

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



**ACUMULACIÓN DE MUTACIONES CON EFECTO SOBRE
VIABILIDAD EN “DROSOPHILA MELANOGASTER”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Chavarrías Lázaro

Bajo la dirección de los doctores

Carlos López – Fanjul de Argüelles

Aurora García – Dorado García

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1683-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



ACUMULACIÓN DE MUTACIONES
CON EFECTO SOBRE VIABILIDAD
EN *Drosophila melanogaster*

TESIS DOCTORAL

DAVID CHAVARRÍAS LÁZARO

MADRID 2001



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**ACUMULACIÓN DE MUTACIONES
CON EFECTO SOBRE VIABILIDAD EN
*Drosophila melanogaster***

MEMORIA

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

PRESENTA

DAVID CHAVARRÍAS LÁZARO

**Vº Bº
de los Directores**

El Doctorando

**CARLOS LÓPEZ-FANJUL DE
ARGÜELLES**

**AURORA GARCÍA-DORADO
GARCÍA**

**DAVID CHAVARRÍAS
LÁZARO**

Madrid 2001

La presente memoria se ha llevado a cabo en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Catedrático Carlos López-Fanjul de Argüelles y la Doctora Aurora García-Dorado García, a los que deseo expresar mi agradecimiento por ofrecerme la posibilidad de realizar esta tesis doctoral, por su actitud siempre atenta hacia mí y la dedicación al desarrollo del trabajo. También quiero dar las gracias a todo un grupo de personas que me han acompañado durante estos años:

a la Dra. Almudena Fernández, quien me ha enseñado casi todo, por hacer agradables y amenos todos los momentos que pasamos en el laboratorio y por hacerme sentir protegido en mis comienzos;

al profesor Juan Luis Monedero y al Dr. Jesús Fernández, de los que recibí toda su colaboración y apoyo;

a Javier García Villafranca; en las prosperidades acudiste al ser llamado y en las adversidades sin serlo, gracias amigo; por cierto, todavía confío en ti y sé que saldrás;

a José Barrios Díaz, alguien que siempre estuvo ahí dispuesto a dar y escuchar; por sacarme de varios entuertos y, sin duda, por meterme en la cabeza que lo “negro” no estorba;

a Victoria Ávila Regidor, por su ayuda moral y material, por ser como es y, sobre todo, por el cariño que le ha permitido soportarme tanto dentro como fuera del laboratorio.

Por último, gracias a Marisa y Agustín, a la Noe, al abuelo y, como no, a la Nati, mi familia; porque tanto en la realización de este trabajo como en todo lo demás su apoyo ha sido, y sé que siempre será, constante.

A la Nati

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 14 |
| 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO | 14 |
| 2.2. CONDICIONES DE CULTIVO | 15 |
| 2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL | 15 |
| 2.4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS | 19 |
| 2.4.1. MODELO GENERAL | 19 |
| 2.4.2. ESTIMAS CLÁSICAS DE $\lambda E(s^2)$ Y $\lambda E(s)$ | 21 |
| 2.4.3. ESTIMA DEL GRADO DE DOMINANCIA | 25 |
| 3. RESULTADOS | 29 |
| 3.1. DISTRIBUCIÓN DE LA MEDIA DE LAS LÍNEAS | 29 |
| 3.2. PARÁMETROS MUTACIONALES | 38 |
| 4. DISCUSIÓN | 40 |
| 4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL | 40 |
| 4.2. TASA Y EFECTO MEDIO DE LAS MUTACIONES | 44 |
| 4.3. GRADO DE DOMINANCIA DE LAS MUTACIONES | 45 |
| 5. RESUMEN | 48 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 50 |

1. INTRODUCCIÓN

La determinación de las propiedades de las mutaciones perjudiciales no severas (MNS) es de fundamental importancia para poder explicar un amplio abanico de fenómenos, pertenecientes tanto a la genética evolutiva y cuantitativa como a la biología de la conservación, tales como la evolución del sexo, la respuesta a largo plazo a la selección artificial, o el lastre mutacional.

En poblaciones con censos relativamente pequeños, las MNS no sólo pueden alcanzar considerables frecuencias, sino que la probabilidad de que se fijen es también bastante elevada. La acumulación de tales mutaciones puede poner en peligro la supervivencia de la población, llevándola a la extinción cuando la carga mutacional supere un determinado nivel (Lynch y col., 1993, 1995a,b; Lande, 1994). Es también sabido que la presión de mutación deletérea puede promover la evolución de la reproducción sexual y la recombinación (Pamilo y col., 1987; Kondrashov, 1988; Charlesworth y col., 1992, 1993).

El riesgo de extinción vía acumulación de mutaciones deletéreas no sólo depende de la tasa mutacional sino también de la distribución de efectos mutacionales. Son de especial interés las mutaciones con coeficientes de selección del orden de $1/2N$, donde N es el censo efectivo poblacional, puesto que su signo evolutivo está en gran medida determinado por la deriva genética, mostrando, a lo largo de este proceso, sus efectos sobre la eficacia biológica o cualquiera de sus componentes (Lynch y Gabriel, 1990; Gabriel y col., 1993; Lande, 1994).

El tratamiento cualitativo del problema precisa de estimas de la tasa gamética de mutación λ y de los efectos deletéreos esperados de éstas en homocigosis y heterocigosis $E(s)$. El método más directo para obtener tales estimas es el análisis de líneas de acumulación de mutación (líneas AM). También se han inferido estimas a partir de las propiedades genéticas de la eficacia en poblaciones naturales. Sin

embargo éstas sólo son fiables si la población en cuestión está en equilibrio mutación-selección, lo cual es inverificable. Por este motivo nosotros nos limitaremos a considerar las primeras, las basadas en experimentos de acumulación de mutaciones, que no se fundamentan en suposiciones tan restrictivas.

La mayor parte de los datos que buscan aclarar las características del proceso de mutación deletérea, proceden de experimentos en los que se permitió la acumulación de mutaciones en líneas del díptero *Drosophila melanogaster*. Estos trabajos permiten estimar la tasa de deterioro por generación de un componente de la eficacia biológica (normalmente viabilidad) debida a mutación en ausencia de selección $\Delta\mathcal{M} = \lambda E(s)$, y el incremento de su varianza entre líneas $\Delta\mathcal{V} = \lambda E(s^2)$. A partir de estos valores pueden calcularse los límites inferior y superior de $\lambda \geq \Delta\mathcal{M}^2 / \Delta\mathcal{V}$ y $E(s) \leq \Delta\mathcal{V} / \Delta\mathcal{M}$, respectivamente (estimas Bateman, 1959). La magnitud de las estimas obtenidas en diferentes experimentos es actualmente objeto de controversia (véanse las revisiones de García-Dorado y col., 1999; Keightley y Eyre-Walker, 1999; y Lynch y col., 1999).

Los estudios clásicos llevados a cabo en *Drosophila* por Mukai y colaboradores (Mukai, 1964, 1969a, 1979; Mukai y Yamazaki, 1968; Mukai y col., 1965, 1972) y Ohnishi (1977b), sugirieron una tasa elevada de mutación deletérea para el cromosoma II con efectos individuales relativamente pequeños que, extrapolados a todo el genoma, se concretan en $\lambda \approx 0.3$ y $E(s) \approx 0.03$. Es decir, aparece del orden de una nueva mutación con efecto perjudicial sobre viabilidad por individuo y generación, causando cada una de ellas una reducción de la viabilidad de aproximadamente un 3%.

Por otro lado, en un trabajo más reciente de Fernández y López-Fanjul (1996), se obtuvieron tanto una tasa de mutación muy inferior a la anterior ($\lambda \approx 0.02$) como unos mayores efectos en homocigosis ($E(s) \approx 0.10$). Estas discrepancias pueden ser principalmente atribuidas a las diferentes estimas obtenidas de $\Delta\mathcal{M}$ en cada caso (rango: 0.2-1%), puesto que las estimas de $\Delta\mathcal{V}$ computadas

en diferentes experimentos, cuando se excluyen las mutaciones de efecto severo, son semejantes (rango: $(0.13-0.23) \times 10^{-3}$). Asimismo, Fry y col. (1999), utilizando un diseño similar al seguido por Mukai y Ohnishi, obtuvieron unas estimas Bateman similares a las de Fernández y López-Fanjul ($\lambda = 0.05$, $E(s) = 0.11$). Sin embargo, la estima de $\Delta\mathcal{M}$ no fue mucho menor que la de Mukai, aunque la de $\Delta\mathcal{V}$ resultó mayor.

Los diferentes diseños experimentales empleados podrían explicar parte de la discrepancia mencionada. En el protocolo llevado a cabo por Mukai y Ohnishi se permitió la acumulación de mutaciones en réplicas de un cromosoma II, libre de letales, extraído de una población silvestre. Estas réplicas se transmitían por vía paterna y, por tanto, sin recombinación, en heterocigosis con un cromosoma marcado, con lo que se conseguía proteger a las mutaciones recesivas de la acción de la selección natural. La viabilidad de los cromosomas II de fenotipo silvestre (+/+), relativa a cromosomas *Curly*, se estimó a partir de la relación entre el número de individuos +/+ y *Cy*/+ en la descendencia de cruzamientos entre individuos *Cy*/+. Por su parte, Fernández y López-Fanjul hicieron uso de un conjunto de líneas consanguíneas derivadas de una misma cepa isogénica, mantenidas mediante un apareamiento hermano por hermana por línea y generación, por lo que las mutaciones de efecto deletéreo débil que surjan en todo el genoma se van fijando en las líneas de manera aproximadamente aleatoria. En este caso, la viabilidad se evaluó individualmente como la proporción de adultos emergidos a partir de la puesta de un día de una hembra.

En lo que respecta al análisis de poblaciones naturales, Shabalina y col. (1997) siguieron un diseño experimental denominado *middle-class neighborhood*. En este caso, se mantienen mediante apareamientos aleatorios poblaciones recientemente capturadas y, para minimizar la selección contra las mutaciones deletéreas, cada pareja contribuye dos hijos, un macho y una hembra, a los parentales de la siguiente generación. En poblaciones de 200 individuos, tras 30 generaciones de acumulación de mutaciones, el descenso de la viabilidad media $\Delta\mathcal{M}$ observado por Shabalina fue un 2% por generación, resultado acorde con lo obtenido por Mukai. No obstante,

después de mantener en el laboratorio durante 40 y 50 generaciones una población recién capturada, Gilligan y col. (1997) no detectaron una mayor reducción en eficacia, a medida que se reducía el tamaño poblacional ($N = 500, 250, 100, 50$ y 25), lo que sugiere que dicho declive no se debía a mutaciones deletéreas nuevas contra las que la selección no actuaría en poblaciones pequeñas.

Un problema recurrente en los experimentos de acumulación de mutaciones anteriormente detallados, es la ausencia de un control que permita obtener una estima de ΔM libre de sesgos. Esto podría implicar que una fracción del descenso en viabilidad observado por Mukai y Ohnishi no fuera mutacional, lo cual resultaría en sobreestimas de ΔM (Keightley, 1996; García-Dorado, 1997; Keightley y Eyre-Walker, 1999). Este inconveniente fue solventado por Fry y col. (1999), al utilizar un control cuya viabilidad se mantuvo constante a lo largo del experimento. Por su parte, Fernández y López-Fanjul mantuvieron una población control de censo grande, pero la evaluación de ésta sólo fue sincrónica con una muestra pequeña y no aleatoria de líneas MA.

En segundo lugar, debe tenerse en cuenta que Fernández y López-Fanjul evaluaron viabilidad en cultivos de baja densidad, mientras que los restantes experimentos lo hicieron en condiciones más competitivas. Esta diferencia puede conducir a infravaloraciones de la tasa de mutación, si existen mutaciones cuasineutras en ambientes favorables que sólo manifiestan su efecto perjudicial en medios extremos (Kondrashov y Houle, 1994). No obstante, Fernández y López-Fanjul (1997) no encontraron aumentos de la heredabilidad mutacional con un empeoramiento creciente del medio de cultivo; por el contrario, lo que se detectó fue un alto grado de especificidad de las mutaciones implicadas.

Houle y col. (1992) aportaron estimas de parámetros mutacionales para eficacia total pero, posteriormente, se comunicó que las líneas control utilizadas habían sufrido contaminaciones (Houle y col., 1994a). Resultados de Mukai y Yamazaki (1971), Yoshimaru y Mukai (1985), Houle y col. (1994b) y Fernández y López-Fanjul (1996) sugieren la posibilidad de que la mayoría de las mutaciones

deletéreas presenten efectos pleiotrópicos sobre otros componentes de eficacia. Con respecto a componentes tales como tasa de desarrollo, fecundidad, longevidad y éxito en el apareamiento, en ningún caso la correlación genética causada por mutación resultó ser significativamente diferente de uno, lo cual implica que los efectos de la mutación deletérea sobre eficacia en *Drosophila* no deben ser menores que los correspondientes a viabilidad.

Experimentos de acumulación de mutaciones llevados a cabo utilizando otros organismos, también han aportado datos sobre la magnitud del efecto de la acumulación de mutaciones deletéreas sobre eficacia total. Kibota y Lynch (1996) evaluaron el comportamiento de 50 líneas AM de la bacteria *Escherichia coli*, relativo a un línea control inicial que se mantuvo a -80 °C, para evitar su evolución entre medida y medida; observándose un pequeño descenso de la eficacia media (medida como la tasa de expansión clonal) y un incremento gradual de la varianza entre líneas. La estima de $E(s)$ resultó ser 0.012 (en este caso se trata del efecto haploide de la mutación), no muy diferente de lo observado para viabilidad en *Drosophila* en los experimentos de Mukai. La tasa genómica de mutación deletérea obtenida, 1.7×10^{-4} , es aproximadamente un 10% de otras estimas de la tasa de mutación genómica total en ésta y otras especies relacionadas (Drake, 1991; Anderson y Hughes, 1996). Considerando que la tasa genómica de mutación molecular por replicación en la línea germinal mantiene cierta constancia y que en *Drosophila melanogaster* ocurren 25 replicaciones por generación en la línea germinal (Drake y col., 1998), esta tasa de mutación es compatible con la estima obtenida para *Drosophila melanogaster* en el experimento de Fernández y López-Fanjul. Por otra parte, si la tasa de mutación fuese proporcional al tamaño del genoma, que es aproximadamente 50 veces mayor en *Drosophila melanogaster* que en la bacteria, la estima de la tasa de mutación deletérea de *Escherichia coli* sería compatible con las estimas obtenidas por Mukai para *Drosophila melanogaster*.

De la Peña y col. (2000) escogieron el bacteriófago MS2, un virus RNA, para estudiar el efecto que provoca la acumulación de mutaciones deletéreas aunque, debido al bajo número de réplicas incluidas, sólo pudieron ofrecer una estima

convinciente para $\lambda E(s)$. Comparar directamente el declive en eficacia encontrado, un 16% por día, es cuando menos arriesgado debido, primero, a las enormes diferencias entre el fago y organismos cuya dotación genética se compone de DNA en términos de tasa de mutación y, segundo, porque el deterioro observado se computó por día y no por generación. Existen dos modelos de replicación viral a partir de los cuales podríamos extrapolar el número de generaciones acontecidas en un día; de uno se desprende un valor de 30.7 generaciones por día, lo que supone una estima de 0.52%, sin embargo el otro, más realista, basado en un crecimiento mixto exponencial-lineal, arroja sólo 8 generaciones y, por tanto, un declive en eficacia de un 2% por generación. A pesar de esto el riesgo que supone extrapolar estas conclusiones a organismos superiores es elevado.

