027**	3,126**
31-33	1,212	-	1,558	1,465	1,917*	2,819**
34-37	1,763*	1,576	-	1,728	1,960	2,976**
38-39	1,552	1,392	1,655	-	1,441	2,284**
40Rb	1,825*	1,883*	1,837	1,444	-	1,838
40St	2,754**	2,519**	2,590**	2,041**	1,691	-

Los árboles construidos mediante el UPGMA presentaron un ajuste bueno tanto en las medidas no corregidas como en las corregidas ($r = 0,83$ y $r = 0,81$, respectivamente). Ambos diagramas fueron similares, excepto por el hecho de que el grupo $2n = 34-37$ se agrupó con el conglomerado formado por $2n = 28-30$ y $2n = 31-33$ en las medidas no corregidas, mientras que al emplear las medidas corregidas este grupo se unió a la asociación formada por el resto de grupos de la zona de polimorfismo (Figura 3-9).

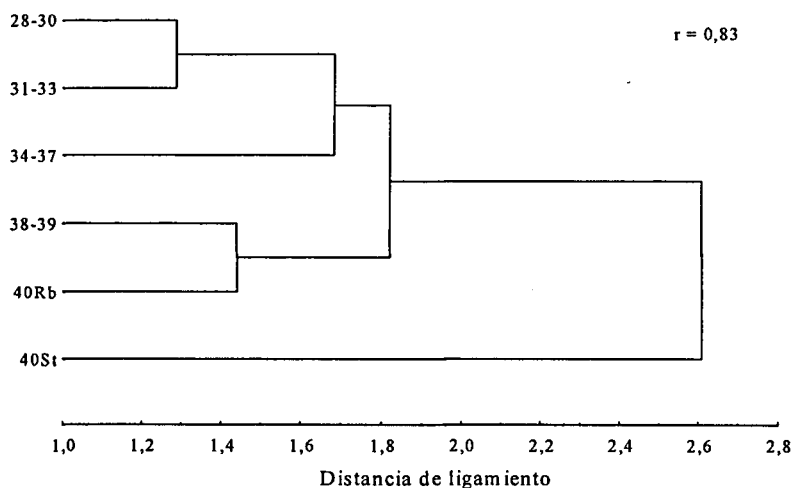
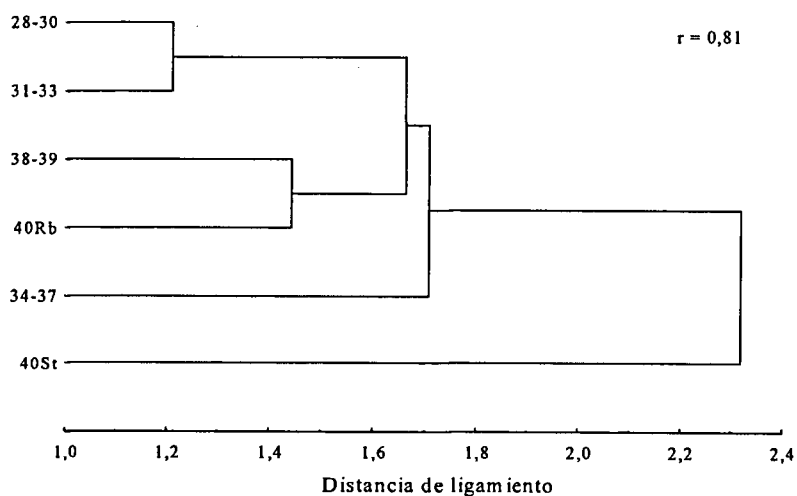


Figura 3-9. Dendrogramas obtenidos mediante el método UPGMA en los que se muestra las afinidades entre grupos cromosómicos en función de la matriz de distancias de Mahalanobis, calculada con las DPMs sin corregir por tamaño (gráfico superior) y corregidas por tamaño (gráfico inferior). En el eje de abscisas se muestra las distancias morfológicas entre las distintas agrupaciones y r representa el valor de correlación cofenética.



El MDS también mostró ajustes buenos en ambos análisis (medidas no corregidas: $r = 0,86$ y $s = 0,00$; medidas corregidas: $r = 0,87$ y $s = 0,00$). Aunque la situación de los grupos difirió en las representaciones MDS, la posición relativa entre ellos

fue similar en ambos casos (Figura 3-10). Hecho que fue corroborado por la similitud entre los valores de MST obtenidos en ambos análisis.

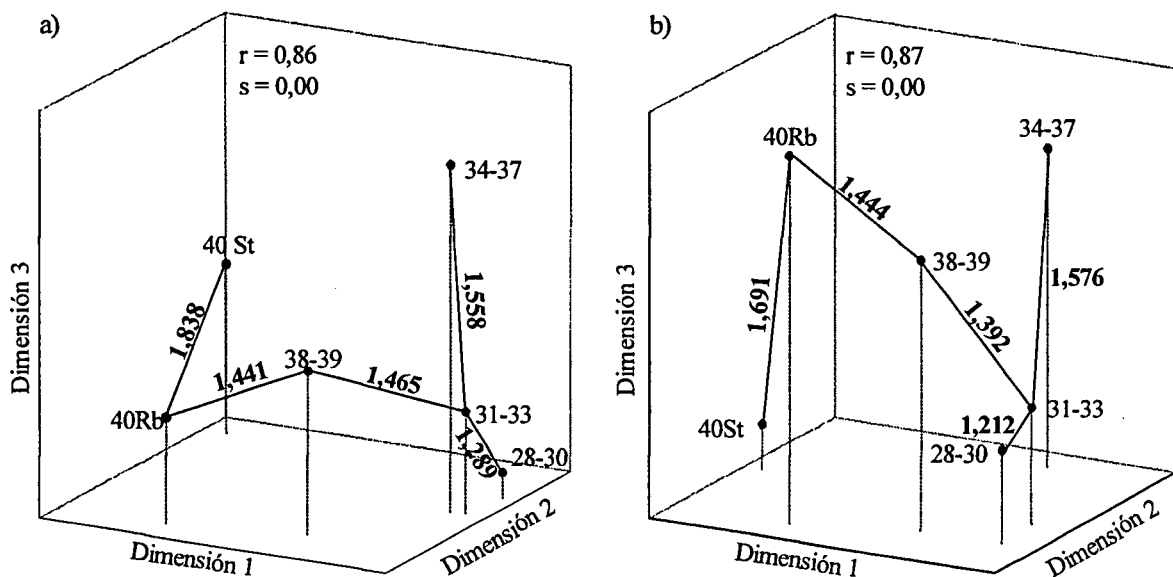


Figura 3-10. MDSs obtenidos a partir de las matrices de distancias de Mahalanobis para datos no corregidos (a) y corregidos por tamaño (b). Se han superpuesto las agrupaciones y los valores (en negrita) hallados por el método MST. La *r* muestra el coeficiente de correlación cofenética y la *s* el estrés.

Región alveolar

El análisis de variables canónicas de los caracteres de la región alveolar sin corregir por tamaño mostró un único vector significativo que acumuló el 68% de la variación (lambda de Wilks = 0,58; $\chi^2 = 118,70$; $df = 55$; $p < 0.01$). Las DPMs que más se ajustaron a la primera variable fueron 2-3 y 2-12. Igualmente, en el análisis de variables canónicas de caracteres de esta región corregidos por tamaño solamente el primer vector canónico, que acumuló el 75% de la variación, fue significativo (lambda de Wilks = 0,58; $\chi^2 = 118,70$; $df = 55$; $p < 0.01$). El análisis discriminante permitió en ambos casos clasificar en el grupo correspondiente un porcentaje de ejemplares próximo al 40%, siendo el grupo $2n = 31-33$ el que presentó una mayor proporción de especímenes clasificados correctamente (Tabla 3-11). El grupo con una porcentaje más elevado de ejemplares mal clasificados varió en el

Tabla 3-11. Porcentajes de ejemplares clasificados correctamente en los discriminantes calculados empleando medidas de la región alveolar corregidas y sin corregir por tamaño.