Schultz y col. (1999) mantuvieron 1000 líneas, todas derivadas de una cepa altamente consanguínea de la planta *Arabidopsis thaliana*, a partir de una sola semilla por línea durante 10 generaciones. Comparada con una población control, obtenida a partir de semillas de la cepa inicial, la eficacia total mostró un declive de aproximadamente un 0.5% por generación. La aplicación de las estimas Bateman arrojó unos valores de $\lambda \geq 0.04$ y $E(s) \leq 0.12$. Debe notarse que, aunque el tamaño del genoma de *Arabidopsis* es tres veces más pequeño que el de *Drosophila*, la tasa mutacional por sustitución en plantas es del orden de 2.7 veces mayor que en el díptero (Wolfe y col., 1987; Sharp y Li, 1989).

Sin embargo, en otro estudio realizado con la misma planta por Shaw y col. (2000), tras 17 generaciones y con una muestra aleatoria de 40 líneas, se observaron declives menores y no significativamente distintos de cero para la media de los caracteres estudiados, entorno al 0.1%. Aunque, por otro lado, es posible que el número de generaciones de consanguinidad llevadas a cabo en ambos experimentos, 10 y 17, respectivamente, no sea lo suficientemente elevado como para poder inferir estimas fidedignas acerca del proceso de acumulación de mutaciones.

Con el nematodo *Caenorhabditis elegans*, existen dos experimentos de acumulación de mutaciones, uno realizado por Caballero y Keightley (1997) y otro

por Vassilieva y Lynch (1999, 49 generaciones). Ambos experimentos han sido reanalizados por Keightley y Bataillon (2000). Para simplificar nos centraremos en el carácter global eficacia, definido como tasa intrínseca de crecimiento de las líneas AM, para el cual las estimas Bateman (BM) dieron $\lambda \geq 0.013$ y $E(s) \leq 0.053$ en el primer experimento, y $\lambda \geq 0.008$ y $E(s) \leq 0.23$ en el segundo. Las estimas de *máxima verosimilitud* (MV) fueron $\lambda = 0.0035$ y $E(s) = 0.10$ en el primer experimento y $\lambda = 0.0046$ y $E(s) = 0.055$ en el segundo. Es decir, los dos experimentos coinciden en sugerir tasas pequeñas de mutación deletérea con efectos relativamente grandes. Una fase posterior del segundo experimento (Vassilieva y col., 2000) analiza los efectos de la acumulación de mutaciones durante 165 generaciones más (un total de 214 generaciones) y confirma los resultados previos, con estimas BM de $\lambda \geq 0.0068$ y $E(s) \leq 0.222$. Según lo anterior, y al contrario de lo concluido en los experimentos clásicos realizados con *Drosophila melanogaster*, en los que la erosión de algún componente principal de la eficacia, principalmente viabilidad, se atribuía a un elevado número de mutaciones de efecto pequeño, en *Caenorhabditis elegans* la disminución en media para los caracteres estudiados no fue grande y parece deberse principalmente a la presencia de mutaciones con efectos relativamente altos.

El efecto de la acumulación de mutaciones sobre diferentes componentes de eficacia ha sido también estudiado en el crustáceo *Daphnia pulex* (Lynch y col., 1998). Los valores de $\Delta\mathcal{M}$ oscilaron entre -2.06% (viabilidad) y 2.9% (tercera puesta), por lo que la tasa mutacional osciló entre $\lambda \geq 0.8$, para mutaciones que reducen la viabilidad, y $\lambda \geq 0.25$ para las que aumentan la puesta. El control congelado fue evaluado sólo en las generaciones 7 y 16, siendo posteriormente descartado debido a su bajo rendimiento. Los autores asumen que la aparente estabilidad del control en este periodo (generaciones 7-16) garantiza la estabilidad futura (hasta la generación 32), pero esta suposición no está fundada, lo que resta fiabilidad a las estimas de $\Delta\mathcal{M}$ de este estudio.

Interesante es también conocer más acerca del proceso de acumulación de mutaciones perjudiciales en el genoma humano, máxime si los pocos estudios que lo

tratan sugieren un λ generalmente elevado. En principio, podemos determinar la tasa de mutación atendiendo al cambio ocurrido en regiones neutras del ADN, tales como intrones o pseudogenes, que no codifican para ninguna proteína en especial. En mamíferos, estas tasas, extrapoladas a todo el genoma, se traducen en aproximadamente 100 nuevas mutaciones por individuo (Kondrashov, 1995), aunque, obviamente, no todas presentan efectos deletéreos. Eyre-Walker y Keightley (1999) se centraron en regiones del genoma que se traducen a proteínas. Estudiando las sustituciones de base sinónimas y no sinónimas en la secuencia codificante de 46 proteínas a lo largo de la línea evolutiva humana, tras su divergencia del chimpancé, encontraron 143 sustituciones no sinónimas, es decir, mutaciones por las que se cambia una base del ADN produciéndose un cambio en la proteína final. Si este tipo de mutaciones fueran neutras, se estimó que debería haber del orden 231 sustituciones en su muestra de 46 genes. La diferencia, 88 mutaciones (38%), puede ser una estima del número de mutaciones deletéreas que han sido eliminadas por selección natural. Suponiendo que existen aproximadamente 60.000 genes, que la divergencia entre los humanos y los chimpancés ocurrió hace 6×10^6 años y que el intervalo generacional promedio es de 25 años, se desprendería una tasa de mutación deletérea de 1.6 por genoma diploide y generación (1.7 y 1.2 para chimpancés y gorilas, respectivamente) (Eyre-Walker y Keightley, 1999). Sin embargo, los datos procedentes de la secuenciación del genoma humano indican la existencia de alrededor de 30000 genes, con lo que la tasa de mutación por gameto y generación se vería reducida a 0.4. Por otro lado, esos mismos autores apuntaron que la proporción de mutaciones perjudiciales en los 46 genes humanos considerados en su estudio es mayor que la correspondiente a los genes equivalentes de roedores, lo que, en principio, puede deberse a la acumulación de mutaciones deletéreas tenues en la población por simple deriva genética.

La tasa de mutación deletérea calculada por Eyre-Walker y Keightley (1999) puede estar infraestimada ya que, por ejemplo, las mutaciones que se encuentren fuera de regiones codificadoras no se tuvieron en cuenta y algunas de estas regiones, tales como las que controlan la expresión génica, se espera que estén también sujetas

a la acción de la selección natural. De todos modos, hay que tener en cuenta que este método estima la tasa de mutación con efecto deletéreo mayor que 10 veces el inverso del censo efectivo de la especie, así que puede incluir cualquier mutación con efecto mayor que, digamos, 10^{-4} , no permitiendo discriminar la magnitud de los efectos deletéreos.

Haldane (1935, 1947) y Crow (1993) apuntaron la idea de que la tasa de mutación pudiera ser mayor en machos que en hembras, debido a que la mayoría de las mutaciones surgen durante los periodos de división celular. En humanos, por ejemplo, la tasa de mutación en machos parece ser del orden de 10 veces superior a la de las hembras. En éstas el número de divisiones celulares entre el cigoto y el huevo es, aproximadamente, 24, mientras que en los machos ocurren del orden de 36 divisiones celulares en la línea germinal durante el periodo de la pubertad (aproximadamente 13 años de edad) y, de aquí en adelante, el número aumenta a cerca de 23 por año; por tanto, el número de divisiones rondará las 200 a los 20 años y a unas 650 a los 40. Como apuntó Crow (1993), el incremento observado de la tasa de mutación con la edad puede ser incluso mayor que el esperado por la simple extrapolación obtenida a partir del incremento en el número de divisiones celulares de la línea germinal. Sin embargo, la relación entre las tasas de mutación de machos y hembras en el resto de las especies estudiadas parece ser sólo del doble (Crow, 1992).

En resumen, podemos decir que en la actualidad coexisten dos tendencias tanto a la hora de explicar las propiedades de las mutaciones perjudiciales no severas como a la de predecir las consecuencias de su acumulación. Una defiende la idea de que muchas mutaciones de efecto pequeño producen un declive en eficacia de aproximadamente un 1% por generación (Mukai y col., 1972; Ohnishi, 1977b; Kibota y Lynch, 1996; Shabalina y col., 1997), mientras que la otra aboga por que menos mutaciones de mayor efecto provocan un declive menor, del orden de 0.2% por generación para viabilidad (Fernández y López-Fanjul, 1996; Keightley, 1996; García-Dorado, 1997; Keightley y Caballero, 1997). Es preciso, por tanto, resolver experimentalmente esta discrepancia puesto que las predicciones teóricas basadas en

uno u otro conjunto de datos son muy dispares, por ejemplo, el lastre mutacional y el riesgo de extinción son considerablemente mayores en el primer caso.

La siguiente tabla recoge algunas de las estimas de la tasa gamética de mutación deletérea, en *Drosophila* y otros organismos, obtenidas en experimentos de acumulación de mutaciones:

| Especie | Carácter | Experimento | Método* | λ |
|------------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| <i>D. melanogaster</i> | Viabilidad competitiva | Mukai (1964) | BM | 0.35 |
| | | Mukai y col. (1972) | BM | 0.43 |
| | | | MD ^a | 0.011 |
| | | Ohnishi (1977) | BM | 0.14 |
| | | | MD ^a | 0.010 |
| | | Fry y col. (1999) | BM | 0.04 |
| MD ^a | 0.022 | | | |
| | Viabilidad no competitiva | Fernández y López Fanjul (1996) | BM | 0.02 |
| | | | MD ^a | 0.016 |
| <i>A. thaliana</i> | Eficacia | Schultz y col. (1999) | BM | 0.04 ^b |
| | | Shaw y col. (2000) | BM | 0.001 |
| <i>E. coli</i> | Eficacia | Kibota y Lynch (1996) | BM | 0.0002 |
| <i>C. elegans</i> | Eficacia | Keightley y Caballero (1997) | BM | 0.013 |
| | | | MV ^c | 0.0035 |
| | | Vassilieva y Lynch (1999) | BM | 0.008 |
| MV ^c | 0.0046 | | | |
| | | Vassilieva y col. (2000) | BM | 0.0068 |

* BM: Bateman-Mukai; MD: mínima distancia; MV: máxima verosimilitud.

^a García-Dorado y col. (1999).

^b Calculado a partir de los datos presentados en la Tabla 2 en Schultz y col. (1999).

^c Keightley y Bataillon (2000).

Es crucial para poder comprender un gran número de aspectos evolutivos, tales como el lastre genético encubierto en heterocigosis en poblaciones naturales o el mantenimiento de la variabilidad genética en el equilibrio mutación-selección, un mayor y más preciso conocimiento de los efectos de las mutaciones deletéreas en heterocigosis. Es por esto que el grado de dominancia de éstas mutaciones se

presenta como un parámetro esencial, pero las estimas aportadas hasta ahora son escasas, con excepción de las correspondientes a mutaciones de carácter letal que son, en la práctica, totalmente recesivas ($E(b) = 0.03$; Crow y Simmons, 1983).

Se ha recurrido a diferentes técnicas para estimar el coeficiente de dominancia de las mutaciones ($b = 0, 0.5$ y 1 para acciones génicas recesiva, aditiva y dominante, respectivamente, y $b < 1$ o $b > 1$ para sobredominancia o subdominancia). Unas se centran en el análisis de cromosomas extraídos de poblaciones naturales, pero la fiabilidad de sus conclusiones depende críticamente de la validez de la suposición de que la población está en equilibrio mutación-selección. Otras, en principio más fiables, se basan en la comparación de los efectos sobre viabilidad de cromosomas de líneas AM, en homocigosis y heterocigosis. El objetivo principal de estos experimentos de acumulación es obtener estimas de las propiedades de las mutaciones no severas (MNS), por tanto, en ellos sólo se consideran los cromosomas con una viabilidad mayor que $2/3$ (cromosomas cuasinormales). Las únicas estimas referentes a estos cromosomas derivan de dos trabajos llevados a cabo por Mukai y colaboradores (Mukai, 1964; Mukai y col., 1965; Mukai y Yamazaki, 1968) y Ohnishi (1974; 1977a, b, c). Houle y col. (1997) también aportaron estimas del grado medio de dominancia de mutaciones espontáneas con respecto a varios componentes de eficacia en *Drosophila melanogaster*, aunque en estos análisis se incluyeron cromosomas con efecto deletéreo severo y sólo se excluyeron aquellos que portaban letales. Debido a que las mutaciones altamente deletéreas tienden a ser recesivas (Caballero y Keightley, 1994), es probable que el valor de $E(b)$ obtenido sea una infraestima del correspondiente a las mutaciones MNS.

Una parte de los resultados publicados en *Drosophila melanogaster* se refiere a los llamados heterocigotos en acoplamiento, portadores de un cromosoma en el que se había permitido la acumulación de mutaciones y otro que supuestamente estaba libre de ellas. En este caso, Mukai obtuvo una estima negativa (-0.17), indicadora en principio de acción génica sobredominante (Mukai y col., 1965). Otros experimentos realizados por Ohnishi concluyeron en resultados diferentes, pues su

estima tomó el valor de 0.49 (Ohnishi, 1977c).

En otro tipo de experimentación, se formaron heterocigotos en repulsión portadores de dos cromosomas diferentes en los que, en principio, se habían acumulado mutaciones en distintos loci. Para este tipo de heterocigotos los resultados de Mukai y Ohnishi coincidieron en una estima de 0.4. Dada la discrepancia entre los resultados correspondientes a los heterocigotos en acoplamiento (Simmons y Crow, 1977), el resultado que sugiere sobredominancia ha sido tomado como espurio. Por tanto, el valor típico comúnmente citado para la dominancia de las mutaciones MNS es 0.4.

Sin embargo, diferentes argumentos arrojan dudas sobre la validez de este dato ampliamente aceptado. Los resultados discrepantes para heterocigotos en acoplamiento y en repulsión obtenidos por Mukai, aun no han sido explicados. Es más, la estima de 0.4 correspondiente a los heterocigotos en repulsión, se obtuvo tras eliminar del análisis alrededor de 1/5 de los heterocigotos, debido a que estos mostraban sobredominancia (Mukai y Yamazaki, 1968; Mukai, 1969b). Estos heterocigotos descartados se correspondían con aquellos cruces en los que al menos uno de los cromosomas mostraba alta viabilidad en homocigosis, lo cual trató de justificarse suponiendo que estos heterocigotos eran, en realidad, heterocigotos en acoplamiento. García-Dorado y Caballero (2000) han reanalizado los datos de Ohnishi encontrando que el valor $E(\bar{b}) = 0.4$, inferido del declive de la viabilidad estimado en heterocigosis, es difícilmente conciliable con el bajo valor de la regresión de la viabilidad en heterocigosis sobre la de los homocigotos. Esta regresión sugiere un grado de dominancia más bajo ($\bar{b} \approx 0.2$), de aquí que el valor correspondiente a las mutaciones deletéreas acumuladas en cromosomas cuasinormales pueda ser más pequeño que el tradicionalmente aceptado.

OBJETIVOS

En este trabajo se han reexaminado las líneas de Fernández y López-Fanjul después de un periodo adicional de acumulación de mutaciones de 144 generaciones (250 en total), pero utilizando un diseño experimental modificado, cuyo propósito es eliminar los inconvenientes que tenía el usado inicialmente. En este sentido, se han llevado a cabo evaluaciones simultáneas de viabilidad en las líneas AM y en el control. Por otra parte, la viabilidad se ha medido en condiciones competitivas. Además, no sólo se obtienen los valores de viabilidad relativos al genotipo $Cy/+$, como ocurría en los diseños de Mukai, Ohnishi o Fry, sino también relativos al genotipo Cy/L , que son independientes del coeficiente de dominancia medio de las mutaciones implicadas. En esta situación, se han calculado la tasa gamética de mutaciones deletéreas no severas con efecto sobre viabilidad λ , los efectos esperados de éstas en homocigosis $E(s)$ y su grado de dominancia $E(b)$.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El organismo utilizado en este trabajo fue el díptero *Drosophila melanogaster*. Se estudió un conjunto formado inicialmente por 200 líneas homocigotas en todos los loci, derivadas todas ellas de la cepa isogénica obtenida por Caballero, Toro y López-Fanjul (1991) y mantenidas independientemente, a continuación, mediante alta consanguinidad, equivalente a un apareamiento hermano por hermana por línea y generación (Santiago y col., 1992). La población base llevaba incorporado en el cromosoma III el marcador recesivo *Sepia* (*Se*) que afecta al color de ojos (marrón en lugar del rojo vivo característico). Dicha particularidad permite detectar posibles contaminaciones de las líneas con individuos de genotipo silvestre.

Paralelamente se disponía de una población control, también derivada de la cepa isogénica anterior, mantenida al comienzo en 8 botellas y en 25 a partir de la generación 200, con un esquema circular de apareamiento en ambos casos. Esta manera de proceder asegura alrededor de 800 y 2500 padres potenciales por generación, respectivamente. El censo efectivo será, por tanto, lo bastante grande como para que el cambio genético por deriva, debido a las mutaciones surgidas durante el experimento, sea mínimo.

Se utilizó, además, una cepa (*In(2LR) O, Cy dp^{bl} pr cn² / L²*) portadora de las mutaciones del cromosoma II *Curly* (*Cy*) y *Lobe* (*L*), en heterocigosis y repulsión. El marcador *Curly* se encuentra en posición 6.1 asociado a la inversión *SM5*, lo que supone la ausencia de sobrecruzamiento en las hembras. Esta mutación, letal en doble dosis, provoca en heterocigosis la curvatura de las alas, lo que nos permite distinguir a los individuos portadores. La mutación *Lobe*, localizada en la posición 72.0, provoca en heterocigosis una reducción del tamaño del ojo, permitiéndonos, por tanto, distinguir también los individuos que la portan, mientras que en

homocigosis causa ojos diminutos y una viabilidad muy reducida.

Cuando se comenzó el experimento restaban 92 líneas de las 200 originales y habían transcurrido, tanto para estas como para la población control, 250 generaciones desde el inicio de unas y otra.

2.2. CONDICIONES DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado se obtenía mediante cocción de 100 gramos de azúcar, 100 gramos de levadura, 12 gramos de agar industrial y 2.5 gramos de sal por litro de agua. Dicha mezcla, una vez llevada a ebullición, se mantenía a 100 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo se dejaba enfriar hasta 55 °C para añadir entonces, como fungicida, ácido propiónico al 0.5 % (v/v).

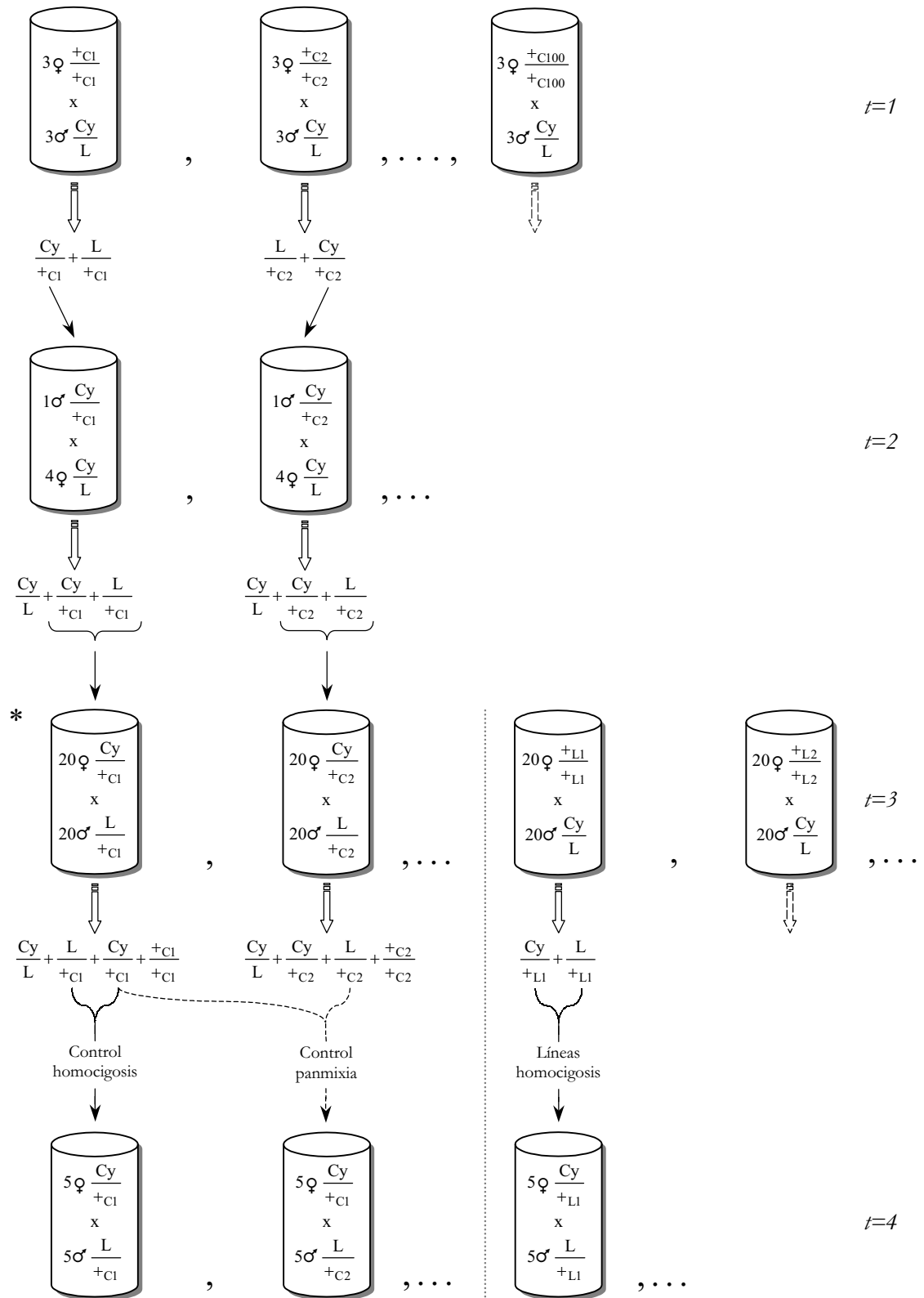
Las líneas se alojaban en tubos de vidrio de fondo plano de 20 mm de diámetro por 90 mm de altura, a los que se añadían 5 cm³ de medio alimenticio por tubo. Dichos tubos se mantenían en una cámara con iluminación constante y control de temperatura (25 ± 1 °C) y humedad (45 ± 5 % HR). En estas condiciones el ciclo biológico del díptero (metamorfosis con tres fases de larva y la de pupa antes de la emergencia del adulto) se completa en 10 días. Las manipulaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente del laboratorio, utilizando gas CO₂ como anestésico.

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

La metodología utilizada para estimar la viabilidad de los cromosomas II, tanto en la población control como en las líneas, se muestra a continuación:

Experimento 1. Efectuado a partir de la generación 250 y destinado a obtener una medida simultánea de la viabilidad del cromosoma II, en homocigosis en las líneas y en homocigosis y panmixia en el control (figura 1):

Figura 1. Experimento 1: esquema de cruzamientos seguido para evaluar la viabilidad del cromosoma II del control, tanto en homocigosis como en panmixia, y de las líneas en homocigosis.



* Cruces realizados en botellas de 250 ml.

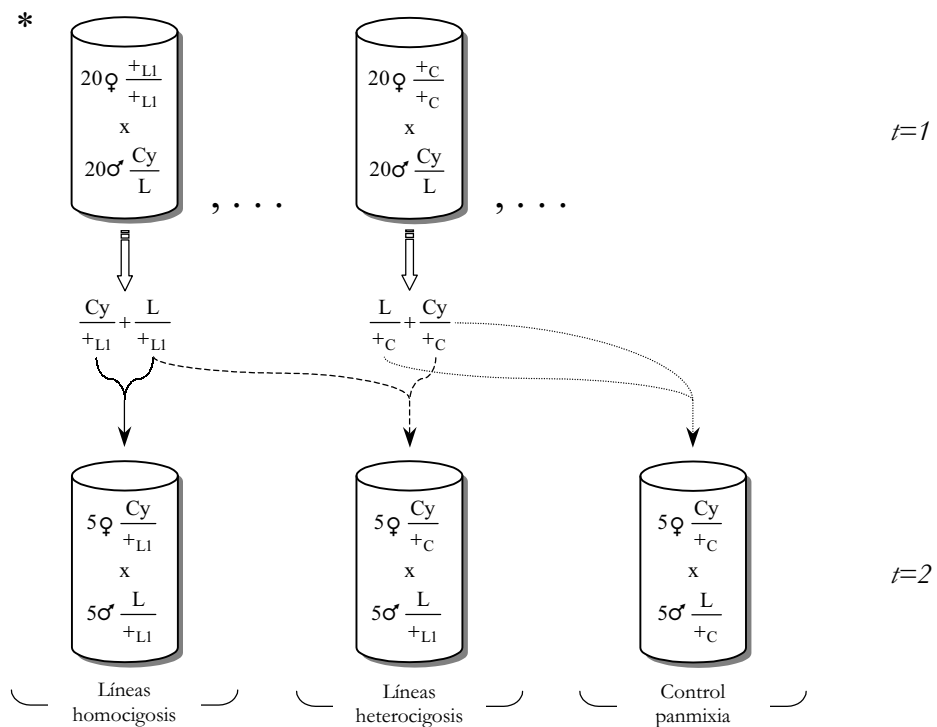
+c_i representa un cromosoma II al azar del control y +L_i el cromosoma II de la línea i

- Generación 1 (control): Se aislaron 100 cromosomas II de la población control. Para ello se dispusieron 100 cruzamientos formados cada uno por 3 machos Cy/L y tres hembras vírgenes del control. De cada cruzamiento se recogió un solo macho $Cy/+_{G_i}$, donde $+_{G_i}$ ($i = 1, \dots, 100$) representa un cromosoma II obtenido al azar de la población control.
- Generación 2 (control): Cada uno de los 100 machos $Cy/+_{G_i}$ obtenidos se cruzó con 4 hembras Cy/L . Se obtuvieron 20 machos $L/+_{G_i}$ y 20 hembras vírgenes $Cy/+_{G_i}$ de la descendencia de cada macho.
- Generación 3 (control): Se establecieron 100 cruzamientos. En cada uno de ellos se cruzaron los 40 descendientes de un mismo cruce de la generación anterior. De la descendencia de cada cruzamiento se utilizaron 30 hembras vírgenes $Cy/+_{G_i}$ y 30 machos $L/+_{G_i}$.
- Generación 3 (líneas): Para cada línea se cruzaron 20 hembras vírgenes de la línea con 20 machos Cy/L . De cada cruzamiento se recogieron 15 hembras $Cy/+_{L_i}$ y 15 machos $L/+_{L_i}$, donde $+_{L_i}$ ($i = 1, \dots, 92$) representa el cromosoma II de la línea i .
- Generación 4 (control): Con la mitad de la descendencia de cada cruzamiento de la generación anterior se dispusieron 3 cruces de 5 hembras $Cy/+_{G_i}$ por 5 machos $L/+_{G_i}$ para medir la viabilidad de los cromosomas II control en homocigosis. La otra mitad de la descendencia se destinó a evaluar la viabilidad de los mismos cromosomas en panmixia, para lo cual se llevaron a cabo otros 3 cruzamientos de 5 hembras $Cy/+_{G_i}$ (del apareamiento i -ésimo de la generación anterior) por 5 machos $L/+_{G_{i+1}}$ (del apareamiento $i+1$ -ésimo de dicha generación).
- Generación 4 (líneas): Para evaluar la viabilidad en homocigosis del cromosoma II de cada línea se dispusieron 3 cruzamientos formados, cada uno, por 5 hembras $Cy/+_{L_i}$ y 5 machos $L/+_{L_i}$.

Experimento 2. Llevado a cabo a partir de la generación 255 para medir simultáneamente la viabilidad del cromosoma II, en homocigosis y heterocigosis en las líneas y en panmixia en la población control (figura 2):

- ▶ Generación 1 (control): Se dispusieron 100 cruzamientos, cada uno de ellos entre 20 hembras vírgenes del control y otros tantos machos Cy/L . De la descendencia se recolectaron hembras vírgenes $Cy/+c$ y machos $L/+c$.
- ▶ Generación 1 (líneas): Se cruzaron 20 hembras de cada línea con 20 machos Cy/L . De cada cruzamiento se obtuvieron 25 hembras vírgenes de fenotipo Curly, $Cy/+L$, y 50 machos de fenotipo Lobe, $L/+L$.
- ▶ Generación 2 (control): Con los descendientes de los cruces de la generación anterior se establecieron 25 líneas, cada una formada por 5 cruzamientos entre 5 hembras vírgenes $Cy/+c$ y 5 machos $L/+c$ (evaluación control).
- ▶ Generación 2 (líneas): En cada línea se llevaron a cabo los siguientes cruzamientos: a) 5 cruces entre 5 hembras vírgenes $Cy/+L$ y 5 machos $L/+L$ (evaluación en homocigosis); y b) otros 5 cruzamientos, cada uno entre 5 hembras vírgenes $Cy/+c$ y 5 machos $L/+L$ (evaluación en heterocigosis).

Figura 2. Experimento 2: protocolo de cruces destinado a evaluar la viabilidad del cromosoma II de las líneas, en homocigosis y heterocigosis, y del control en panmixia.



* Cruces realizados en botellas de 250 ml.

La viabilidad media de los cromosomas II pertenecientes al control y a las líneas, tanto en el primero como en el segundo experimento, se estimó a partir de la segregación fenotípica en la descendencia de los cruzamientos realizados, calculándose como:

1) Índice 1: el logaritmo neperiano del cociente entre el número de individuos de fenotipo silvestre y el de individuos de fenotipo *Cy/L* recolectados.

2) Índice 2: el logaritmo neperiano del cociente entre el total de individuos silvestres y el total de individuos de fenotipo *Curly*, al igual que en experimentos análogos previos (Mukai y col., 1972). Esta última medida de viabilidad, al estar referida al genotipo *Cy/+*, es dependiente del grado de dominancia medio de las mutaciones implicadas.

En ambos experimentos, todos los tubos destinados a hospedar los cruces con los que se determinó la viabilidad (en la fase 1, en $t = 4$ y en la fase 2, en $t = 2$) fueron aleatorizados tanto antes de ser utilizados como en su ubicación en la cámara tras llevar a cabo los cruzamientos; además, se realizó una evaluación ciega ya que se ocultaron los distintivos trazados en los tubos antes de evaluar la descendencia

Por último, todos los individuos evaluados fueron de fenotipo *Sepia*, lo que confirmó que no se había producido contaminación por parte de fuentes externas en línea alguna.