Grupo cromosómico	Medidas sin corregir	Medidas corregidas
28-30	34,62	30,77
31-33	64,62	70,77
34-37	20,00	8,00
38-39	18,52	3,70
40Rb	13,04	21,74
40St	62,86	60,00
Total	41,85	40,09

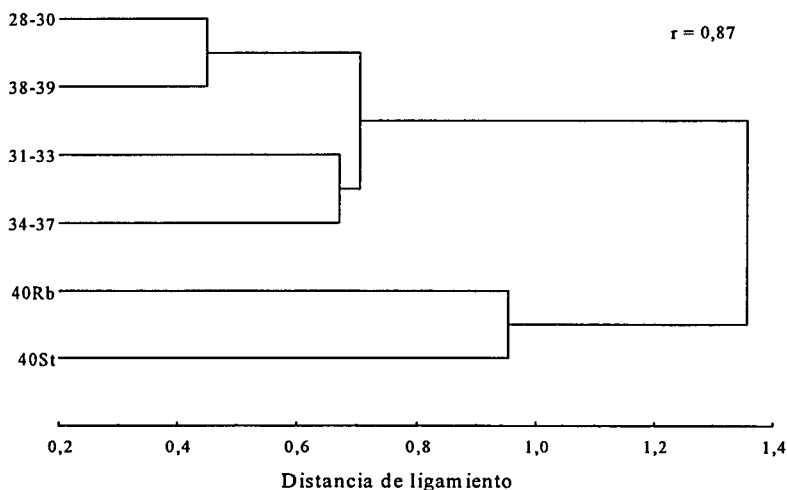
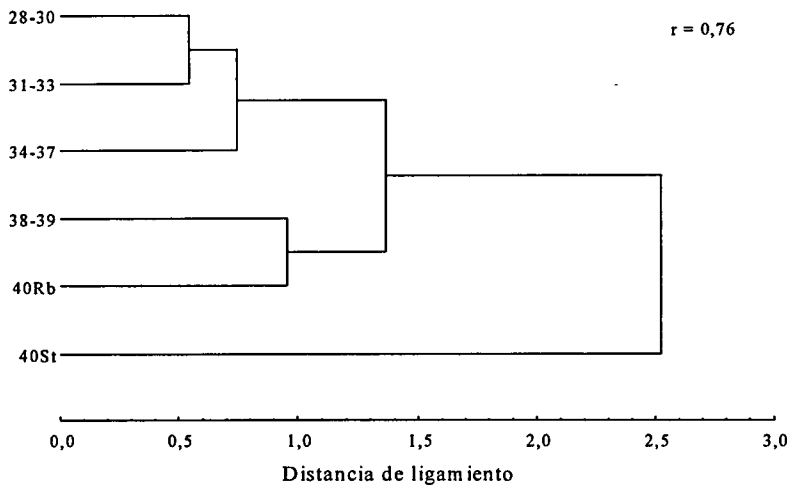
análisis de medidas sin corregir o corregidas; en el primer caso el grupo con más ejemplares incorrectamente clasificados fue 40Rb, mientras que en el segundo fue 2n = 38-39.

Las distancias morfológicas (Mahalanobis) fueron significativas en cuatro de las quince comparaciones, tanto usando las medidas no corregidas como las corregidas (Tabla 3-12). Si bien los diagramas calculados por el UPGMA fueron muy distintos entre las medidas corregidas y las no corregidas

Tabla 3-12. Distancias de Mahalanobis (D) entre grupos cromosómicos obtenidas empleando las DPMs de la región alveolar no corregidas por tamaño (diagonal superior) y corregidas por tamaño (diagonal inferior). ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; tras la corrección secuencial de Bonferroni (N= 15).

Grupo cromosómico	28-30	31-33	34-37	38-39	40Rb	40St
28-30	-	0,738	0,798	0,836	1,088	1,669**
31-33	0,622	-	0,923	0,917	1,422*	1,824**
34-37	0,771	0,670	-	1,233	1,384	1,923**
38-39	0,448	0,734	0,692	-	0,977	1,292
40Rb	1,080	1,412**	1,285	0,910	-	1,060
40St	1,496**	1,767**	1,609**	1,291	0,953	-

(Figura 3-11), el ajuste de ambos varió considerablemente. Así, mientras que en las medidas corregidas este ajuste fue bueno ($r = 0,87$), en las medidas no corregidas fue



pobre ($r = 0,76$). Esto podría indicar que el UPGMA obtenido en este último caso no es un tipo adecuado de representación gráfica, lo que provocaría las diferencias observadas entre ambas representaciones. De hecho, al atender al MDS (Figura 3-12), donde ambos ajustes fueron muy buenos (medidas no corregidas: $r = 0,92$ y $s = 0,00$; medidas

Figura 3-11. Dendrogramas obtenidos mediante el método UPGMA en los que se muestra las afinidades entre grupos cromosómicos en función de la matriz de distancias de Mahalanobis, calculada con las DPMs de la región alveolar sin corregir por tamaño (gráfico superior) y corregidas por tamaño (gráfico inferior).

corregidas: $r = 0,96$ y $s = 0,00$), se aprecia que los diagramas son mucho más parecidos entre ellos que en el caso de los UPGMAs. Así, en los dos MDS el grupo 40St quedó claramente diferenciado del resto de grupos, siendo 40Rb el más próximo (véase los valores de MST en la Figura 3-12). Además, el grupo más próximo a 40Rb, fue en ambos casos, $2n = 38-39$, y a su vez el más próximo a éste fue $2n = 28-30$.

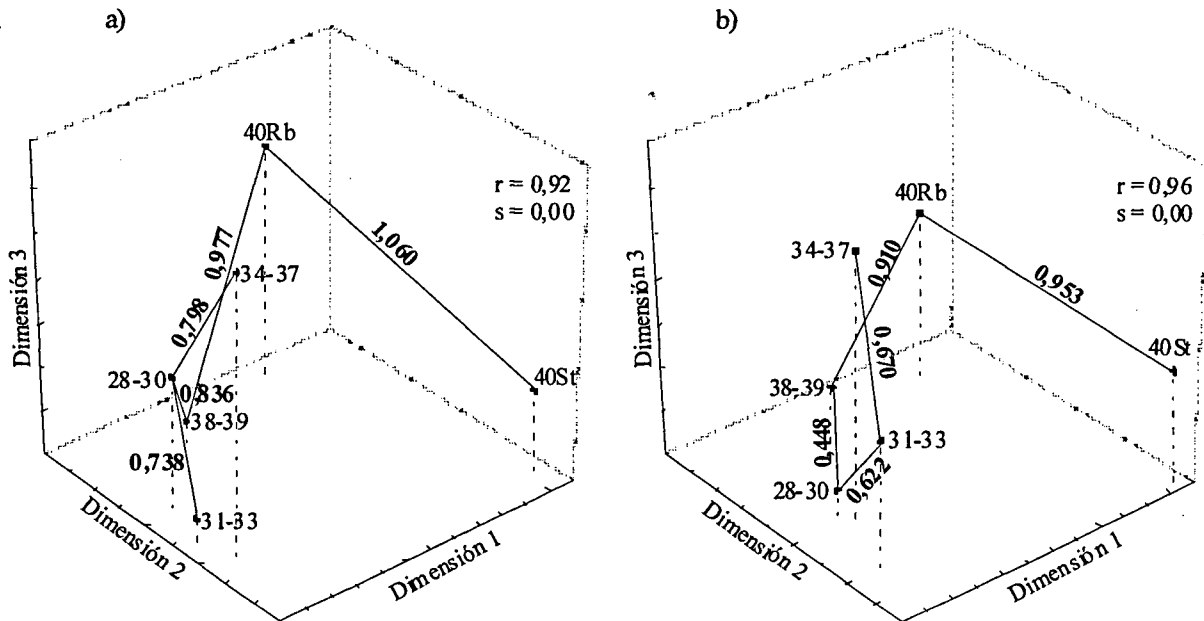


Figura 3-12. MDSs obtenidos a partir de las matrices de distancias de Mahalanobis para medidas de la región alveolar no corregidas (a) y corregidas por tamaño (b). Se han superpuesto las agrupaciones y los valores (en negrita) calculados por el método MST. La r muestra el coeficiente de correlación cofenética y la s el estrés.

Ramus ascendente

Igual que en la región alveolar, los análisis canónicos de los caracteres del ramus ascendente proporcionaron un único vector significativo. En las medidas no corregidas por tamaño el primer vector canónico acumuló el 71% de la variación ($\lambda = 0,52$; $\chi^2 = 143,44$; $df = 55$; $p < 0,01$) y en las corregidas el 69% ($\lambda = 0,57$; $\chi^2 = 122,93$; $df = 50$; $p < 0,01$). Las DPMs que más contribuyeron a la primera función canónica fueron 4-5, 6-8 y 7-8. El análisis discriminante permitió la correcta clasificación de, aproximadamente, un 40% de los casos en ambos tipos de datos (Tabla 3-13). Así, en las medidas no corregidas el

Tabla 3-13. Porcentajes de ejemplares clasificados correctamente en los discriminantes calculados empleando medidas del ramus ascendente corregidas y sin corregir por tamaño.