2.4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

2.4.1. MODELO GENERAL

Supongamos que: 1) el número de mutaciones I con efecto sobre viabilidad V que ocurren en el cromosoma II por gameto y generación, es una variable aleatoria Poisson con media λ ; 2) una población totalmente homocigota se divide

en líneas independientes (líneas MA) mantenidas cada una de ellas, durante t generaciones, con un censo efectivo lo suficientemente pequeño para hacer despreciables tanto el efecto de la selección natural sobre las frecuencias génicas como la magnitud de la varianza genética intralínea por generación; y 3) si m es un cromosoma que lleva una mutación nueva y $+$ el que no la porta, las viabilidades de los genotipos $++$, $+m$ y mm son 1 , $1-s_h$ y $1-s$, respectivamente. Estos valores de s , que corresponden a los efectos en homocigosis de las mutaciones, se consideran variables aleatorias continuas.

En una línea determinada, la frecuencia q de cada una de las mutaciones aparecidas en la generación j fluctuará aleatoriamente durante un cierto número de generaciones, hasta que la mutación se pierda ($q = 0$) o se fije ($q = 1$). En esta situación, el número i de mutaciones del cromosoma II fijadas en una línea en la generación t , es una variable Poisson con media $\lambda_t = \lambda F_t^a$, donde F_t^a es el coeficiente de consanguinidad acumulado en la generación t que se define como

$$F_t^a = \sum_{j=0}^{t-1} F_{jt}$$

siendo F_{jt} el coeficiente de consanguinidad en la generación t si se ignora la consanguinidad previa a la generación j .

Suponiendo que las líneas son homocigotas, F_{jt} es la probabilidad de que, en un locus dado, todos los genes presentes en la línea en la generación t sean copias de un único gen presente en la generación j (Wray, 1990). En la generación t , la media del carácter en cada línea, \bar{V}_t , se estima a partir de muestras de igual tamaño N_s . Por tanto, si en una línea se han fijado i mutaciones con efectos s_1, \dots, s_i , tenemos

$$(\bar{v}_i | i) = m_{0t} - \sum_{k=1}^i s_k + R,$$

siendo m_{0t} la media del carácter en la población control evaluada en la generación t y R el error de muestreo de \bar{V} en la generación t . Si la distribución de V no se aleja de la normal y N_S no es muy pequeño, se puede suponer que R se distribuye normalmente $N(0, \sigma_R)$.

Designando por $g(\bar{v}_t | i)$ la función de densidad, la correspondiente función de densidad marginal de \bar{V}_t es

$$f(\bar{v}_t) = \sum_{i=0}^{\infty} P(i; \lambda_t) g(\bar{v}_t | i),$$

siendo $P(i; \lambda_t)$ la probabilidad de que una línea porte i mutaciones en la generación t . La media y la varianza de la distribución de \bar{V}_t son:

$$E(\bar{v}_t) = m_{0t} - \lambda F_t^a E(s) \quad (1)$$

$$\sigma^2(\bar{v}_t) = \sigma_R^2 + \lambda F_t^a E(s^2) \quad (2)$$

2.4.2. ESTIMAS CLÁSICAS DE $\lambda E(s^2)$ Y $\lambda E(s)$

La ecuación (2) muestra que la varianza interlíneas en la generación t es $\sigma_I^2 = \lambda F_t^a E(s^2)$, por lo que la tasa de incremento de dicha varianza ($\Delta \mathcal{V}$) nos permite estimar $\lambda E(s^2)$:

$$\lambda E(s^2) \equiv \Delta \mathcal{V} = \hat{\sigma}_I^2 / F_t^a .$$

En nuestro caso la variabilidad genética interlíneas del carácter considerado en cada generación se estimó a partir del análisis de la varianza basado en el modelo $v_{ik} = l_i + e_k$, donde l_i es el efecto de la línea i y e_k es el residuo aleatorio correspondiente a la medida de viabilidad obtenida en el cruce i . El componente

entre líneas de la varianza se define como

$$\hat{\sigma}_1^2 = (MCL - MCE)/N,$$

donde MCL y MCE son las medias de cuadrados de las líneas y del error, respectivamente, y N es el número de repeticiones evaluadas por línea.

De equivalente manera y valiéndonos del siguiente modelo de análisis de varianza (efectos aleatorios), se estimó σ_l^2 cuando se consideraron de manera conjunta los dos experimentos (generaciones 250 y 255):

$$y_{ijk} = l_i + g_j + (lg)_{ij} + e_{ijk},$$

siendo l_i el efecto de la i -ésima línea, g_j el efecto de la generación j -ésima, $(lg)_{ij}$ el término que mide la interacción línea-generación (diferencia entre la media de la línea i -ésima en la generación j -ésima y su valor esperado bajo un modelo aditivo) y e_{ijk} el error aleatorio correspondiente a la ijk -ésima repetición.

De esta manera, la varianza total se partió en componentes debidos a diferencias entre repeticiones de una línea en la misma generación, entre las medias de las líneas promediadas sobre generaciones ($\hat{\sigma}_l^2$), entre las medias en distintas generaciones promediadas sobre líneas y, por último, el correspondiente a la interacción línea por generación que, en principio, es debido a efectos mutacionales que no son constantes a lo largo de las generaciones (interacción genotipo-generación). Este diseño permite separar las diferencias ambientales entre líneas de las genéticas, incluyéndose las últimas en $\hat{\sigma}_l^2$. La varianza interlíneas se estima a partir del siguiente término derivado del análisis de varianza factorial:

$$\hat{\sigma}_1^2 = \frac{(MCL - MCLG)}{JN},$$

siendo MCL y $MCLG$ las medias de cuadrados correspondientes a las líneas y a la interacción línea-generación, mientras que J y N son el número de generaciones y el número de réplicas evaluadas por línea y generación, respectivamente.

El error típico (ET) con el que se estimó $\lambda E(s^2)$ se dedujo a partir de la expresión:

$$ET[\lambda E(s^2)] = \frac{\sqrt{\sigma_{MCL}^2 + \sigma_{MCX}^2}}{NF_t^a},$$

en la que σ_{MCL}^2 se corresponde con $2MCL^2/\gamma$, σ_{MCX}^2 con $2MCX^2/\gamma$ y N es el número de repeticiones por línea. MCL se sustituyó por la media de cuadrados de las líneas y MCX se igualó a la media de cuadrados correspondientes al error (MCE) y a la interacción línea-generación ($MCLG$), según se computara a partir de un análisis de la varianza mono o multifactorial, respectivamente; γ son los grados de libertad correspondientes a cada caso.

La obtención de estimas clásicas de $\lambda E(s)$, que es la reducción observada de la media del carácter por generación, requiere del cálculo de m_{0t} (ecuación (1)). De la población control se puede obtener una evaluación de m_{0t} , pero el que en ella se produzcan cambios genéticos debidos a la aparición de mutaciones durante el proceso de acumulación no es un hecho improbable. Así, pues, las estimas de $\lambda E(s)$ pueden estar sesgadas. Siguiendo la ecuación (1), evaluamos $\lambda E(s)$ usando la media de la población control como estima de m_{0t} , de modo que:

$$\lambda E(s) \equiv \Delta \mathcal{M} = \frac{(m_{ct} - m_{lt})}{F_t^a},$$

siendo m_{lt} la media de las líneas y m_{ct} la del control. El ET de $\lambda E(s)$ se obtiene de la siguiente expresión:

$$ET[\lambda E(s)] = \frac{1}{F_t^a} ET(\Delta \mathcal{M}) = \frac{1}{F_t^a} \sqrt{ET^2(\bar{X}_1) + ET^2(\bar{X}_c)},$$

en la que $ET^2(\bar{X}_l)$ y $ET^2(\bar{X}_c)$ son los errores típicos al cuadrado de las medias de las líneas y del control, respectivamente.

Podemos obtener, por tanto, en el supuesto de igualdad de efectos ($\sigma_s^2 = 0$), unos límites inferior y superior de λ y $E(s)$, respectivamente, mediante las llamadas estimas Bateman (1959):

$$\frac{\Delta \mathcal{M}^2}{\Delta \mathcal{V}} = \lambda \left[1 - \frac{\sigma_s^2}{E(s^2)} \right] \Rightarrow \frac{\Delta \mathcal{M}^2}{\Delta \mathcal{V}} \leq \lambda$$

$$\frac{\Delta \mathcal{V}}{\Delta \mathcal{M}} = E(s) \left[1 + \frac{\sigma_s^2}{E^2(s)} \right] \Rightarrow \frac{\Delta \mathcal{V}}{\Delta \mathcal{M}} \geq E(s)$$

El error típico aproximado asociado a estas estimas se calculó utilizando la expresión para la varianza de un cociente bajo la suposición de independencia:

$$\sigma_{(X/Y)}^2 = \frac{\sigma_X^2}{E^2(Y)} + \frac{E^2(X)}{[E^2(Y)]^2} \sigma_Y^2.$$

Los términos encontrados en la anterior expresión se estiman como:

$$\sigma_X^2 = [ET(X)]^2$$

$$\sigma_Y^2 = [ET(Y)]^2$$

$$E^2(X) = X^2 - [ET(X)]^2$$

$$E^2(Y) = Y^2 - [ET(Y)]^2$$

donde X e Y se corresponden con ΔV y ΔM , respectivamente, al estimar el error típico de $E(s)$ y con ΔM y $E(s)$ al calcular el perteneciente a λ .

2.4.3. ESTIMA DEL GRADO DE DOMINANCIA

El coeficiente de dominancia medio de las mutaciones espontáneas es un parámetro esencial a la hora de hacer predicciones teóricas concernientes al mantenimiento de la variabilidad genética (Caballero y Keightley, 1994).

En la población control, es posible obtener estimas indirectas del coeficiente de dominancia a partir del análisis de cromosomas extraídos de una población natural. Utilizaremos un modelo de un locus con dos alelos, donde A_1 y A_2 son los alelos no mutante y mutante, respectivamente; la frecuencia génica de A_1 es p y la de A_2 es q ($q = 1-p$); b es el grado de dominancia del alelo mutante ($b = 0, 0.5$ y 1 para acciones génicas recesiva, aditiva y dominante, respectivamente, y $b < 1$ o $b > 1$ para sobre y subdominancia) y s ($0 < s \leq 1$) el coeficiente de selección en contra del homocigoto $A_2 A_2$ (Mukai y col., 1972; Mukai y Yamaguchi, 1974). La siguiente tabla se obtiene cuando se cruzan en panmixia genotipos homocigotos:

| | | | |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Genotipo | A_1A_1 | A_1A_2 | A_2A_2 |
| Frecuencia | p^2 | $2pq$ | q^2 |
| Viabilidad relativa (Y) | 1 | $1-sh$ | $1-s$ |
| Homocigotos parentales | $A_1A_1 + A_1A_1$ | $A_1A_1 + A_2A_2$ | $A_2A_2 + A_2A_2$ |
| Suma viabilidades relativas (X) | 2 | $2-s$ | $2-2s$ |

De acuerdo con la tabla, la varianza de X (varianza de la suma de los valores genotípicos de la viabilidad de los homocigotos parentales), la varianza de Y (varianza del valor genotípico de la viabilidad del heterocigoto) y la covarianza entre X e Y pueden ser calculadas como:

$$\sigma_X^2 = 2pqs^2$$

$$\sigma_Y^2 = 2pqs^2 \left[(1-2pq)h^2 - 2q^2h + q(1+q)/2 \right]$$

$$\sigma_{X \cdot Y} = 2pqs^2 [h + q(1-2h)]$$

Si suponemos que 1) q_i es muy baja ($p \approx 1$), 2) hay n loci segregando en el cromosoma, y 3) las mutaciones no presentan efectos epistáticos; el cociente $\sigma_{X \cdot Y} / \sigma_X^2$ resultaría en la siguiente expresión:

$$\frac{\sigma_{X \cdot Y}}{\sigma_X^2} = \frac{2 \sum_{i=1}^n p_i q_i s_i^2 [h_i + q_i (1-2h_i)]}{2 \sum_{i=1}^n p_i q_i s_i^2} \approx \frac{\sum_{i=1}^n p_i q_i s_i^2 h_i}{\sum_{i=1}^n p_i q_i s_i^2} \quad (3),$$

y si la frecuencia génica de A_2 en el locus i -ésimo fuese la correspondiente al equilibrio mutación-selección que se expresa como $q_i = \lambda_i / s_i b_i$, donde λ_i es la tasa de mutación para el locus i ; entonces, el coeficiente de regresión de Y sobre X ($\beta_{Y \cdot X} = \sigma_{X \cdot Y} / \sigma_X^2$) ofrece una estima de la media armónica \tilde{h}_m de los coeficientes de dominancia de las mutaciones recién aparecidas ponderadas por s_i , su efecto mutacional en homocigosis:

$$\hat{h} = \frac{\sum_{i=1}^n p_i q_i s_i^2 h_i}{\sum_{i=1}^n p_i q_i s_i^2} \approx \frac{\sum_{i=1}^n \lambda_i s_i}{\sum_{i=1}^n \lambda_i s_i / h_i} = \tilde{h}_m.$$

No obstante, debido a su tamaño, nuestra población control estará más próxima al equilibrio mutación-deriva-selección que al equilibrio mutación-selección. Esto significa que habrá menos loci segregantes pero en los que q_i será como media mayor que $\lambda_i / s_i b_i$; por tanto, en el numerador de la ecuación (3) la expresión del corchete será mayor que h y $\sigma_{X \cdot Y} / \sigma_X^2$ sobreestimaré la media armónica del coeficiente de dominancia de la nueva mutación. Además, como se

espera que s y h estén negativamente correlacionados, la ponderación por s llevará a cierta sobreestima de la media armónica de las h no ponderadas (en la medida en que estén presentes mutaciones de efecto grande que suelen ser marcadamente recesivas) y, a su vez, la media armónica subestimaré la aritmética. El resultado con estos sesgos es incierto y será comentado en la discusión.

Por este motivo nos limitaremos a interpretar las estimas obtenidas usando la ecuación 3 para la población control como la media de h ponderada por s^2 para el conjunto de copias de mutaciones deletéreas presentes en la población. Para simplificar, esta estima será denotada como \hat{h} .

Por otra parte, en la generación 255 se evaluó la viabilidad media de los cromosomas de acumulación de mutaciones en homocigosis y heterocigosis con un cromosoma control. En este caso podemos suponer que cada mutación está representada en sólo una línea i y que, al ser elevado el número n de ellas evaluadas, la media de las $(n-1)$ líneas restantes es aproximadamente igual a la media del conjunto de las n líneas. Entonces, para una mutación con efectos s y sh y siendo X e Y los valores genotípicos de la viabilidad en homocigosis y heterocigosis, respectivamente:

$$\sigma_{X \cdot Y} = E(X - \bar{X})(Y - \bar{Y}) \approx \frac{1}{n}(s)(sh) + \left(1 - \frac{1}{n}\right)(0) = \frac{s^2 h}{n}$$

$$\sigma_X^2 = E(X - \bar{X})^2 \approx \frac{1}{n}s^2 + \left(1 - \frac{1}{n}\right)(0) = \frac{s^2}{n},$$

y considerando todas las mutaciones acumuladas:

$$\frac{\sigma_{X \cdot Y}}{\sigma_X^2} = \frac{\sum s^2 h}{\sum s^2} = h_{ws^2},$$

que es el coeficiente de dominancia medio de la nueva mutación ponderada por el

cuadrado del efecto en homocigosis y tenderá, por tanto, a subestimar el b medio no ponderado debido a la mayor recesividad de las mutaciones más deletéreas.

En ambos casos (control 250, líneas 255), $\sigma_{X.Y} / \sigma_X^2$ se calculó utilizando las estimas disponibles de la covarianza entre los valores fenotípicos de homocigotos y heterocigotos y el componente genético de la varianza en homocigosis obtenido a partir del análisis de la varianza correspondiente (Mukai y Yamazaki, 1968; Mukai y col., 1972).

Nuestra estima de $E(b_{w,2})$, a la que también denominaremos \hat{b} , será calculada como $\hat{\sigma}_{XY} / \hat{\sigma}_X^2$, donde el acento circunflejo indica las estimas correspondientes. Así pues, la interpretación de \hat{b} dependerá de si nos referimos a la estima obtenida en la población segregante control o en las líneas de acumulación de mutaciones, aunque en ambos casos $\hat{b} = \hat{\sigma}_{XY} / \hat{\sigma}_X^2$.

Por otro lado, el error típico aproximado de estas estimas se calculó como:

$$ET(\hat{h}) \approx \frac{h}{b} ET(b),$$

donde \hat{h} se corresponde con la estima obtenida y b con el coeficiente de regresión de los valores fenotípicos en heterocigosis sobre los correspondientes al homocigoto (o suma de homocigotos en el caso de la población control).

3. RESULTADOS

3.1. DISTRIBUCIÓN DE LA MEDIA DE LAS LÍNEAS

Las distribuciones de los valores de viabilidad del cromosoma II correspondientes a las líneas AM (en homocigosis y heterocigosis) y al control (en homocigosis y panmixia), se exponen en las Figuras 3-4 con respecto al índice 1 y en las Figuras 5-6 para el índice 2.

Las medias, varianzas y coeficientes de asimetría y curtosis de las distribuciones mencionadas, junto con sus correspondientes errores típicos, se muestran en las Tablas 1 (índice 1) y 2 (índice 2).

Los análisis de varianza conducentes a la estimación del componente interlíneas de la varianza se presentan en las Tablas 3-4 (índice 1) y 5-6 (índice 2).

Tabla 1. Viabilidad relativa a Cy/L (índice 1): media (\bar{X}), varianza (σ^2) y coeficientes de asimetría (g_1) y curtosis (g_2) de las distribuciones de la viabilidad del cromosoma II de las líneas AM (en homocigosis y heterocigosis) y del control (en homocigosis y panmixia).

| | \bar{X} | $\sigma^2 (\times 10^{-2})$ | g_1 | g_2 |
|-----------------------|-------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| Generación 250 | | | | |
| Líneas homocigosis | 0.341±0.029 | 7.447 | 0.068±0.260 | -0.147±0.514 |
| Control homocigosis | 0.370±0.025 | 5.310 | 0.273±0.266 | -0.033±0.526 |
| Control panmixia | 0.447±0.027 | 5.814 | 0.468±0.266 | 1.815±0.526 |
| Generación 255 | | | | |
| Líneas homocigosis | 0.424±0.026 | 6.037 | -0.237±0.260 | 0.650±0.514 |
| Líneas heterocigosis | 0.867±0.025 | 5.203 | 0.014±0.260 | -0.739±0.514 |
| Control panmixia | 0.799±0.069 | 12.000 | 0.210±0.464 | -0.424±0.902 |

Para obtener dichos histogramas de frecuencia, los estadísticos descriptivos

anteriormente mencionados y los anovas, se eliminaron del análisis aquellos cromosomas en los que: 1) el número total de individuos silvestres y Cy/L obtenidos en el conjunto de las réplicas de un determinado cruzamiento, fuera menor o igual que veinticinco en alguna de las dos generaciones (líneas AM 21 y 198, junto con cuatro cromosomas control, para el índice 1; línea AM 198 más dos cromosomas control, para el índice 2; 2) no se disponía de datos en alguna generación (líneas AM 111, 137 y 190 para ambos índices); y 3) se detectó la presencia de letales (cuatro cromosomas control en la generación 250). Las líneas cuyo índice de viabilidad se apartara de la media más de tres desviaciones típicas fueron también excluidas del análisis, pero aparecen representadas en los histogramas (línea AM 75 en el primer experimento para el índice 1 y línea AM 35 en el segundo experimento para ambos índices)

Tabla 2. Viabilidad relativa a $Cy/+$ (índice 2): media (\bar{X}), varianza (σ^2) y coeficientes de asimetría (g_1) y curtosis (g_2) de las distribuciones de la viabilidad del cromosoma II de las líneas AM (en homocigosis y heterocigosis) y del control (en homocigosis y panmixia).

| | \bar{X} | $\sigma^2 (\times 10^{-2})$ | g_1 | g_2 |
|-----------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| Generación 250 | | | | |
| Líneas homocigosis | -0.168 ± 0.024 | 5.088 | -0.262 ± 0.257 | -0.100 ± 0.508 |
| Control homocigosis | -0.113 ± 0.021 | 3.801 | 0.645 ± 0.263 | 2.140 ± 0.520 |
| Control panmixia | -0.057 ± 0.022 | 4.016 | -0.192 ± 0.263 | 0.321 ± 0.520 |
| Generación 255 | | | | |
| Líneas homocigosis | -0.171 ± 0.021 | 3.997 | 0.423 ± 0.257 | 0.966 ± 0.508 |
| Líneas heterocigosis | 0.195 ± 0.018 | 2.893 | 0.216 ± 0.257 | 1.397 ± 0.508 |
| Control panmixia | 0.176 ± 0.052 | 6.896 | 0.078 ± 0.464 | -0.825 ± 0.902 |

En los dos experimentos, la viabilidad media en homocigosis (ambos índices) de los cromosomas procedentes de las líneas AM fue significativamente menor que la correspondiente al control en panmixia (Tabla 1). En cada experimento por separado, la viabilidad media en homocigosis, tanto de los cromosomas de las líneas AM como del control, resultó ser menor que la calculada para los cromosomas de las líneas AM en heterocigosis o los del control en panmixia, respectivamente.

Utilizando el índice 1, el componente interlíneas de la varianza (Tabla 3) correspondiente a los cromosomas de las líneas AM en homocigosis fue significativamente mayor que cero en ambos experimentos, aunque no ocurrió así en los casos restantes (cromosomas de las líneas AM en heterocigosis y cromosomas control en homocigosis y panmixia). La varianza interlíneas correspondiente a las líneas AM en homocigosis fue siempre superior a su valor en heterocigosis o al del control en panmixia.

Los valores de las medias de las distribuciones de las viabilidades de las líneas fueron siempre menores para el índice 2 que para el 1, puesto que los heterocigotos $Cy/+$ eran más viables que los Cy/L . Sin embargo, las comparaciones de medias entre los diferentes grupos (en homocigosis, heterocigosis y panmixia) llevaron a conclusiones semejantes a las anteriormente expuestas para el índice 1. La varianza entre líneas fue del mismo orden para los dos índices, pero mayor para el índice 1.

Para ambos índices, los coeficientes de asimetría y curtosis de todas las distribuciones mostradas no se apartaron significativamente de la normalidad ($g_1 = g_2 = 0$), lo que es previsible tras un largo periodo de acumulación de mutaciones.

Tabla 3. Viabilidad relativa a Cy/L (índice 1): análisis de la varianza y varianzas genéticas interlíneas σ_1^2 obtenidas para cada grupo en distintas generaciones.

| | S. C. | G. L. | M. C. | F | Sig. | σ_1^2 |
|-----------------------------|--------|-------|-------|---------|--------|--------------|
| Generación 250 | | | | | | |
| Líneas homocigosis | | | | | | |
| Entre líneas | 18.967 | 85 | 0.223 | 1.574 * | 0.0064 | 0.0272 |
| Dentro de línea | 24.234 | 171 | 0.142 | | | |
| Control homocigosis | | | | | | |
| Entre líneas | 14.794 | 81 | 0.183 | 1.360 | 0.0533 | 0.0171 |
| Dentro de línea | 20.147 | 150 | 0.134 | | | |
| Control panmixia | | | | | | |
| Entre líneas | 14.568 | 81 | 0.180 | 1.209 | 0.1581 | 0.0108 |
| Dentro de línea | 22.765 | 153 | 0.149 | | | |
| Generación 255 | | | | | | |
| Líneas homocigosis | | | | | | |
| Entre líneas | 29.524 | 85 | 0.347 | 1.781 * | 0.0002 | 0.0321 |
| Dentro de línea | 62.783 | 322 | 0.195 | | | |
| Líneas heterocigosis | | | | | | |
| Entre líneas | 25.886 | 85 | 0.304 | 1.106 | 0.2676 | 0.0062 |
| Dentro de línea | 87.587 | 318 | 0.275 | | | |
| Control panmixia | | | | | | |
| Entre líneas | 9.664 | 24 | 0.403 | 1.035 | 0.4468 | 0.0047 |
| Dentro de línea | 18.292 | 47 | 0.389 | | | |

* $p < 0.05$

Tabla 4. Viabilidad relativa a Cy/L (índice 1): análisis de la varianza y varianza genética interlíneas σ_1^2 (generaciones 250 y 255).

| | S. C. | G. L. | M. C. | F | Sig. | σ_1^2 |
|----------------------------|--------|-------|-------|---------|--------|--------------|
| Fuente de variación | | | | | | |
| Generación | | | | | | |
| Hipótesis | 0.978 | 1 | 0.977 | 5.101 * | 0.0264 | |
| Error | 16.766 | 87.5 | 0.192 | | | |
| Línea | | | | | | |
| Hipótesis | 28.585 | 85 | 0.336 | 1.753 * | 0.0052 | 0.0187 |
| Error | 16.308 | 85 | 0.192 | | | |
| Interacción | | | | | | |
| Hipótesis | 16.308 | 85 | 0.192 | 1.087 | 0.2927 | |
| Error | 87.018 | 493 | 0.177 | | | |

* $p < 0.05$

Tabla 5. Viabilidad relativa a *Cy/+* (índice 2): análisis de la varianza y varianzas genéticas interlíneas σ_1^2 obtenidas para cada grupo en distintas generaciones.

| | S. C. | G. L. | M. C. | F | Sig. | σ_1^2 |
|-----------------------------|--------|-------|-------|---------|--------|--------------|
| Generación 250 | | | | | | |
| Líneas homocigosis | | | | | | |
| Entre líneas | 13.722 | 87 | 0.158 | 1.307 | 0.0697 | 0.0124 |
| Dentro de línea | 21.003 | 174 | 0.121 | | | |
| Control homocigosis | | | | | | |
| Entre líneas | 9.662 | 83 | 0.116 | 1.621 * | 0.0051 | 0.0158 |
| Dentro de línea | 10.987 | 153 | 0.072 | | | |
| Control panmixia | | | | | | |
| Entre líneas | 9.469 | 83 | 0.114 | 1.346 | 0.0570 | 0.0103 |
| Dentro de línea | 13.052 | 154 | 0.085 | | | |
| Generación 255 | | | | | | |
| Líneas homocigosis | | | | | | |
| Entre líneas | 19.199 | 87 | 0.221 | 1.862 * | 0.0005 | 0.0215 |
| Dentro de línea | 39.099 | 330 | 0.118 | | | |
| Líneas heterocigosis | | | | | | |
| Entre líneas | 14.388 | 87 | 0.165 | 0.862 | 0.7951 | -0.0056 |
| Dentro de línea | 62.553 | 326 | 0.191 | | | |
| Control panmixia | | | | | | |
| Entre líneas | 15.763 | 124 | 0.240 | 1.027 | 0.4535 | 0.0022 |
| Dentro de línea | 11.453 | 149 | 0.234 | | | |

* $p < 0.05$

Tabla 6. Viabilidad relativa a *Cy/+* (índice 2): análisis de la varianza y varianza genética interlíneas σ_1^2 (generaciones 250 y 255).

| | S. C. | G. L. | M. C. | F | Sig. | σ_1^2 |
|----------------------------|--------|-------|-------|-------|--------|--------------|
| Fuente de variación | | | | | | |
| Generación | | | | | | |
| Hipótesis | 0.022 | 1 | 0.022 | 0.146 | 0.7037 | |
| Error | 13.413 | 89.2 | 0.150 | | | |
| Línea | | | | | | |
| Hipótesis | 17.924 | 87 | 0.206 | 1.366 | 0.0739 | 0.0071 |
| Error | 13.121 | 87 | 0.151 | | | |
| Interacción | | | | | | |
| Hipótesis | 13.121 | 87 | 0.151 | 1.265 | 0.0659 | |
| Error | 60.101 | 504 | 0.119 | | | |

* $p < 0.05$

Figura 3. Viabilidad relativa a Cy/L (índice 1): histogramas de frecuencia de la viabilidad media de cromosomas II extraídos de las líneas AM en homocigosis (3-A), y del control en homocigosis (3-B) y panmixia (3-C) (generación 250).

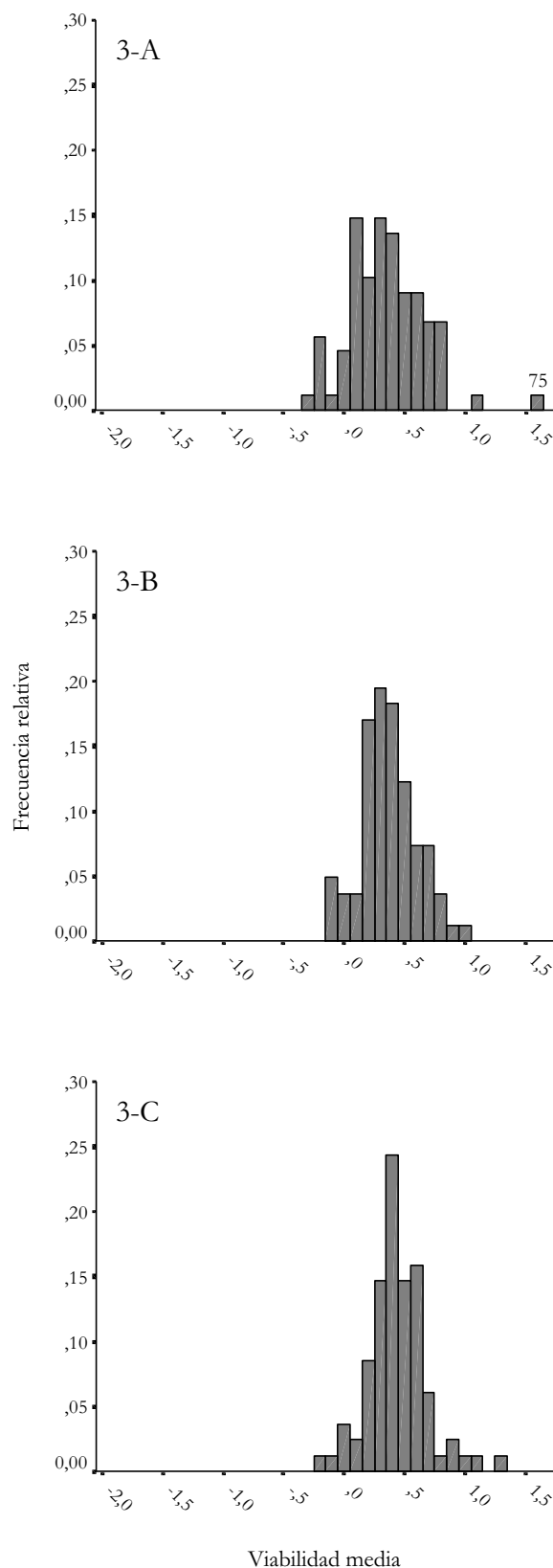


Figura 4. Viabilidad relativa a Cy/L (índice 1): histogramas de frecuencia de la viabilidad media de cromosomas II extraídos de las líneas AM en homocigosis (4-A) y heterocigosis (4-B), y del control en panmixia (4-C) (generación 255).