Grupo cromosómico	Medidas sin corregir	Medidas corregidas
28-30	55,77	50,00
31-33	66,15	61,54
34-37	28,00	24,00
38-39	11,11	7,41
40Rb	8,70	8,70
40St	54,29	54,29
Total	45,37	41,85

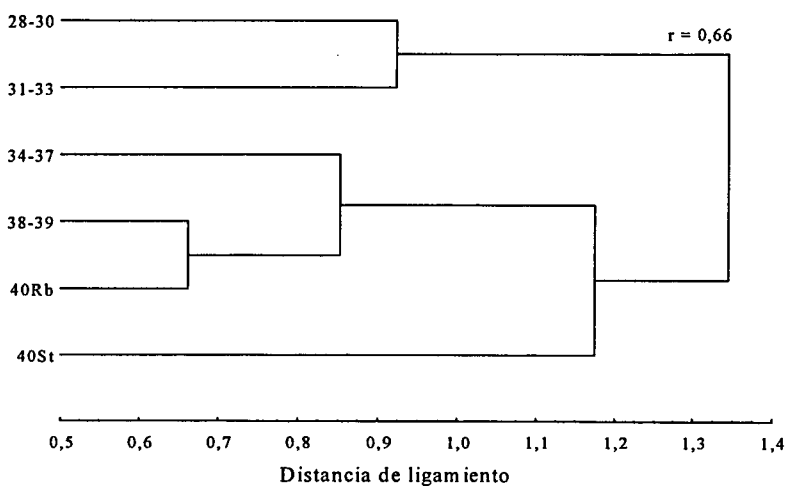
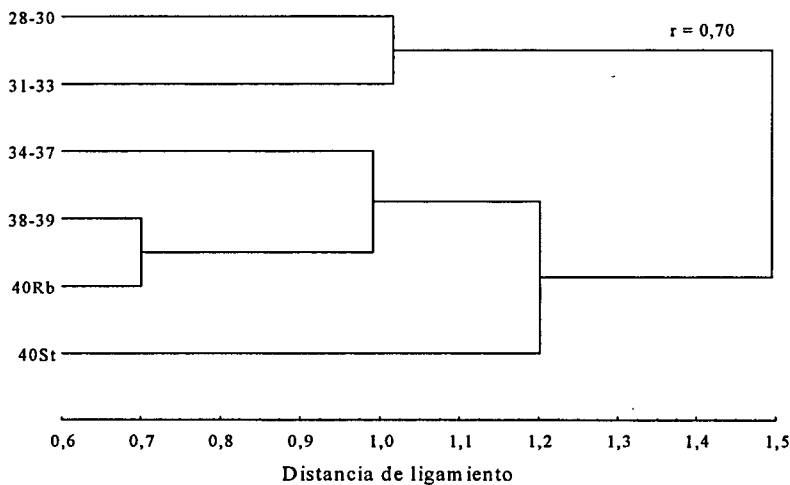
45,37% de los ejemplares fueron clasificados en el grupo correspondiente; siendo el grupo 2n = 31-33 el que presentó un porcentaje más elevado de casos bien clasificados y 40Rb el que menos. En las medidas corregidas el porcentaje total de ejemplares bien clasificados fue ligeramente menor (41,85%); aunque el grupo con el mayor porcentaje de individuos bien clasificados también fue 2n = 31-33, el menor porcentaje correspondió a 2n = 38-39.

Cinco de las quince distancias morfológicas fueron significativas cuando se usaron medidas corregidas por tamaño. No obstante, al emplear medidas no corregidas el número de significaciones ascendió a ocho (Tabla 3-14).

Tabla 3-14. Distancias de Mahalanobis (D) entre grupos cromosómicos obtenidas empleando las DPMs del ramus ascendente no corregidas por tamaño (diagonal superior) y corregidas por tamaño (diagonal inferior). ** p < 0,01; * p < 0,05; tras la corrección secuencial de Bonferroni (N= 15).

Grupo cromosómico	28-30	31-33	34-37	38-39	40Rb	40St
28-30	-	1,016*	1,449**	1,607**	1,499**	2,309**
31-33	0,922	-	1,263*	1,120	1,056	1,656**
34-37	1,374**	1,227*	-	1,101	0,881	1,413**
38-39	1,275**	0,989	0,942	-	0,701	1,083
40Rb	1,264	0,975	0,765	0,662	-	1,108
40St	2,113**	1,544**	1,328	1,075	1,122	-

Los dos UPGMAs calculados para las medidas de la región del ramus ascendente fueron



muy parecidos (Figura 3-13). Así, aunque cambiaron ligeramente las distancias entre las agrupaciones, los conglomerados formados fueron idénticos. Los grupos más próximos entre si fueron 2n = 38-39 y 40Rb, los cuales formaron la agrupación basal. A ésta se les unió 2n = 34-37 y posteriormente 40St. Los grupos 2n = 28-30 y 2n = 31-33 formaron una agrupación

Figura 3-13. Dendrogramas obtenidos mediante el método UPGMA en los que se muestra las afinidades entre grupos cromosómicos en función de la matriz de distancias de Mahalanobis, calculada con las DPMs del ramus ascendente sin corregir por tamaño (gráfico superior) y corregidas por tamaño (gráfico inferior).

aparte del resto de grupos. Cabe destacar, no obstante, que ambos diagramas presentaron un ajuste pobre ($r < 0,7$). Por el contrario los dos MDS mostraron un buen ajuste entre los datos originales y las distancias obtenidas tras la agrupación (medidas no corregidas: $r = 0,88$ y $s = 0,00$; medidas corregidas: $r = 0,86$ y $s = 0,00$).

Los dos MDSs también fueron muy similares, así como los valores de MST (Figura 3-14). En ambas representaciones los grupos más próximos fueron nuevamente $2n = 38-39$ y $40Rb$, mientras que $40St$ fue el más alejado del resto de grupos. De hecho el valor de MST más elevado fue entre $40St$ y $2n = 38-39$.

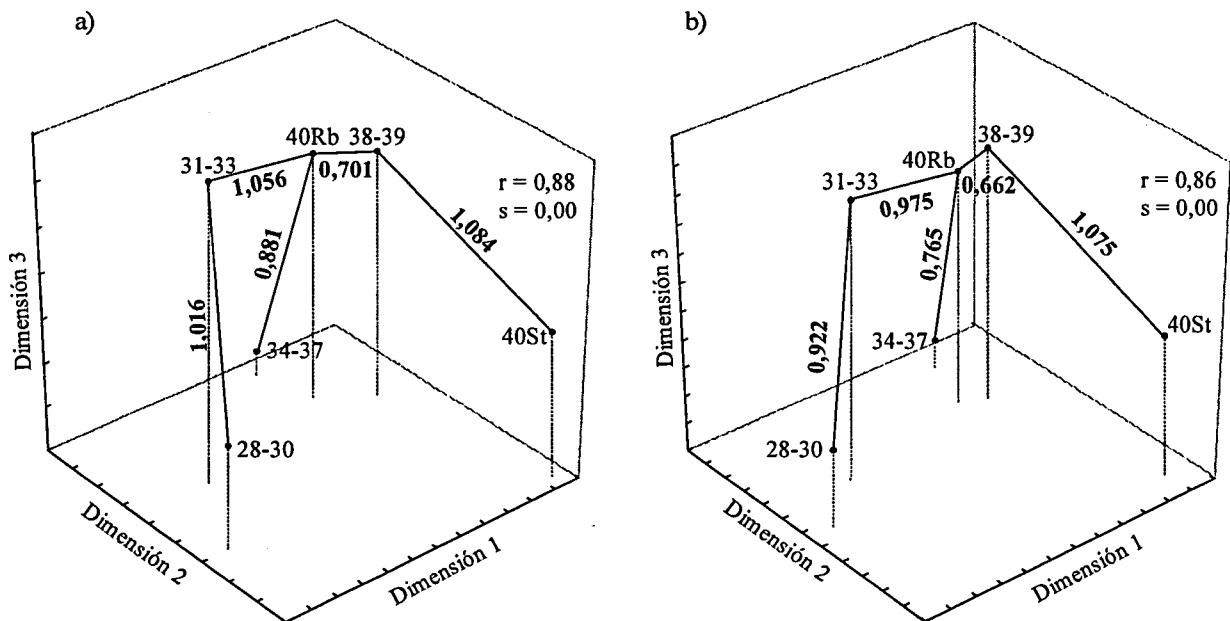


Figura 3-14. MDSs obtenidos a partir de las matrices de distancias de Mahalanobis obtenidas a partir de las DPMs del ramus ascendente no corregidas (a) y corregidas por tamaño (b). Se han superpuesto las agrupaciones y los valores (en negrita) obtenidos por el método MST. La r muestra el coeficiente de correlación cofenética y la s el estrés.

3.3.2.4. Análisis de los factores de aislamiento

Para poder comparar la matriz de distancias morfológicas con dos de los posibles factores de variación se calcularon previamente las matrices de distancias geográficas y cromosómicas entre los grupos analizados (Tabla 3-15). La localización geográfica del centroide de cada grupo cromosómico y los valores asociados de longitud y latitud se muestran en la Figura 3-15.

Los MDSs calculados a partir de las matrices de distancias de las dos variables predictoras mostraron claras diferencias (Figura 3-16). Al igual que en los análisis realizados a partir de los grupos empleados en el estudio de variación no métrica, el MDS obtenido a partir de la matriz de distancias geográficas mostró una clara separación en la

Tabla 3-15. Distancias geográficas lineales en kilómetros (diagonal inferior) y distancias no sesgadas de Nei entre los centroides de los grupos cromosómicos establecidos en el análisis de medidas mandibulares (diagonal superior).

Grupo cromosómico	28-30	31-33	34-37	38-39	40Rb	40St
28-30	-	0,092	0,435	0,946	1,334	1,334
31-33	5,163	-	0,144	0,507	0,738	0,738
34-37	17,551	12,994	-	0,098	0,197	0,197
38-39	21,296	18,592	24,113	-	0,023	0,023
40Rb	28,324	25,041	27,790	7,473	-	0,000
40St	61,513	56,350	45,925	51,486	46,911	-

dimensión 1 entre 40St y el resto de grupos, lo que refleja el aislamiento a nivel geográfico de este grupo respecto al resto (véase Figura 3-15). Sin embargo el MDS de distancias cariotípicas no reveló tal separación. Los grupos mostraron en este caso una separación más o menos gradual, siendo 40St, 40Rb y 38-39 los más próximos entre si, mientras que 31-33 y 34-37 fueron los que presentaron un valor de MST más elevado.

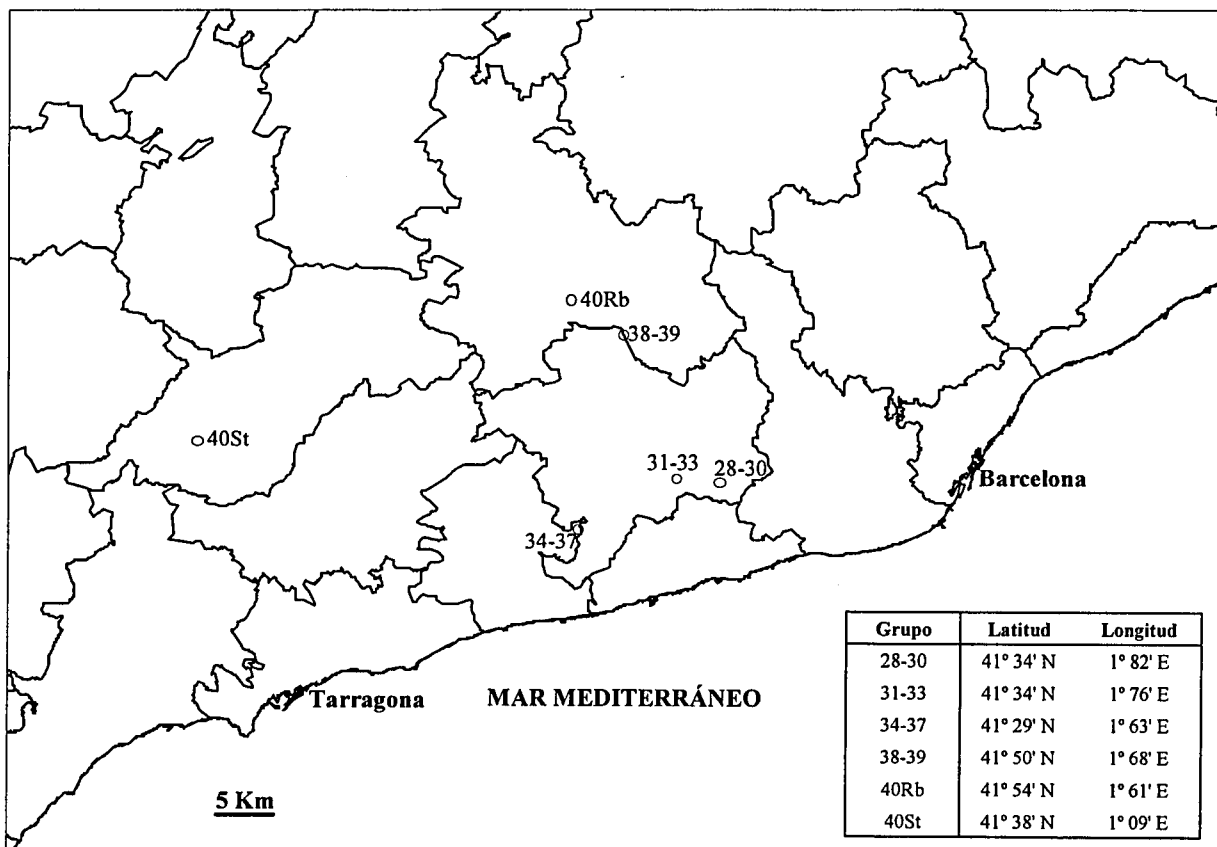


Figura 3-15. Localización geográfica de los centroides de los distintos grupos cromosómicos analizados en el estudio de medidas mandibulares. En la tabla inferior se muestran las coordenadas geográficas asociadas a estos centroides.

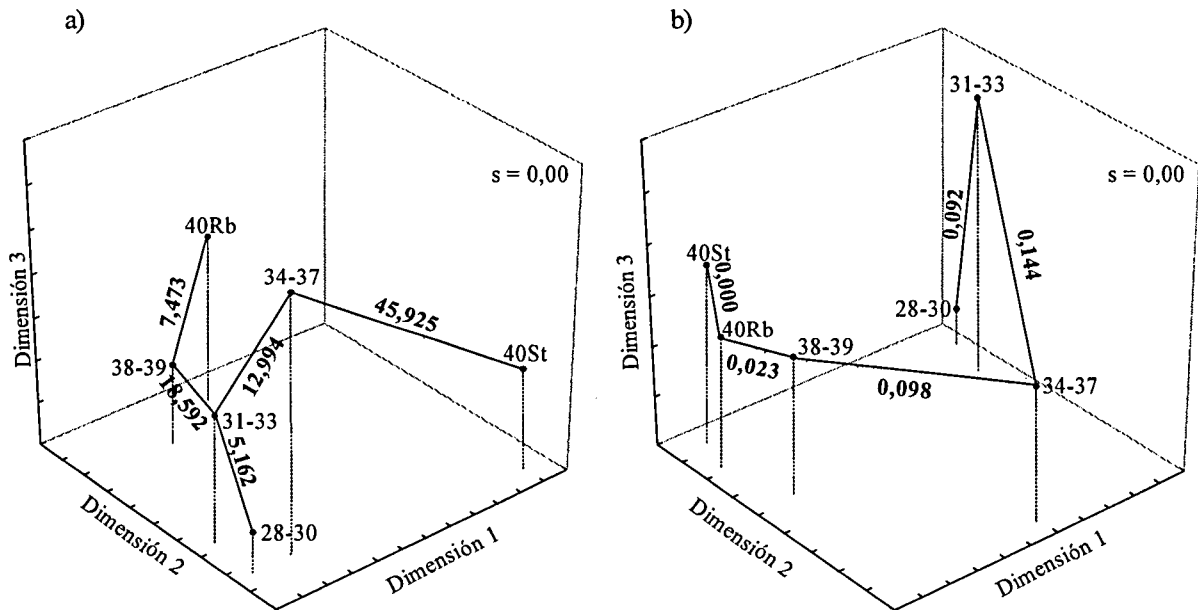


Figura 3-16. MDSs calculados mediante las matrices de distancias geográficas (a) y cromosómicas (b) que se muestran en la Tabla 3-15. Se han superpuesto las agrupaciones y los valores (en negrita) de MST.