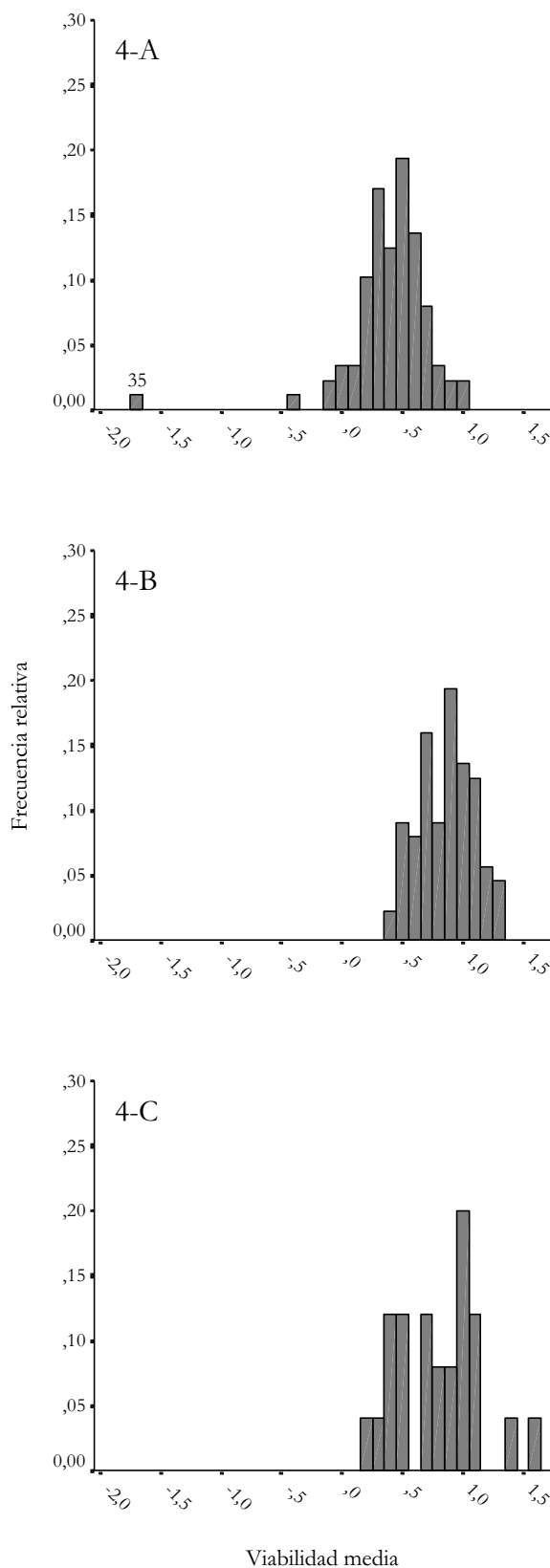


Figura 5. Viabilidad relativa a $Cy/+$ (índice 2): histogramas de frecuencia de la viabilidad media de cromosomas II extraídos de las líneas AM en homocigosis (5-A), y del control en homocigosis (5-B) y panmixia (5-C) (generación 250).

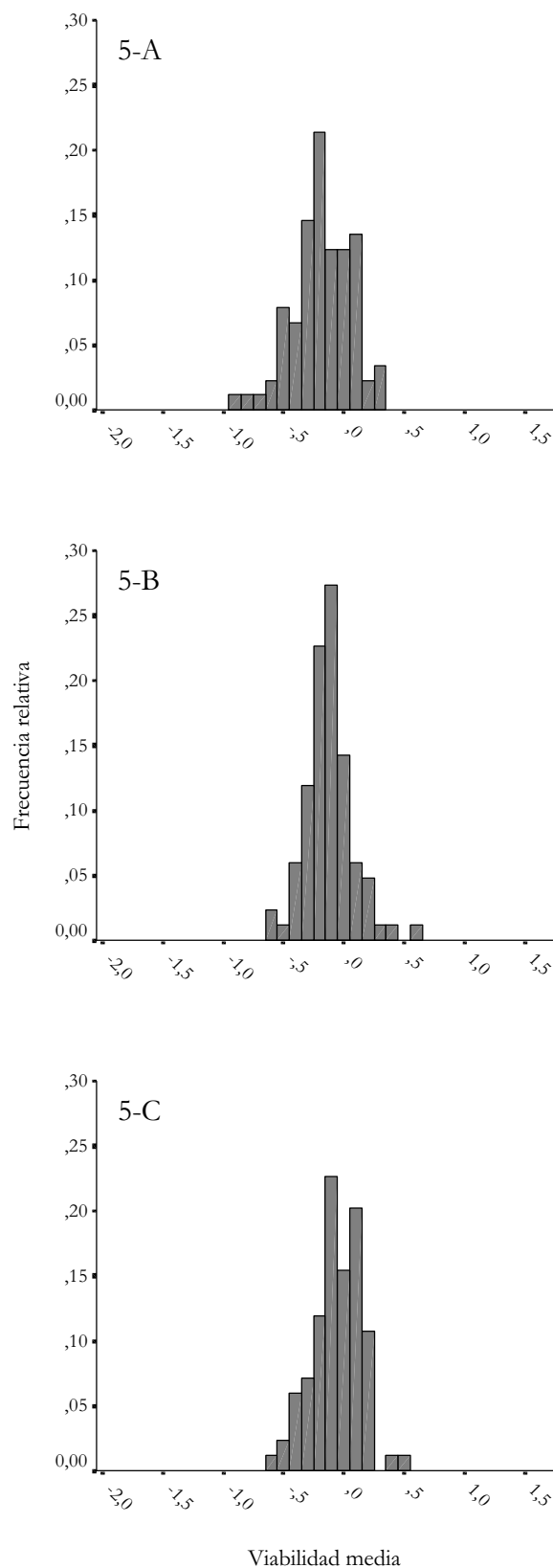
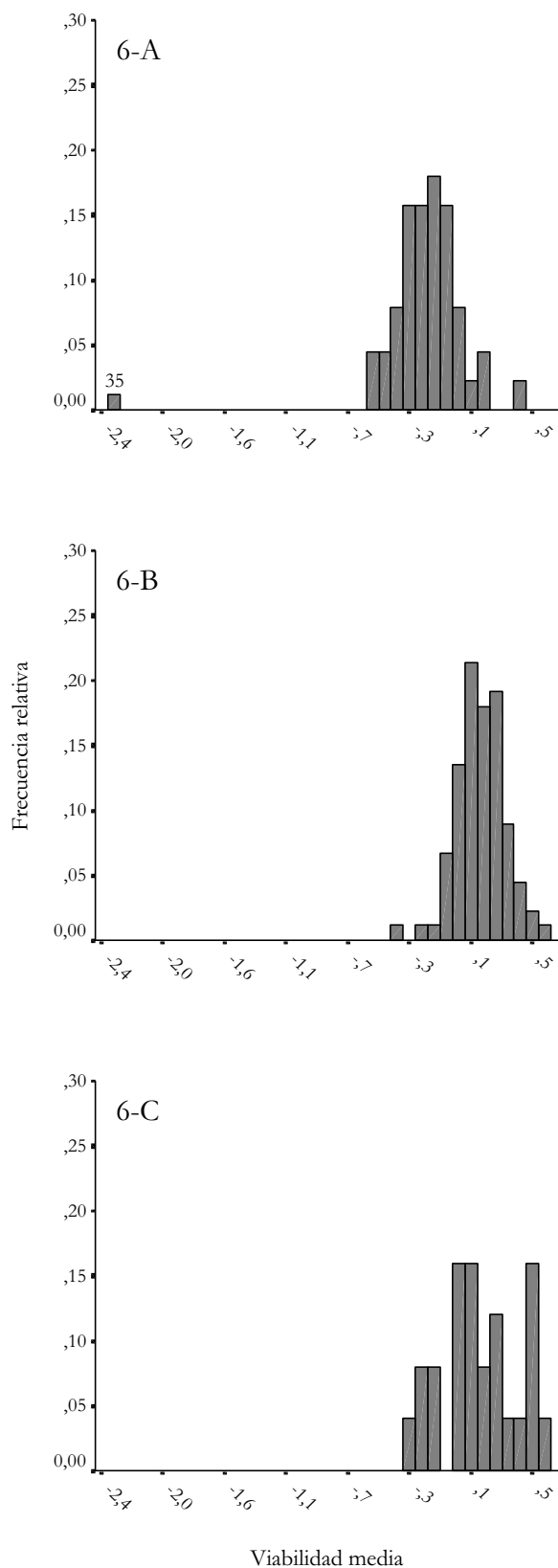


Figura 6. Viabilidad relativa a $Cy/+$ (índice 2): histogramas de frecuencia de la viabilidad media de cromosomas II extraídos de las líneas AM en homocigosis (6-A) y heterocigosis (6-B), y del control en panmixia (6-C) (generación 255).



3.2. PARÁMETROS MUTACIONALES

La tasa de reducción de la viabilidad media por generación $\lambda E(s)$, la de incremento de la variabilidad entre líneas $\lambda E(s^2)$, la tasa mutacional λ , el efecto en homocigosis $E(s)$ y el grado de dominancia medios de las mutaciones implicadas \hat{h} , se muestran en la Tabla 7 para el índice 1 y en la Tabla 8 para el índice 2 en las generaciones referidas.

Tabla 7. Viabilidad relativa a Cy/L (índice 1): estimas de parámetros mutacionales (resultados transformados para todo el genoma multiplicando λ por 2.5).

| | Generación 250 | Generación 255 | Análisis conjunto |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $\lambda E(s)$ | 0.00108 ** ±0.00041 | 0.00379 *** ±0.00075 | 0.00245 *** ±0.00046 |
| $\lambda E(s^2)$ | 0.00028 *** ±0.00013 | 0.00032 *** ±0.00012 | 0.00019 ** ±0.00008 |
| $\lambda \geq$ | 0.00422 ±0.00457 | 0.04431 ±0.02399 | 0.03159 ±0.01907 |
| $E(s) \leq$ | 0.25779 ±0.16253 | 0.08548 ±0.03570 | 0.07760 ±0.03536 |
| \hat{h} | 0.26989 ±0.25182 | 0.32840 * ±0.18690 | 0.32303 ±0.36280 |

* $p < 0.05$

** $p < 0.005$

*** $p < 0.001$

Para ambos índices, la reducción de la viabilidad media $\lambda E(s)$ osciló entre 0.1% y 0.4%. Sin embargo, el incremento de la variabilidad entre líneas $\lambda E(s^2)$ se situó entre 0.2×10^{-3} y 0.3×10^{-3} con el índice 1, obteniéndose valores del orden de la mitad para el índice 2 (entre 0.07×10^{-3} y 0.2×10^{-3}). Esta diferencia llevó consigo que las estimas globales de la tasa de mutación λ obtenidas para el índice 2 (0.07) fueran aproximadamente el doble de las calculadas para el índice 1 (0.03); mientras que las estimas del efecto mutacional $E(s)$ con respecto al índice 2 (0.03) fuera alrededor de la mitad del valor computado para el índice 1 (0.08). En todo caso, las estimas de λ

fueron siempre pequeñas y las de $E(s)$ relativamente bajas. Los resultados confirman, por tanto, la ausencia de mutaciones de efectos deletéreos severos en nuestras líneas AM.

Tabla 8. Viabilidad relativa a $Cy/+$ (índice 2): parámetros mutacionales (datos transformados para todo el genoma).

| | Generación 250 | Generación 255 | Análisis conjunto |
|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| $\lambda E(s)$ | 0.00115 *** ± 0.00033 | 0.00350 *** ± 0.00057 | 0.00233 *** ± 0.00036 |
| $\lambda E(s^2)$ | 0.00013 ± 0.00009 | 0.00022 *** ± 0.00007 | 0.00007 ± 0.00005 |
| $\lambda \geq$ | 0.01030 ± 0.02214 | 0.05641 ± 0.02654 | 0.07494 ± 0.11116 |
| $E(s) \leq$ | 0.11148 ± 0.08890 | 0.06200 ± 0.02348 | 0.03116 ± 0.02238 |
| \hat{h} | 0.11738 ± 0.20500 | 0.35050 * ± 0.16505 | 0.03681 ± 0.57700 |

* $p < 0.05$

** $p < 0.005$

*** $p < 0.001$

Las estimas del grado de dominancia para el índice 1 fueron muy semejantes en distintas generaciones, mientras que las correspondientes al índice 2 presentaban mayores diferencias entre sí y fueron, generalmente, inferiores a las primeras. Sólo las estimas obtenidas en la generación 255 fueron significativamente mayores que cero siendo, además, muy semejantes para los dos índices. Su valor ($E(b) \approx 0.3$) sugiere que la acción génica promedio de las mutaciones es de recesividad parcial, tanto en las líneas AM como en el control. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que las estimas de la generación 255 y la global (generaciones 250-255) no son independientes, puesto que en el cálculo de ambas se han utilizado los mismos datos, en lo que respecta a los heterocigotos. Por otra parte, las estimas de $E(b)$ pertenecientes a las líneas AM están asociadas a estimas bajas de $E(s)$.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha analizado el cambio de viabilidad en un conjunto de líneas consanguíneas en las que se ha permitido la acumulación de mutaciones durante 250 generaciones. Debido a lo prolongado del proceso se espera una gran potencia experimental a la hora de detectar tasas pequeñas de declive en viabilidad que, por tanto, permitirá descubrir el declive de este carácter debido a mutaciones deletéreas poco o muy poco severas.

Atendiendo al cromosoma II, los resultados obtenidos indican que las MNS ocurrieron con baja frecuencia ($\lambda \approx 0.01$), unos efectos en homocigosis $E(s)$ cercanos a 0.1 y un grado de dominancia medio $E(b)$ de aproximadamente 0.3. Estos valores están reñidos con las estimas clásicas aportadas por Mukai y Ohnishi, que implican una tasa de mutación diez veces mayor y un efecto medio de las mutaciones más pequeño, además de una acción génica prácticamente aditiva. La validez de nuestra aproximación experimental es examinada en la primera parte de esta sección, el resto se centra en el análisis de los resultados.

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El número de mutaciones acumuladas en las líneas se incrementará con la duración del periodo considerado y, por consiguiente, la capacidad experimental para detectar la tasa de declive en viabilidad debida a mutaciones deletéreas tenues o muy tenues también aumentará. Por otro lado, la acumulación de un número creciente de mutaciones deletéreas en las líneas implicará una forma de la distribución de sus viabilidades medias próxima a la de una curva normal, lo que impedirá el estudio de las propiedades de mutaciones individuales. En nuestro caso, después de eliminar una sola línea extrema en cada una de las dos generaciones consideradas, ninguna de las distribuciones de la viabilidad media de las líneas AM

se apartó significativamente de la normalidad. Esto excluyó la estimación de parámetros mutacionales por métodos basados en la información contenida en la forma de la distribución, como *mínima distancia* o *máxima verosimilitud* (García-Dorado, 1997; Keightley, 1996). En estas circunstancias elegimos excluir esas líneas extremas de los análisis, restringiendo así nuestro estudio a MNS. Otra dificultad que surge al estudiar líneas AM cuyas medias se ajustan a una distribución normal, es la imposibilidad de cuantificar de manera precisa qué se entiende por mutaciones no severas, es decir, cuál es la magnitud de los efectos deletéreos excluidos, lo que complica en parte esta discusión.