Mandíbula completa

Las pruebas de Mantel calculadas empleando las medidas no corregidas indicaron que la diferenciación morfológica de la mandíbula completa se correlacionó significativamente con la distancia geográfica ($r = 0,89$; $p < 0,05$), pero no con la distancia cromosómica entre los centroides de los grupos ($r = 0,43$; $p > 0,1$). A pesar de que la variación cromosómica observada en la zona presenta una estructuración geográfica (Gündüz et al. 2001; Sans-Fuentes 2004), no se observó una correlación significativa entre las matrices de distancia geográfica y cromosómica ($r = 0,28$; $p > 0,1$). Mientras que la prueba parcial de Mantel entre la matriz de distancias morfológicas y la de distancias geográficas fue significativa al mantener constante la variación cromosómica ($r = 0,88$; $p < 0,05$), no fue así cuando se compararon las distancias morfológicas y cromosómicas manteniendo como constante el efecto geográfico ($r = 0,39$; $p > 0,1$). No obstante, aunque la prueba no fue significativa, el valor de p tras la corrección secuencial de Bonferroni fue muy próximo a 0,1, lo que sugirió cierto grado de dependencia. Los resultados obtenidos con las DPMs corregidas por tamaños fueron muy similares, de modo que las distancias morfológicas se asociaron significativamente con las distancias geográficas (Mantel: $r = 0,87$; $p < 0,05$. Parcial de Mantel: $r = 0,86$; $p < 0,05$) pero no con las cromosómicas (Mantel: $r = 0,40$; $p > 0,1$. Parcial de Mantel: $r = 0,31$; $p > 0,1$). Los coeficientes de determinación corroboraron este patrón (debido a la similitud entre los valores obtenidos usando medidas no corregidas y corregidas sólo se muestran los

primeros). Entre variación geográfica y cariotípica explicaron un 82% de la variación morfológica observada (R_T^2), mientras que el 18% de la variación no fue explicada por el modelo (d ; Figura 3-17). Del total de la variación, el 64% fue explicado sólo por la distancia geográfica (a), el 15% fue explicado conjuntamente por variación geográfica y cromosómica (b), y el 3% lo explicó únicamente la variación cromosómica (c).

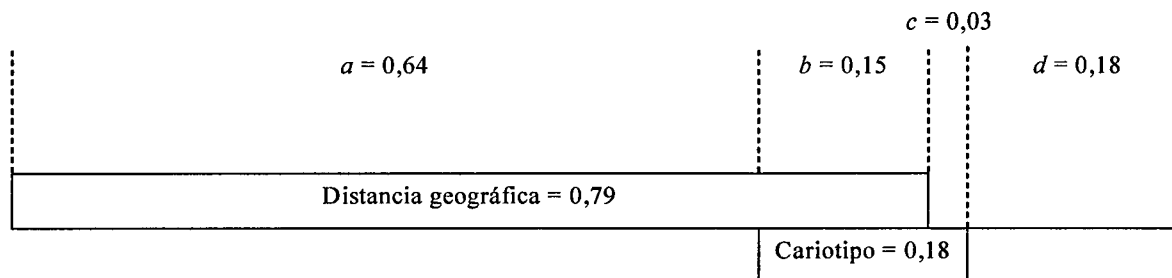


Figura 3-17. Resultados de las pruebas parciales de Mantel empleando las distancias geográfica y cariotípica como variables predictoras de la divergencia morfológica entre los grupos cromosómicos establecidos en el análisis de las medidas mandibulares sin corregir por tamaño.

Región alveolar

Las diferencias morfológicas en la región alveolar calculadas a partir de las medidas no corregidas estuvieron asociadas significativamente con la variación geográfica (Mantel: $r = 0,77$; $p < 0,05$. Parcial de Mantel: $r = 0,77$; $p < 0,1$), pero no con las divergencias en el cariotipo (Mantel: $r = 0,20$; $p > 0,2$. Parcial de Mantel: $r = 0,03$; $p > 0,5$). Lo mismo sucedió con las calculadas a partir de las DPMs corregidas por tamaño. Es decir que la variación morfológica estuvo asociada con la geográfica (Mantel: $r = 0,76$; $p < 0,05$. Parcial de Mantel: $r = 0,75$; $p < 0,1$) pero no con la cariotípica (Mantel: $r = 0,23$; $p > 0,2$. Parcial de Mantel: $r = 0,03$; $p > 0,5$). Los coeficientes de determinación así lo mostraron. Entre las dos variables predictoras explicaron el 60,47% de la variación morfológica de esta región, mientras que el 39,53% restante fue variación no explicada (Figura 3-18). La

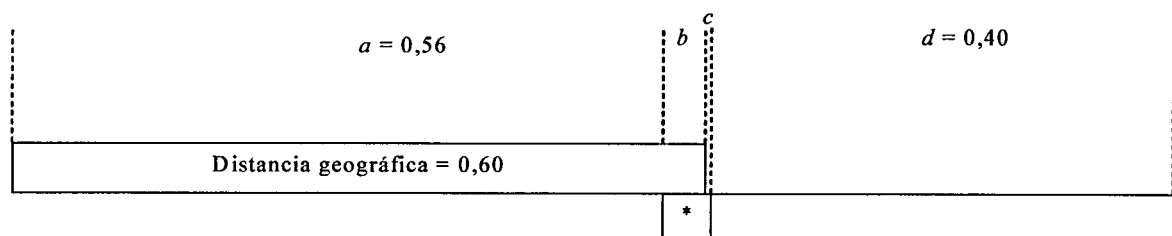


Figura 3-18. Resultados de las pruebas parciales de Mantel empleando las distancias geográfica y cariotípica como variables predictoras de la divergencia morfológica entre los grupos cromosómicos establecidos en el análisis de las medidas de la región alveolar sin corregir por tamaño. El asterisco representa la proporción de la variación en la región alveolar que fue explicada por las diferencias en el cariotipo ($b + c$).

distancia geográfica explicó por si sola el 56,32%, la geográfica conjuntamente con la cariotípica el 4,11% y la cariotípica sola el 0,3%.

Ramus ascendente

La variación en las medidas no corregidas del ramus ascendente se correlacionó significativamente con la divergencia cariotípica cuando se excluyó la variación geográfica ($r = 0,76$; $p < 0,05$) y cuando ésta fue considerada ($r = 0,76$; $p < 0,1$). Sin embargo, aunque la variación morfológica se asoció significativamente con la distancia geográfica cuando no se tuvo en cuenta la divergencia cromosómica ($r = 0,58$; $p < 0,1$), la significación desapareció cuando se consideró el factor cariotípico ($r = 0,58$; $p > 0,1$). En esta región los valores obtenidos a partir de las DPMs corregidas por tamaño cambiaron apreciablemente, presentando unas correlaciones más similares. Aún así, el patrón de las significaciones fue el mismo. Las distancias morfológicas se asociaron significativamente con las geográficas en la prueba de Mantel ($r = 0,65$; $p < 0,05$) pero no en la prueba parcial de Mantel ($r = 0,64$; $p > 0,1$). En cambio las asociaciones entre las distancias cromosómicas y las morfológicas fueron significativas en ambos casos (Mantel: $r = 0,66$; $p < 0,1$. Parcial de Mantel: $r = 0,64$; $p < 0,1$). Al calcular los coeficientes de correlación se corroboró que en esta región mandibular ambos factores explicaron un porcentaje algo mayor de la variación que en la región alveolar, el 72%; mientras que el 28% quedó sin explicar (Figura 3-19). De toda la variación, la distancia geográfica explicó el 14%, la cromosómica el 39%, y ambas conjuntamente el 19%.

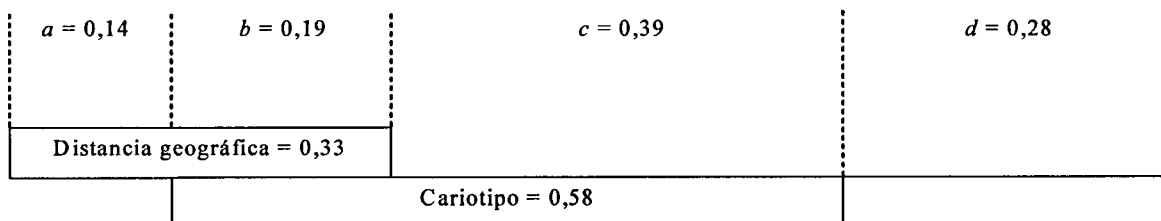


Figura 3-19. Resultados de las pruebas parciales de Mantel empleando las distancias geográfica y cariotípica como variables predictoras de la divergencia morfológica en la región del ramus ascendente.

Caracteres por separado

En el análisis geográfico se emplearon como variables predictoras la longitud y latitud de los centroides de los grupos (Figura 3-15 y Tabla 3-16). Los análisis de regresión múltiple mostraron una correlación significativa de las coordenadas geográficas en cinco

de los 24 caracteres estudiados, los cuales mostraron coeficientes de determinación muy elevados (Tabla 3-17). En el análisis del efecto cariotípico sobre los caracteres individuales solamente el primer vector propio fue significativo, acumulando el 40,83% de la variación. Este vector (Tabla 3-16) se empleó como variable predictora de la variación morfológica mediante

análisis de regresión independientes para cada carácter. Siete de los 24 caracteres mostraron una variación significativamente dependiente de este vector, con coeficientes de determinación elevados (Tabla 3-17). El segundo vector propio, aunque no significativo, acumuló el 24,17% de la variación. Al considerarlo junto con el primero en

Tabla 3-16. Grupos cromosómicos analizados en el presente estudio con sus respectivos tamaños muestrales (n), coordenadas geográficas de sus centroides y primer vector propio derivado de la matriz de distancias cromosómicas.

Grupo	n	Longitud	Latitud	Primer Vector
28-30	52	41° 34' N	1° 82' E	0,832
31-33	65	41° 34' N	1° 76' E	0,325
34-37	25	41° 29' N	1° 63' E	0,059
38-39	27	41° 50' N	1° 68' E	-0,201
40Rb	23	41° 54' N	1° 61' E	-0,507
40St	35	41° 38' N	1° 09' E	-0,507

Tabla 3-17. Patrones de variación de los caracteres mandibulares obtenidos mediante la regresión de los caracteres frente a variables geográficas (longitud y latitud) y cromosómicas (primer vector propio del análisis de coordenadas principales) separadamente. Los resultados muestran los coeficientes de determinación (R^2), los valores de F y los niveles de significación.

DPM	Factor geográfico		Factor cromosómico		DPM	Factor geográfico		Factor cromosómico	
	R^2	F	R^2	F		R^2	F	R^2	F
1-2	0,042	0,065	0,003	0,011	5-6	0,922	17,828*	0,597	5,918†
1-12	0,650	2,785	0,319	1,876	5-8	0,592	2,180	0,504	4,062
2-3	0,919	16,919*	0,581	5,552†	6-7	0,961	36,951**	0,380	2,447
2-12	0,801	6,023†	0,422	2,921	6-8	0,743	4,338	0,746	11,778*
3-4	0,976	59,745**	0,631	6,830†	7-8	0,665	2,982	0,883	30,237**
3-5	0,862	9,360†	0,817	17,837*	7-9	0,575	2,026	0,728	10,730*
3-11	0,609	2,337	0,507	4,115	8-9	0,803	6,114†	0,875	28,053**
3-12	0,738	4,219	0,567	5,239†	8-10	0,702	3,527	0,197	0,979
4-5	0,768	4,967	0,844	21,612**	9-10	0,807	6,255†	0,608	6,213†
4-8	0,866	9,716*	0,004	0,017	9-11	0,520	1,622	0,298	1,699
4-10	0,442	1,190	0,162	0,771	10-11	0,261	0,531	0,102	0,453
4-11	0,245	0,486	0,031	0,130	11-12	0,778	5,245	0,812	17,276*

† < 0,1; * p < 0,05; ** p < 0,01 tras la corrección secuencial de Bonferroni (n = 24).

los análisis de regresión múltiple, los coeficientes de determinación aumentaron pero sin embargo, las significaciones disminuyeron, quedando cuatro caracteres significativamente dependientes de la variación cromosómica.

Los coeficientes de determinación de las regresiones fueron elevados para la mayoría de caracteres tanto para los análisis geográficos como para los cromosómicos, siendo en general más altos en los caracteres del ramus ascendente (Tabla 3-17 y Figura 3-20). Sin embargo, cabe destacar que un grupo de caracteres de la región alveolar presentaron coeficientes de determinación bajos en ambos casos, especialmente en los análisis cromosómicos (Figura 3-20). Por otro lado, se pudo observar un grupo de caracteres, tanto de la región alveolar como del ramus ascendente, que mostraron coeficientes de determinación relativamente altos y en los que predominó, sin embargo, la variación geográfica en frente a la cromosómica. Finalmente, se detectó un tercer grupo de caracteres (cinco del ramus ascendente y uno de la región alveolar) que exhibieron ambos coeficientes elevados, pero en los que el componente cromosómico predominó sobre el geográfico.

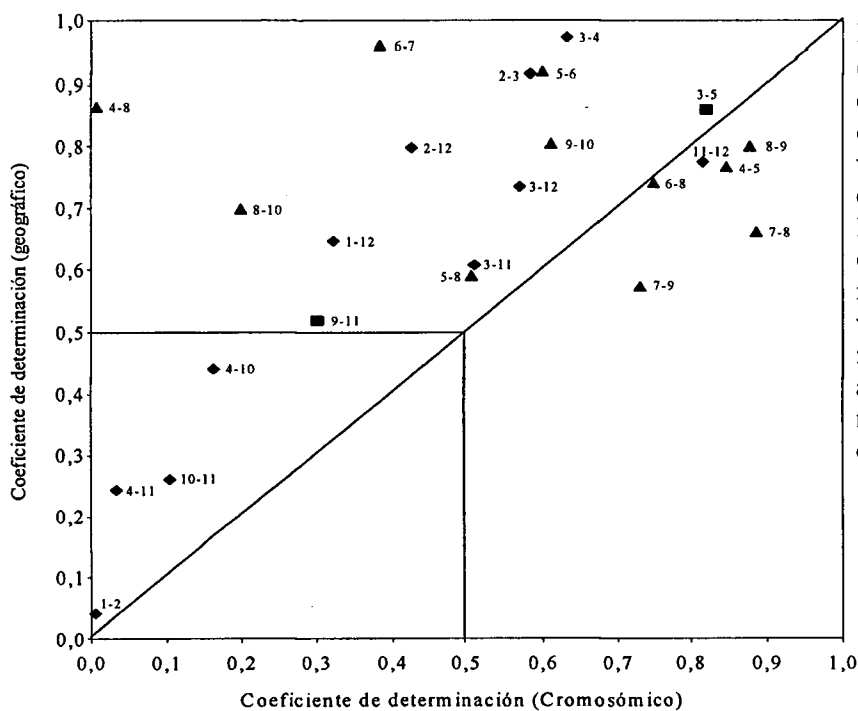


Figura 3-20. Comparación de los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos mediante las regresiones de las medidas mandibulares con las variables predictoras, geográficas y cromosómicas. La diagonal muestra la línea en que la variación cromosómica y geográfica tienen la misma importancia respecto a la variación fenotípica. Los triángulos representan los caracteres del ramus ascendente, los rombos los de la región alveolar y los cuadrados los que conectan ambas.

3.4. Discusión de los resultados

Análisis morfológicos previos realizados en la zona de polimorfismo Robertsoniano del noreste ibérico pusieron ya de relieve cierto grado de divergencia entre animales con distinto cariotipo (Sans-Fuentes 2004). Los resultados obtenidos en el presente apartado

son, en términos generales, congruentes con dicha información y corroboran la existencia de diferencias morfológicas significativas dentro de la zona de estudio. Éstos, revelaron además, que los dos principales factores presuntamente implicados en dicha diferenciación, cariotipo y distancia geográfica, explican conjuntamente la mayor parte de la variación observada; aunque dependiendo de la estructura o del carácter, la importancia relativa de ambos factores puede verse alterada.