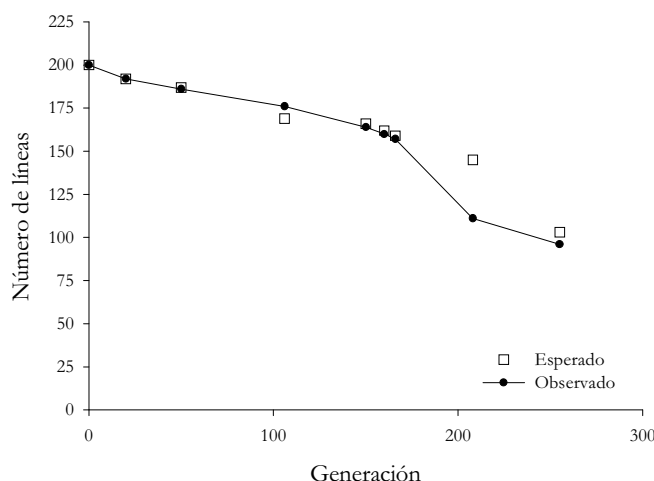
A medida que se alarga el período de acumulación de mutaciones, la acción de la selección natural será cada vez más importante; simplificando la situación, podemos considerar que la selección actúa a dos niveles: 1) reduciendo la tasa de fijación de mutaciones con efecto deletéreo, y 2) llevando a la extinción a aquellas líneas con un lastre excesivo de mutaciones fijadas.

El primer fenómeno tendría lugar desde el comienzo del experimento, y su intensidad se podría considerar constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, como la eficacia total se va deteriorando progresivamente, la aparición de nuevas mutaciones deletéreas severas irá haciendo más probable la utilización de los tubos reservas mantenidos para reemplazar los tubos fallidos. Esto incrementará la eficiencia de la selección natural en contra de las mutaciones severas o moderadas que ocurran en etapas posteriores, estorbando su acumulación en nuestras líneas consanguíneas. Por tanto, el objeto de investigación de este trabajo no es la tasa original y la distribución de efectos de todas las mutaciones deletéreas aparecidas, sino únicamente las de aquellas con efectos deletéreos lo bastante pequeños como para que escapen de la selección natural. Afortunadamente, la obtención de estimas válidas de la tasa y el efecto medio de las mutaciones deletéreas tenues es lo más importante desde el punto de vista evolutivo.

Se espera que la tasa de extinción de líneas se incremente con el tiempo y que el número de mutaciones deletéreas fijadas en las líneas supervivientes no se

distribuya como una Poisson, lo que es un inconveniente incluso a la hora de estimar la tasa y el efecto medio de las mutaciones deletéreas mediante el método de Bateman. En particular, si el número de mutaciones acumuladas por línea se distribuye según una Poisson, y las líneas se pierden cuando la carga mutacional supere un determinado nivel, la estima de $\Delta\mathcal{V}$ se verá reducida por un factor mayor que la de $(\Delta\mathcal{M})^2$. Por tanto, las estimas Bateman de λ y $E(s)$ referentes a MNS estarán respectivamente sesgadas hacia arriba o hacia abajo.

Cuando se fundaron las líneas AM, la pérdida de éstas ocurría a una tasa $r = 1/600$ (aproximadamente se perdía una línea cada 3 generaciones), lo que debería ser atribuido a factores aleatorios. Tomando este valor como tasa constante de pérdida accidental, podemos computar el número esperado de líneas supervivientes en la generación t , en ausencia de selección, como $N_t = N_{i-t} \exp(-rt)$ (siendo N_{i-t} el número de líneas supervivientes en una generación previa en la que se dispone de datos, y t el número de generaciones transcurridas entre los dos momentos considerados). Partiendo de 200 líneas, el número esperado y observado de líneas supervivientes en las generaciones de las que se posee información se muestran en la siguiente figura:



Hasta la generación 161 la extinción de líneas puede ser prácticamente atribuida a accidentes en su totalidad. Parte de la pérdida observada entre las generaciones 161 y 208 se sabe que se debe a infecciones bacterianas ocurridas

aproximadamente en la generación 200 y, por tanto, no es directamente imputable al lastre de fijación (García-Dorado y col., 2000). De la generación 208 a la 255, el número de líneas disminuyó de 111 a 93, en vez de al esperado 103. Sin embargo, no toda la pérdida de líneas debida al lastre de fijación corresponde a una purga de las menos viables. Después de un largo periodo de acumulación de mutaciones, la reducción media de la eficacia también incrementará el riesgo de pérdida, lo que afectará al conjunto de todas las líneas. En la práctica esto equivale a un incremento de r y, por tanto, se espera que menos de 103 líneas sobrevivan en la generación 255 en ausencia de selección purificadora. Esto sugiere que, como mucho, sólo un 9% de las líneas supervivientes en la generación 208 podrían haber sido purgadas en la generación 255. Aunque esto puede tener alguna consecuencia, nuestra estima de λ fue considerablemente baja (alrededor de 0.01 para el cromosoma II), por lo que cualquier sesgo debido a la selección purificadora será despreciable. En consecuencia, hemos computado estimas Bateman para λ y $E(s)$, suponiendo que sus respectivos sesgos, atribuibles a la selección purificadora, no son grandes.

En cualquier caso, la tasa de declive en viabilidad estimada para el segundo cromosoma en las generaciones 250-255, implica que la viabilidad genómica media se ha reducido aproximadamente a la mitad de la del control. Para viabilidad huevo-adulto la media del control alrededor de la generación 100 fue del orden del 60% (Fernández y López-Fanjul, 1996). Esto sugiere que la viabilidad media huevo-adulto de las líneas AM será del orden del 30% y, además, otros componentes de eficacia también se habrán deprimido. Por ello, parece razonable suponer que las líneas portadoras de mutaciones con efectos deletéreos mayores que un 20% raramente sobrevivirán. Es más, la selección actuará eficazmente en contra de mutaciones con $s > 1/2N$ (Kimura, 1962) y, por tanto, en líneas AM con apareamientos hermano por hermana ($N=2.5$), la mayoría de las mutaciones con $s > 0.2$ habrán sido eliminadas por selección. En consecuencia, consideraremos que las mutaciones deletéreas severas no incluidas en nuestro análisis son aquellas con $s > 0.2$.

Nuestra estima de viabilidad (índice 1: \ln (número de descendientes silvestres

/ número de descendientes C_y/L) no está afectada por la expresión de mutaciones deletéreas en heterocigosis con el cromosoma C_y , pero parte de esos efectos pueden estar enmascarados si se utiliza la medida de viabilidad equivalente a la empleada por Mukai (índice 2: \ln (número de descendientes silvestres / número de descendientes C_y)). En nuestro caso, el uso del índice 2 sobreestima λ , infraestima $E(s)$ y oculta parte del incremento de la varianza entre líneas. Sin embargo, no se encontraron diferencias importantes entre las estimas de los parámetros mutacionales correspondientes a ambas medidas de la viabilidad. Así pues, sólo nos referiremos a las estimas obtenidas a partir de la medida de viabilidad menos problemática (índice 1).

4.2. TASA Y EFECTO MEDIO DE LAS MUTACIONES

La tasa de declive en viabilidad en las generaciones 250-255 ($\Delta\mathcal{M} = 0.094\%$) fue muy similar a la calculada en las generaciones 104-106 ($\Delta\mathcal{M} = 0.072\%$ por comparación con la media del control y $\Delta\mathcal{M} = 0.066\%$ utilizando el método de *mínima distancia*, ambas referidas al cromosoma II; García-Dorado y col., 1998). Estas estimas fueron sustancialmente menores que las obtenidas por Mukai (1964) y Mukai y col. (1972), $\Delta\mathcal{M} = 0.4\%$. La tasa de incremento por mutación de la varianza en las generaciones 250-255 ($\Delta\mathcal{V} = 0.076 \times 10^{-3}$) fue también muy similar a las computadas en las generaciones 104-106 ($\Delta\mathcal{V} = 0.092 \times 10^{-3}$, referida al cromosoma II) y en las generaciones 208-209 ($\Delta\mathcal{V} = 0.104 \times 10^{-3}$), lo que también se ajusta a lo obtenido por Mukai para cromosomas cuasinormales ($\Delta\mathcal{V} = 0.094 \times 10^{-3}$).

La principal discrepancia, pues, es el mayor declive en viabilidad computado por Mukai, el cual no fue acompañado por un mayor incremento de la varianza. Esto puede ser debido a diferencias reales entre los experimentos pero, en este caso, el mayor declive en viabilidad obtenido por Mukai debería atribuirse a muchas mutaciones deletéreas de efectos muy pequeños. También pudiera ser que este declive obedeciera a causas no mutacionales, como han sugerido García-Dorado y col. (2000).

Nuestra estima Bateman para la tasa de mutación deletérea en la generaciones 250-255 fue baja ($\lambda \geq 0.01$), aunque algo mayor que la obtenida en las generaciones 104-106 (estima Bateman 0.0056, estima *mínima distancia* 0.0064; ambas referidas al cromosoma II). La estima de $E(s)$ (0.08) fue ligeramente más pequeña que la computada en las generaciones 104-106 (estima Bateman 0.13, estima *mínima distancia* 0.10). Estas diferencias podrían debidas a errores de muestreo, a sesgos provocados por selección purificadora o a que la proporción de mutaciones que se comportan como deletéreas en condiciones más competitivas sea ligeramente mayor. En cualquier caso los resultados indican una tasa pequeña de mutación deletérea tenue. Nuestras estimas sugieren que, en la generación 250, el número esperado de mutaciones deletéreas acumuladas por línea es de 6.5 (2.5 para el cromosoma II), con unos efectos medios de aproximadamente 0.08. Estas estimas se refieren a mutaciones deletéreas no severas ($s < 0.2$), como ya se ha mencionado.

Nuestras estimas dependen de la validez de la población control. Esta fue mantenida con censos efectivos grandes ($N_e > 100$) pero, aún así, algunas mutaciones deletéreas tenues podrían haberse acumulado en él. Es más, mutaciones con efecto muy pequeño (digamos aquellas con $s < 0.05\%$) se habrán acumulado libremente. No disponemos de información acerca del comportamiento de la población control con respecto a la medida de viabilidad competitiva obtenida en este experimento. Sin embargo, sí contamos con datos de viabilidad no competitiva (medida como la proporción de adultos emergidos a partir de la puesta de huevos). Para este carácter, no hay indicios de un descenso temporal de la media del control (0.65 en las generaciones 104-106: García-Dorado y col., 1998; y 0.62 en la 210: Caballero y col., no publicado), lo cual sugiere que las mutaciones de efectos tenues o muy pequeños no causaron un descenso detectable de la viabilidad tras 210 generaciones.

4.3. GRADO DE DOMINANCIA DE LAS MUTACIONES

Nuestras estimas del grado de dominancia obtenidas por regresión dan el valor medio de b ponderado por s^2 . Estas, por tanto, infraestimarán el valor de $E(b)$

si el grado de dominancia está inversamente relacionado con la magnitud del efecto deletéreo. Sin embargo, la exclusión de mutaciones deletéreas severas reducirá el sesgo debido a esa ponderación. En paralelo, la probabilidad de fijación de mutaciones en nuestras líneas AM disminuirá al aumentar el valor de s y, por tanto, el grado medio de dominancia de las nuevas mutaciones estará sobreestimado. Por consiguiente, el sesgo total dependerá de la forma de la distribución de efectos deletéreos y de la relación entre b y s . Suponiendo que el grado de dominancia está uniformemente distribuido entre 0 y $\exp(-ks)$ (Caballero y Keightley, 1994) y usando la distribución obtenida por *mínima distancia* de los valores de s , estimada a partir de nuestras líneas en las generaciones 104-106, hemos obtenido que $k = 4$ da $E(b_{ms^2}) = 0.3$ para mutaciones deletéreas no severas ($s < 0.2$).

También debemos tener en cuenta que una relación dada entre b y s resultará en distintos valores de $E(b)$ para diferentes distribuciones $f(s)$ de efectos mutacionales y, por ello, se espera que las estimas de $E(b)$ procedentes de cualquier experimento dependan de la correspondiente $f(s)$. Así, las estimas de *mínima distancia* obtenidas a partir de los experimentos de Mukai y Ohnishi, en los que la selección casi no actuaba, dan una baja tasa de mutación deletérea tenue pero unos efectos mutacionales relativamente grandes ($E(s) \approx 0.2$; García-Dorado y col., 1998). Usando la correspondiente estima de $f(s)$ y $k = 4$, el grado medio de dominancia toma el valor de $E(b) = 0.25$ y $E(b) = 0.27$ para mutaciones acumuladas en los experimentos de Mukai y Ohnishi, respectivamente. Sin embargo, cuando se consideran las elevadas tasas de declive de la viabilidad encontradas en estos experimentos, las distribuciones de los efectos mutacionales implican una alta probabilidad de mutaciones deletéreas tenues con $E(s) \approx 0.02$ (para las que se espera un mayor b). Por tanto, para $k = 4$, los modelos de tipo Mukai expuestos en la Tabla 9 dan un valor de $E(b) = 0.46$, y un modelo similar basado en los datos de Ohnishi da un valor de $E(b) = 0.43$. Los detalles de este último modelo pueden ser consultados en García-Dorado y Caballero (2000).

Las estimas originales del grado de dominancia publicados por Mukai presentan importantes inconsistencias, obteniéndose resultados opuestos en cruces

en acoplamiento o en repulsión. En los datos de Ohnishi, el cociente entre los declives de la viabilidad en heterocigotos y homocigotos sugiere $E(b) = 0.45$, pero la estima estaría sesgada hacia arriba si parte del declive de la viabilidad no fuera mutacional. Por otra parte, el bajo coeficiente de regresión de la viabilidad de los heterocigotos sobre la de los homocigotos, obtenido a partir de los datos de Ohnishi, sugiere un $E(b) = 0.20$ (García-Dorado y Caballero, 2000), lo que está más próximo al valor de 0.27 obtenido usando el valor de k inferido de nuestros datos y la $f(s)$ estimada por *mínima distancia* a partir de los propios datos de Ohnishi.

Tabla 9. *Parámetros mutacionales de la viabilidad del cromosoma II obtenidos con diferentes modelos de simulación.*

| Fuente | ΔM | λ | α | $E(s)$ | $E(s^2)$ |
|--------------------|------------|-----------|----------|--------|----------|
| MD ^a | 0.000664 | 0.0064 | 3.35 | 0.103 | 0.0137 |
| Mukai ^b | 0.004000 | 0.2000 | 1.00 | 0.020 | 0.0008 |
| Mukai ^b | 0.004000 | 0.2000 | 0.10 | 0.020 | 0.0044 |

^a *Estimas de mínima distancia obtenidas a partir de nuestras líneas AM en las generaciones 104105 (García-Dorado y col., 1998).*

^b *Estimas Bateman aportadas por Mukai y col., (1972) suponiendo diferentes α .*

En resumen, el estudio de nuestras líneas AM no revela un importante declive de la viabilidad competitiva debido a mutaciones deletéreas tenues, y las correspondientes estimas de λ y $E(s)$ concuerdan con aquéllas obtenidas a partir de las mismas líneas tras 105 generaciones de acumulación de mutaciones. Además, nuestros resultados sugieren que el grado medio de dominancia de las mutaciones detectadas en los experimentos de acumulación de mutaciones podría ser menor que el hasta ahora aceptado.