Antes de entrar a considerar otros aspectos de la variación morfológica se discutirán los cambios de tamaño. En primer lugar, valga indicar que a pesar de no detectarse diferencias entre grupos cromosómicos en la clase de edad 5, en la clase 4 tanto el peso como el tamaño corporal de los animales presentaron una clara tendencia a aumentar con el número diploide. Así, los animales de fuera de la zona de polimorfismo fueron los más grandes, presentando una longitud cabeza-cuerpo y un peso significativamente mayores que los animales con números diploides bajos, concretamente los de los grupos 28-30 y 31-33. Los tres grupos restantes (34-37, 38-39 y 40Rb) mostraron tamaños intermedios pero no se detectó en ningún caso diferencias con los otros dos grupos de la zona de polimorfismo ni con los animales de localidades puramente estándar. Igualmente, en la clase de edad 4 se observó la existencia de diferencias significativas entre grupos cromosómicos en el tamaño mandibular, de manera que las mandíbulas fueron de mayores dimensiones al aumentar el número diploide. Si bien, el tamaño corporal podría ser el causante de las diferencias observadas en el tamaño mandibular, los análisis de covarianza mostraron que existen diferencias significativas en la morfología mandibular no vinculadas a los cambios de la longitud cabeza-cuerpo. Por otro lado, los análisis con datos corregidos y sin corregir por tamaño mostraron patrones muy similares de divergencia fenotípica entre grupos cromosómicos, lo que sugiere que los cambios de tamaño y de forma (“*shape*”) mandibular observados en la zona de polimorfismo estudiada podrían estar correlacionados. Cabe destacar no obstante, que a pesar de cumplir los requisitos fundamentales como indicador de variación de tamaño, el primer factor del análisis de componentes principales acumuló menos del 50% de la varianza y mostró valores propios que variaron considerablemente de magnitud, lo que presumiblemente sugiera la existencia de una importante componente de forma (“*shape*”) en la PC1. Este hecho podría ser debido a la propia naturaleza de los caracteres métricos empleados en este estudio; de hecho se considera que los esquemas de triangulación describen de manera eficiente la “*shape*” (Rao y Suryawanshi 1998; Rao 2000) porque consisten básicamente en distancias cortas, espaciadas regularmente, con distintas orientaciones dentro de la estructura, y que además

están definidas por puntos morfométricos homólogos desde el punto de vista biológico (Zelditch et al. 2004).

Los patrones de diferenciación mandibular observados en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona presentaron un elevado grado de concordancia con los obtenidos mediante el estudio de los caracteres no métricos del cráneo y de la mandíbula. Aunque por razones prácticas los grupos establecidos en ambos análisis no fueron exactamente los mismos, y en consecuencia las matrices de distancias y los fenogramas no pudieron ser comparados directamente, los resultados obtenidos con ambos tipos de caracteres mostraron pautas de variación semejantes. Un hecho relevante fue, por ejemplo, que los animales con cariotipo estándar de fuera de la zona de polimorfismo (40St) se diferenciaron claramente de los grupos Robertsonianos, incluso de aquéllos más próximos cromosómica y geográficamente. Solamente en los UPGMAs calculados a partir de los caracteres del ramus ascendente y de los de la región alveolar corregidos por tamaño, el grupo 40St no quedó separado de los demás grupos. No obstante, el ajuste de estos fenogramas no fue muy bueno, exceptuando el de las medidas de la región alveolar corregidas por tamaño. En cambio, los MDSs (que presentaron siempre ajustes iguales o mejores que los UPGMAs) mostraron una separación clara de este grupo respecto a los demás, siendo en todos los casos el grupo con un valor de MST más alto respecto el grupo más próximo.

La diferenciación morfológica de la raza estándar frente a poblaciones metacéntricas ha sido observada también en otros sistemas Robertsonianos de *M. m. domesticus* (Thorpe et al. 1982; Corti y Thorpe 1989; Saïd et al. 1999; Corti y Rohlf 2001; Hauffe et al. 2002). Mientras que en algunos de estos estudios los animales estándar fueron utilizados como grupo externo porque provenían de poblaciones distantes e incluso ecológicamente diferenciadas respecto a los animales metacéntricos utilizados (Thorpe et al. 1982; Corti y Rohlf 2001), en otros casos los especímenes con cariotipo estándar procedieron de poblaciones adyacentes (Hauffe et al. 2002) o incluso simpátricas (Saïd et al. 1999). En el presente estudio los animales 40St provinieron de localidades estándar próximas a la zona de polimorfismo Robertsoniano. En principio, entre estas poblaciones y las metacéntricas no existe ninguna barrera geográfica ni ninguna divergencia ecológica evidente, por lo que no cabe esperar en principio una disrupción brusca del flujo genético o cambios fenotípicos acentuados vinculados al ambiente. A pesar de ello, hay que considerar el posible efecto de la distancia geográfica como barrera al flujo genético o como indicador de pequeños cambios ambientales, circunstancia que se discutirá más adelante.

Más allá de las diferencias observadas entre los animales de localidades estándar y los grupos de la zona de polimorfismo, también se detectaron cambios significativos entre algunos de los grupos Robertsonianos, en especial en las comparaciones que implicaron a los animales con mayor número de metacéntricos. Así, en el análisis de los caracteres no métricos el grupo 28-29 mostró diferencias respecto a 38-40Rb, y el grupo 30-32 respecto a 33-37. En el estudio de variación en caracteres métricos el grupo 28-30 presentó distancias morfológicas significativas con el resto de grupos al analizar el total de la mandíbula y la región del ramus ascendente, mientras que la región alveolar no mostró diferencias ostensibles entre este grupo y los demás Robertsonianos. También resaltar que precisamente el grupo 28-30, junto con 31-33 y 40St, fueron los grupos que presentaron mayores porcentajes de ejemplares clasificados correctamente en los análisis discriminantes, indicando que fueron los más diferenciados. Igualmente, en los rasgos no métricos los grupos 28-29, 30-32 y 40St fueron los más diferenciados, ya que mostraron los valores de MU más elevados. En general, en todos los análisis de variación morfológica, tanto en caracteres no métricos como en medidas mandibulares, se observó un incremento paralelo de las diferencias en el número diploide y la divergencia fenética. De modo que los grupos con números diploides más próximos normalmente no mostraron distancias significativas, pero a medida que las diferencias en el número diploide aumentaron, las divergencias morfológicas crecieron, y en la mayoría de casos aparecieron las significaciones (Tablas 3-7, 3-10, 3-12 y 3-14).

Tal y como se expuso en el apartado 1.2.2.3. los caracteres no métricos presentan una base genética reconocida, por lo que han sido ampliamente aceptados como marcadores genéticos. Igualmente, numerosos estudios han puesto de relieve que la morfología mandibular presenta una compleja base genética (véase apartado 1.2.3.5.). Por tanto, las variaciones observadas en ambos tipos de caracteres (cambios fenotípicos) pueden ser debidas a causas genotípicas pero también ambientales. No obstante, en ambos tipos de caracteres se intentó descartar posibles fuentes de variación ambiental, se analizaron numerosos rasgos y además todas las poblaciones estudiadas fueron comensales y originarias de una región relativamente pequeña con condiciones climáticas similares. De modo que, *a priori*, la divergencia morfológica observada debería obedecer principalmente a una reducción del flujo genético, más que a factores ambientales. A pesar de ello, no se puede descartar la influencia del ambiente en los cambios de caracteres fenotípicos y, de hecho, la diferenciación por distancia puede en principio indicar tanto una reducción en el flujo de genes como un cambio ambiental gradual. Además, el

porcentaje de variación no explicado por los coeficientes de determinación puede perfectamente estar englobando variación ambiental, así como otras fuentes de variación, como el error de medida.

Como se comentó en la introducción del presente capítulo, dos posibles factores susceptibles de intervenir en la reducción del flujo genético entre grupos cromosómicos son la distancia geográfica y la divergencia cromosómica. El efecto que pueden tener éstos en la diferenciación morfológica ha sido previamente analizado en sistemas Robertsonianos de *M. m. domesticus* del norte de África y de Europa. En concreto, mientras que la variabilidad morfológica entre razas cromosómicas de los Apeninos fue consistente con su origen geográfico y ecológico (Corti y Thorpe 1989), las diferencias detectadas entre las razas del sistema Rético- Lombardo (Thorpe et al. 1982; Corti y Rohlf 2001) así como entre las del sistema Tunecino (Saïd et al. 1999) lo fueron con la variación cariotípica. Aunque en el presente estudio no se detectó en ningún caso una correlación significativa entre las distancias geográficas y las distancias cromosómicas de los centroides de los grupos, análisis previos han puesto de manifiesto que los cromosomas metacéntricos de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona muestran una distribución clinal y, consecuentemente, la variación cromosómica está estructurada geográficamente (Gündüz et al. 2001; Sans-Fuentes 2004). Por lo tanto, los patrones de diferenciación morfológica observados podrían estar relacionados con la divergencia cariotípica, pero también con la distancia geográfica. En efecto, los resultados obtenidos en los análisis de los factores de aislamiento, realizados tanto en el estudio de polimorfismo en rasgos no métricos como en el de variación de la morfología mandibular, indicaron que ambos factores están implicados en mayor o menor grado en la diferenciación fenotípica detectada en la zona de estudio.

En el análisis de caracteres no métricos, un elevado porcentaje de la variación morfológica observada fue explicado por ambos factores. Cabe destacar que este porcentaje fue incluso más alto que el observado empleando el total de la mandíbula, lo que pone de relieve que estos rasgos pueden resultar de gran utilidad en el momento de detectar patrones de diferenciación en zonas similares a la zona de estudio. De hecho, trabajos previos han considerado que los caracteres no métricos presentan buenos resultados en análisis a pequeña escala, es decir entre poblaciones estrechamente emparentadas (Rosing 1984). Este hecho concordaría con los resultados aquí obtenidos, ya que los animales estudiados pertenecen a la misma subespecie y son originarios de una zona geográfica muy concreta. Aunque las significaciones de las pruebas parciales

de Mantel indicaron un mayor peso del cariotipo sobre la variación morfológica en los rasgos no métricos, el estudio de los coeficientes de determinación mostró que la distancia geográfica explicó una mayor proporción de esta variación. Sin embargo, el cariotipo también explicó una parte significativa de la misma. De hecho, ciertos patrones observados en los fenogramas también apuntaron en esta dirección. Por ejemplo, la divergencia del grupo 40St parece obedecer principalmente al aislamiento geográfico de este grupo respecto todos los demás. Si nos fijamos en las Figuras 3-4 y 3-5 es posible observar que este grupo está claramente separado de los demás grupos, mientras que cromosómicamente 40St es muy semejante a 38-40Rb.

En el estudio de la morfología mandibular ambos factores explicaron un porcentaje de variación muy semejante al observado para las variables no métricas. Además, en la variación de toda la mandíbula el efecto geográfico presentó también un papel más importante que la divergencia cariotípica, no llegando esta última a correlacionarse significativamente con la variación morfológica. No obstante, valga señalar que los valores de significación fueron próximos a 0,1 tras la corrección secuencial de Bonferroni, indicando por tanto una cierta vinculación entre variación mandibular y distancia cromosómica.

A pesar de los resultados obtenidos al analizar la variación mandibular total, cuando se analizaron independientemente las dos principales regiones morfogenéticas se observaron dos patrones claramente diferenciados. Así, la variación de la región alveolar fue la que presentó un mayor porcentaje de variación no explicada por los dos factores, prácticamente un 40%. Del 60% restante, casi toda la variación fue explicada por la distancia geográfica (el 56%), mientras que las diferencias en el cariotipo explicaron por si solas el 0,3% de la variación en los caracteres de la región alveolar. Los resultados de las pruebas de Mantel fueron también muy claros, evidenciando una ausencia de correlación entre distancia cariotípica y morfológica en esta región mandibular. Por el contrario, los cambios morfológicos del ramus ascendente se correlacionaron más estrechamente con la divergencia cariotípica que con la distancia geográfica. Las pruebas de Mantel y parciales de Mantel así lo indicaron. El estudio de los coeficientes de determinación mostró que la mayor parte de la variación explicada se ajustó a las diferencias cariotípicas.

El análisis de los factores de aislamiento en los caracteres por separado también fue consistente con lo observado en el estudio de las regiones morfogenéticas. Así, el factor geográfico afectó significativamente a caracteres de ambas regiones, pero en cambio la

distancia cromosómica afectó principalmente a caracteres del ramus ascendente; a excepción de la DPM 11-12 y la 3-5.

Por razones prácticas, los aspectos referentes a cómo pueden estar afectando la naturaleza genética y ontogénica de los caracteres mandibulares en los patrones de diferenciación fenotípica observados en la zona de estudio se tratarán con mayor detalle en la discusión general de la tesis, una vez desarrollados los temas de asimetría fluctuante e integración morfológica. En consecuencia, la discusión se centrará por el momento en los posibles factores causales que pueden estar originando esta diferenciación.

Los patrones de variación morfológica detectados sugieren que lo que se observa en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona podría ser el resultado de una oleada de avance de cromosomas metacéntricos en un trasfondo originariamente estándar, en el que la distancia geográfica y las diferencias cromosómicas estarían actuando conjuntamente como factores que promueven una disminución en el flujo genético entre poblaciones diferenciadas cariotípicamente. Los patrones de divergencia fenotípica indican que existe una correlación clara entre distancia morfológica y separación geográfica en la mayoría de caracteres, lo cual concuerda con lo observado a escala cariotípica (Sans-Fuentes 2004). En cuanto al efecto de las diferencias cariotípicas, destacar que en la actualidad se considera que los cambios cromosómicos pueden funcionar como barrera al intercambio de genes por dos vías diferentes (véase apartados 1.1.3. y 3.1.): en primer lugar una disminución de fertilidad en los individuos heterocigotos para los cambios cromosómicos y, en segundo lugar, por una disminución de la tasa de recombinación en las regiones cromosómicas próximas a un cambio estructural.

La reducción de fertilidad o de eficacia biológica de los heterocigotos ha sido considerada una importante barrera de aislamiento entre poblaciones diferenciadas cromosómicamente (Searle 1993; Hauffe y Searle 1998). No obstante, la fuerza de este tipo de barrera genética depende de la estructura de la zona híbrida en cuestión (polimórfica en este caso). De este modo, las zonas híbridas escalonadas se consideran barreras genéticas considerablemente más débiles que las zonas híbridas estrechas y coincidentes, especialmente si en estas últimas se producen híbridos heterocigotos complejos o simples múltiples, particularmente infértiles (Searle 1993). Por lo tanto, considerando la estructura de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona (Gündüz et al. 2001; Sans-Fuentes 2004), en principio no se espera una reducción substancial del flujo genético debida a una ineficacia de los heterocigotos. Sin embargo, la divergencia fenotípica y su vinculación con el cariotipo sugieren una disminución del intercambio genético entre los

grupos cariotípicos analizados. De hecho ya se comentó en la introducción que en la zona de polimorfismo cromosómico estudiada los machos heterocigotos, especialmente los que presentaron tres fusiones desaparejadas, sufrieron una reducción significativa de fertilidad (Sans-Fuentes 2004). La selección en contra de estos animales podría restringir hasta cierto punto el flujo genético entre animales de cariotipo estándar y animales con fusiones, lo que podría dar lugar a las divergencias fenotípicas detectadas en el presente trabajo.

Por otro lado, tal y como se comentó anteriormente, la supresión, la reducción o el cambio de los patrones de recombinación originados por las reorganizaciones cromosómicas también pueden funcionar como barreras de aislamiento, reduciendo el flujo de genes entre animales con y sin reorganizaciones. De este modo, también podría suceder que las diferencias morfológicas observadas en la zona de estudio fueran debidas a problemas en la recombinación originados por la presencia de metacéntricos. La existencia de este tipo de barrera coincidiría con el hecho de que a medida que las diferencias en el número diploide aumentan, la divergencia fenotípica también sufre un incremento. Ya que bajo este supuesto, al aumentar el número de reorganizaciones cromosómicas se incrementaría también el número de genes ligados que sufrirían una disminución de la tasa de recombinación y por tanto cabría esperar un incremento de las divergencias genéticas y, consecuentemente, morfológicas. Los resultados obtenidos en algunos estudios también sugieren que los problemas en la recombinación pueden provocar una disminución severa del flujo genético desde las poblaciones estándar hacia las Robertsonianas (Dumas y Britton-Davidian 2002; Castiglia y Capanna 2002). Estos resultados parecen ser coincidentes con los patrones observados en el presente estudio, en el que se observa que las diferencias morfológicas respecto los animales 40St aumentan a medida que incrementa el número de fusiones. Además, mientras que la mayoría de modelos clásicos de especiación cromosómica asumen un cierto grado de aislamiento geográfico (Rieseberg 2001), los modelos que proponen la disminución de la recombinación como barrera principal al intercambio genético tienen la ventaja que se ajustan a procesos de diferenciación en parapatría o incluso en simpatría (Navarro y Barton 2003), que es como se cree que se han originado la mayoría de razas cromosómicas de *M. m. domesticus* (Britton-Davidian et al. 1989; Nachman et al. 1994). Adicionalmente, si la disminución en las tasas de recombinación es el factor principal de la reducción en el intercambio genético entre poblaciones diferenciadas cromosómicamente, cuanto más amplia sea la distribución de las reorganizaciones mayor la probabilidad de que se fijen

alelos incompatibles con los ya existentes en las poblaciones sin reorganizaciones, y por tanto que estos alelos se queden atrapados en estas regiones propiciando cierto grado de diferenciación. Este hecho hace que las zonas de polimorfismo (o híbridas) cromosómico anchas y escalonadas, como la zona de estudio, tomen fuerza como posibles puntos de diferenciación, mientras que si la disminución de fertilidad es el factor principal de aislamiento este tipo de zonas se consideran barreras poco eficientes (Searle 1993).