5. RESUMEN

Los resultados de diversos experimentos de acumulación de mutaciones realizados en los años 60-70 parecían indicar que las mutaciones deletéreas de efecto tenue (digamos $s < 0.05$) ocurrían con una tasa inquietantemente alta, cerca de una mutación por cigoto y generación. Sin embargo, nuevos experimentos y el reanálisis de los anteriores sugieren que tales mutaciones son relativamente raras por lo que la magnitud de la tasa de mutación deletérea tenue está, actualmente, en tela de juicio. A favor de tasas bajas está el conjunto de estimas obtenidas en las líneas consanguíneas de acumulación de mutaciones de López-Fanjul (Fernández y López-Fanjul, 1996). Sin embargo, estos valores pueden subestimar la auténtica tasa de mutación tenue, debido a que la viabilidad se midió en condiciones de baja competición y a que la evaluación del control no fue contemporánea a la de las líneas.

En este trabajo hemos presentado resultados experimentales que invalidan las objeciones mencionadas y apoyan la validez de las estimas previamente obtenidas en dicho conjunto de líneas. Es decir, hemos reexaminado las líneas de Fernández y López-Fanjul después de un periodo adicional de acumulación de mutaciones de 144 generaciones (250 en total). En este sentido, se han llevado a cabo evaluaciones simultáneas de viabilidad en las líneas de acumulación de mutaciones (93 líneas hermano x hermana) y en el control (población de censo elevado que, por otro lado, no mostró un deterioro significativo de la viabilidad durante el experimento). Por otra parte la viabilidad se midió en condiciones competitivas, utilizando una cepa portadora de las mutaciones del cromosoma II *Curly* (*Cy*) y *Lobe* (*L*) (en heterocigosis y repulsión). Además, no sólo se obtienen los valores de viabilidad relativos al genotipo *Cy/+* (*a*), como ocurría en los diseños de Mukai, Ohnishi o Fry (Mukai y col., 1972; Ohnishi, 1974; Fry y col., 1999), sino también relativos al genotipo *Cy/L* (*b*) y, por tanto, independientes del grado de expresión de los efectos deletéreos en heterocigosis con *Cy*. Al no encontrar importantes diferencias entre las

estimas de los parámetros mutacionales para ambas medidas de la viabilidad, las estimas mencionadas a continuación se refieren a la viabilidad relativa al genotipo Cy/L (b). En esta situación se han calculado la tasa gamética de mutaciones deletéreas no severas con efecto sobre viabilidad λ , los efectos esperados de éstas en homocigosis $E(s)$ y su grado de dominancia $E(b)$.

En las líneas mencionadas la selección natural debe haber eliminado la mayoría de las mutaciones con efectos severos sobre viabilidad y muchas con efecto moderado, pero habrá sido ineficaz contra las mutaciones de efecto tenue. Aún así, la tasa de declive por generación observada en homocigosis fue muy baja ($\Delta\mathcal{M} \approx 0.1\%$), mientras que la varianza genética aumentó al ritmo habitualmente observado en este tipo de experimentos cuando se excluyen las mutaciones de efectos severos ($\Delta\mathcal{V} \approx 0.8 \times 10^{-5}$). Tanto estos valores como las estimas Bateman-Mukai que se derivan de ellos (tasa de mutación por cromosoma II y generación $\lambda \geq 0.01$, efecto deletéreo medio $E(s) \leq 0.08$) están cualitativamente de acuerdo con las estimas obtenidas para viabilidad no competitiva en estas mismas líneas tras 105 generaciones de acumulación de mutaciones. Los resultados indican que, en nuestras líneas, la mutación deletérea tenue es lo suficientemente rara como para no comprometer la supervivencia de poblaciones pequeñas a medio plazo.

Cuando se midió el efecto en heterocigosis de las mutaciones acumuladas, no se detectó declive de viabilidad ni varianza genética significativa. La estima del grado de dominancia, obtenida de la regresión de la viabilidad de los heterocigotos sobre los homocigotos, fue próxima a 0.3, lo cual sugiere que el grado de dominancia medio de las nuevas mutaciones sería aún menor si la selección natural no hubiera eliminado las mutaciones con efectos deletéreos grandes.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D. I. y D. Hughes. 1996. Muller's ratchet decreases fitness of a DNA-based microbe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 906-907.
- Bateman, A. J. 1959. The viability of near-normal irradiated chromosomes. *Internat. J. Rad. Biol.* 1: 170-180.
- Caballero, A. y P. D. Keightley. 1994. A pleiotropic nonadditive model of variation in quantitative traits. *Genetics* 138: 883-900.
- Caballero, A., M. A. Toro y C. López-Fanjul. 1991. The response to artificial selection from new mutation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 128: 89-102.
- Charlesworth, D., M. T. Morgan y B. Charlesworth. 1992. The effect of linkage and population size on inbreeding depression due to mutational load. *Genet. Res.* 59: 49-61.
- Charlesworth, D., M. T. Morgan y B. Charlesworth. 1993. Mutation accumulation in finite outbreeding and inbreeding populations. *Genet. Res.* 61: 39-56.
- Crow, J. F. 1992. Mutation, mean fitness and genetic load. *Oxford Surv. Evol. Biol.* 9: 3-42.
- Crow, J. F. 1993. How much do we know about spontaneous human mutation rates? *Environ. Mol. Mutagenesis* 21: 122-129.
- Crow, J. F. and M. J. Simmons. 1983. The mutation load in *Drosophila*. M. Ashburner, H. L. Carson y J. N. Thompson, Jr. (eds.), *The genetics and biology of Drosophila*. Volume 3c, pp. 1-35. Academic Press, NY.

- De la Peña, M., S. F. Elena y A. Moya. 2000. Effect of deleterious mutation-accumulation on the fitness of RNA bacteriophage MS2. *Evolution* 54: 686-691.
- Drake, J. W. 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7160-7164.
- Drake, J. W., B. Charlesworth, D. Charlesworth y J. F. Crow. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148: 1667-1686.
- Eyre-Walker, A. y P. D. Keightley. 1999. High genomic deleterious mutation rates in hominids. *Nature* 397: 344-347.
- Fernández, J. y C. López-Fanjul. 1996. Spontaneous mutational variances and covariances for fitness-related traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 143: 829-837.
- Fernández, J. y C. López-Fanjul. 1997. Spontaneous mutational genotype-environment interaction for fitness-related traits in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 51: 856-864.
- Fry, J. D., P. D. Keightley, S. L. Heinsohn y S. V. Nuzhdin. 1999. New estimates of the rates and effects of mildly deleterious mutation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 574-579.
- Gabriel, W., M. Lynch y R. Bürger. 1993. Muller's ratchet and mutational meltdowns. *Evolution* 47: 1744-1757.
- García-Dorado, A. 1997. The rate and effects distribution of viability mutation in *Drosophila*: minimum distance estimation. *Evolution* 51: 1130-1139.
- García-Dorado, A. y A. Caballero. 2000. On the average coefficient of deleterious

- spontaneous mutations. *Genetics* 155: 1991-2001.
- García-Dorado, A., J. L. Monedero y C. López-Fanjul. 1998. The mutation rate and the distribution of mutational effects of viability and fitness in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 102/103:255-265.
- García-Dorado, A., C. López-Fanjul y A. Caballero. 1999. Properties of spontaneous mutations affecting quantitative traits. *Genet. Res.* 74: 341-350.
- García-Dorado, A., J. Fernández y C. López-Fanjul. 2000. Temporal uniformity of the spontaneous mutational variance of quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 75:47-51.
- Gilligan, D. M., L. M. Woodworth, M. E. Montgomery, D. A. Briscoe y R. Frankham. 1997. Is mutation accumulation a threat to the survival of endangered populations?. *Conservation Biology* 11: 1235-1241.
- Haldane, J. B. S. 1935. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J. Genetics* 33: 317-326.
- Haldane, J. B. S. 1947. The rate of mutation of the gene for haemophilia and its segregation ratios in males and females. *Ann. Eugenics* 13: 262-271.
- Harada, K., S. Kusakabe, T. Yamazaki y T. Mukai. 1993. Spontaneous mutation rates in null and band-morph mutations of enzyme loci in *Drosophila melanogaster*. *Jpn. J. Genet.* 68: 605-616.
- Houle, D., D. K. Hoffmaster, S. Assimacopoulos y B. Charlesworth. 1992. The genomic mutation rate for fitness in *Drosophila*. *Nature* 359: 58-60.
- Houle, D., D. K. Hoffmaster, S. Assimacopoulos y B. Charlesworth. 1994a. Correction: the genomic mutation rate for fitness in *Drosophila*. *Nature* 371:

358.

- Houle, D., K. A. Hughes, D. K. Hoffmaster, J. Ihara, S. Assimacopoulos, D. Canada y B. Charlesworth. 1994b. The effects of spontaneous mutation on quantitative traits. I. Variance and covariance of life history traits. *Genetics* 138: 773-785.
- Houle, D., K. A. Hughes, S. Assimacopoulos y B. Charlesworth. 1997. The effects of spontaneous mutation on quantitative traits. II. Dominance of mutations with effects on life-history traits. *Genet. Res.* 70: 27-34.
- Keightley, P. D. 1996. Nature of deleterious mutation load in *Drosophila*. *Genetics* 144: 1993-1999.
- Keightley, P. D. y A. Caballero. 1997. Genomic mutation rate for lifetime reproductive output and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3823-3827.
- Keightley, P. D. y A. Eyre-Walker. 1999. Terumi Mukai and the riddle of deleterious mutation rates. *Genetics* 153: 515-523.
- Keightley, P. D. y T. M. Bataillon. 2000. Multigeneration maximum-likelihood analysis applied to mutation-accumulation experiments in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 154: 1193-1201.
- Kibota, T. T. y M. Lynch. 1996. Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *Escherichia coli*. *Nature* 381: 694-696.
- Kondrashov, A. S. 1988. Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336: 435-440.
- Kondrashov, A. S. 1995. Contamination of the genome by very slight deleterious

- mutation: Why have we not died 100 times over? *Journal of Theoretical Biology* 175: 583-594.
- Kondrashov, A. S. y D. Houle. 1994. Genotype-environment interactions and the estimation of the genomic mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 258: 221-227.
- Lande, R. 1994. Risk of population extinction from new deleterious mutations. *Evolution* 48: 1460-1469.
- Lindsley, D. L. y K. T. Tokuyasu. 1980. Spermatogenesis. M. Ashburner y T. Wright (eds.), *The genetics and biology of Drosophila*, pp. 226-294. Academic Press, NY.
- Lynch, M. y W. Gabriel. 1990. Mutation load and the survival of small populations. *Evolution* 44: 1725-1737.
- Lynch, M., R. Bürger, D. Butcher y W. Gabriel. 1993. The mutational meltdown in asexual populations. *J. Heredity* 84: 339-344.
- Lynch, M., J. Conery y R. Bürger. 1995a. Mutation accumulation and the extinction of small populations. *Am. Nat.* 146: 489-518.
- Lynch, M., J. Conery y R. Bürger. 1995b. Mutational meltdowns in sexual populations. *Evolution* 49: 1067-1088.
- Lynch, M., L. Latta, J. Hicks y M. Giorgianni. 1998. Mutation, selection and the maintenance of life-history variation in a natural population. *Evolution* 52: 727-733.
- Lynch, M., J. Blanchard, D. Houle, T. Kibota, S. Schultz, L. Vassilieva y J. Willis. 1999. Perspective: Spontaneous deleterious mutation. *Evolution* 53: 645-663.
- Mukai, T. 1964. The genetic structure of natural populations of *Drosophila*

-
- melanogaster*. I. Spontaneous mutation rate of polygenes affecting viability. *Genetics* 50: 1-19.
- Mukai, T. 1969a. The genetic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. VII. Synergistic interaction of spontaneous mutant polygenes controlling viability. *Genetics* 61: 749-761.
- Mukai, T. 1969b. The genetic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. VIII. Natural selection on the degree of dominance of viability polygenes. *Genetics* 63: 467-478.
- Mukai, T. 1979. Polygenic mutation. J. N. Thompson, Jr. y J. M. Thoday (eds.), *Quantitative genetic variation*, pp. 177-196. Academic Press, NY.
- Mukai, T. y T. Yamazaki. 1968. The genetic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. V. Coupling-repulsion effect of spontaneous mutant polygenes controlling viability. *Genetics* 59: 513-535.
- Mukai, T. y T. Yamazaki. 1971. The genomic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. X. Developmental time and viability. *Genetics* 69: 385-398.
- Mukai, T. y O. Yamaguchi. 1974. The genetic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. XI. Genetic variability in a large local population. *Genetics* 76: 339-366.
- Mukai, T., S. I. Chigusa y I. Yoshikawa. 1965. The genetic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. III. Dominance effect of spontaneous mutant polygenes controlling viability in heterozygous genetic backgrounds. *Genetics* 52: 493-501.
- Mukai, T., S. I. Chigusa, L. E. Mettler y J. F. Crow. 1972. Mutation rate and

- dominance of genes affecting viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 72: 335-355.
- Ohnishi, O. 1974. Spontaneous and ethyl methane-sulfonate induced polygenic mutations controlling viability in *Drosophila melanogaster*. *Ph. D. Thesis*, University of Wisconsin.
- Ohnishi, O. 1977a. Spontaneous and ethyl methane-sulfonate induced mutations controlling viability in *Drosophila melanogaster*. I. Recessive lethal mutations. *Genetics* 87: 519-527.
- Ohnishi, O. 1977b. Spontaneous and ethyl methane-sulfonate induced mutations controlling viability in *Drosophila melanogaster*. II. Homozygous effect of polygenic mutations. *Genetics* 87: 529-545.
- Ohnishi, O. 1977c. Spontaneous and ethyl methane-sulfonate induced mutations controlling viability in *Drosophila melanogaster*. III. Heterozygous effect of polygenic mutations. *Genetics* 87: 547-556.
- Pamilo, P., M. Nei y W. -H. Li. 1987. Accumulation of mutations in sexual and asexual populations. *Genet. Res.* 49:135-146.
- Santiago, E., J. Albornoz, A. Domínguez, M. A. Toro y C. López-Fanjul. 1992. The distribution of effects of spontaneous mutations on quantitative traits and fitness in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 132: 771-781.
- Shabalina, S. A., L. Y. Yampolsky y S. Kondrashov. 1997. Rapid decline of fitness in panmictic populations of *Drosophila melanogaster* maintained under relaxed natural selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13034-13039.
- Sharp, P. M. y W. -H. Li. 1989. On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 28: 398-402.

-
- Shaw, R. G., D. L. Byers y E. Darmo. 2000. Spontaneous mutational effects on reproductive traits of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 155: 369-378.
- Shultz, S. T., M. Lynch y J. H. Willis. 1999. Spontaneous deleterious mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11393-11398.
- Simmons, M. J. y J. F. Crow. 1977. Mutations affecting fitness in *Drosophila* populations. *Ann. Rev. Genet.* 11: 49-78.
- Vassilieva, L. L. y M. Lynch. 1999. The rate of spontaneous mutation for life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 151: 119-129.
- Vassilieva, L. L., A. M. Hook y M. Lynch. 2000. The fitness effects of spontaneous mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Evolution* 54: 1234-1246.
- Wolfe, K. H., W. -H. Li y P. M. Sharp. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9054-9058.
- Wray, N. R. 1990. Accounting for mutation effects in the additive genetic variance-covariance matrix and its inverse. *Biometrics* 46: 177-186.
- Yoshimaru, H. y T. Mukai. 1985. Relationships between the polygenes affecting the rate of development and viability in *Drosophila melanogaster*. *Jap. J. Genetics* 60: 307-334.