

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Genética**



**AUMENTO DE LA TASA DE MUTACIÓN ESPONTÁNEA  
EN UN EXPERIMENTO A LARGO PLAZO CON  
“DROSOPHILA MELANOGASTER”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Victoria Ávila Regidor**

Bajo la dirección de los doctores:  
Aurora García-Dorado García y Carlos López-Fanjul de Argüelles

**Madrid, 2007**

**ISBN: 978-84-669-3091-8**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



AUMENTO DE LA TASA DE MUTACIÓN  
ESPONTÁNEA EN UN EXPERIMENTO A LARGO  
PLAZO CON *Drosophila melanogaster*

TESIS DOCTORAL

Victoria Ávila Regidor

MADRID 2007

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**AUMENTO DE LA TASA DE MUTACIÓN  
ESPONTÁNEA EN UN EXPERIMENTO A LARGO  
PLAZO CON *Drosophila melanogaster***

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la  
Universidad Complutense de Madrid presenta

Victoria Ávila Regidor

DIRECTORA:

Dra. Aurora García-Dorado García

DIRECTOR:

Dr. Carlos López-Fanjul de Argüelles

MADRID 2007

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES	1
1.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES	7
1.2.1. ESTIMAS DE LA TASA Y EL EFECTO MEDIO DE LAS MUTACIONES	7
<i>Drosophila melanogaster</i>	7
<i>Escherichia coli</i>	13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
<i>Caenorhabditis elegans</i>	15
<i>Arabidopsis thaliana</i>	16
<i>Daktuslophaira vitifoliae</i>	17
1.2.2. ESTIMA DEL GRADO DE DOMINANCIA DE LAS MUTACIONES DELETÉREAS	22
<i>Drosophila melanogaster</i>	23
<i>Caenorhabditis elegans</i>	26
OBJETIVO	27
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	28
2.1.1. CONTROL C1	28
2.1.2. LÍNEAS AM2	28
2.1.3. CONTROL C2	29
2.1.4. CONTROL C2F	29
2.2. CONDICIONES DE CULTIVO	31
2.3. EVALUACIÓN DE VIABILIDADES	32
2.3.1. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS II DE LAS LÍNEAS AM2 EN HOMOCIGOSIS Y EN HETEROCIGOSIS CON CROMOSOMAS II DEL CONTROL C2F	33
2.3.2. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS II DE LAS LÍNEAS AM2 EN HOMOCIGOSIS Y DE LOS CROMOSOMAS II DE LOS CONTROLES C2 Y C2F EN PANMIXIA	33

2.3.3. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS II DE LAS LÍNEAS AM2 Y DE LOS CROMOSOMAS II DE LOS CONTROLES C2 Y C2F EN HOMOCIGOSIS	34
2.3.4. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS II DE LOS CONTROLES C1, C2 Y C2F EN HOMOCIGOSIS Y EN PANMIXIA	34
2.3.5. CÁLCULO DE LA VIABILIDAD	37
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
2.4.1. MODELO GENERAL	39
2.4.2. ESTIMAS DE $\lambda_{II}\mathbf{E}(s^2)$ Y $\lambda_{II}\mathbf{E}(s)$	40
2.4.3. ESTIMAS DE $\lambda_{II}$ Y $\mathbf{E}(s)$	42
2.4.4. ESTIMAS DEL GRADO DE DOMINANCIA	44
2.4.5. ESTIMAS DE LA TASA DE DEPRESIÓN CONSANGUÍNEA	47
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>48</b>
3.1. DESCRIPTIVOS PARA LA VIABILIDAD DEL CROMOSOMA II	48
3.2. ESTIMAS DE LOS PARÁMETROS MUTACIONALES PARA LA VIABILIDAD DEL CROMOSOMA II	56
3.3. TASA DE DEPRESIÓN CONSANGUÍNEA PARA VIABILIDAD EN LAS POBLACIONES CONTROL	59
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
4.1. AUMENTO DE LA TASA DE MUTACIÓN EN LAS LÍNEAS AM2	61
4.2. POBLACIONES CONTROL	64
4.3. GRADO DE DOMINANCIA DE LAS MUTACIONES	68
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>71</b>

## **INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Las mutaciones espontáneas son la fuente primaria de variación genética pero, como errores aleatorios que son, aquéllas que afecten a la eficacia biológica serán mayoritariamente deletéreas. Así, pues, a pesar de que las mutaciones beneficiosas proporcionan la materia prima para que ocurra la evolución adaptativa, la acumulación de las deletéreas en el genoma puede poner en peligro el éxito evolutivo de las especies.

La selección tiende a eliminar las mutaciones deletéreas de la población con una intensidad proporcional a la magnitud de su efecto en homocigosis  $s$ . Sin embargo, estas mismas mutaciones pueden acabar fijándose en la población como consecuencia de la acción de la deriva genética. Ésta se define como el cambio aleatorio de las frecuencias génicas que se produce al muestrearse los reproductores y los genes que éstos transmiten a su descendencia, cambio que será más intenso cuanto menor sea el censo efectivo ( $N_e$ ) de la población. Por tanto, el destino de una mutación deletérea en una población dependerá de la importancia relativa de cada una de estas dos fuerzas antagónicas, deriva genética y selección.

A partir de la ecuación de difusión de KIMURA (1962) se puede deducir que cuando  $s < 1/2N_e$  la frecuencia génica de una mutación deletérea oscilará fundamentalmente por deriva, casi como si no hubiera selección (como si se tratase de un gen neutro), y dicha mutación podrá fijarse o perderse por azar. Para  $1/2N_e < s < 10/N_e$ , el cambio en frecuencia de la mutación tendrá aún un componente aleatorio, aunque la fijación ocurrirá con una probabilidad considerablemente inferior a la correspondiente a una mutación neutra. Finalmente, si  $s > 10/N_e$  la mutación terminará, casi seguro, por perderse

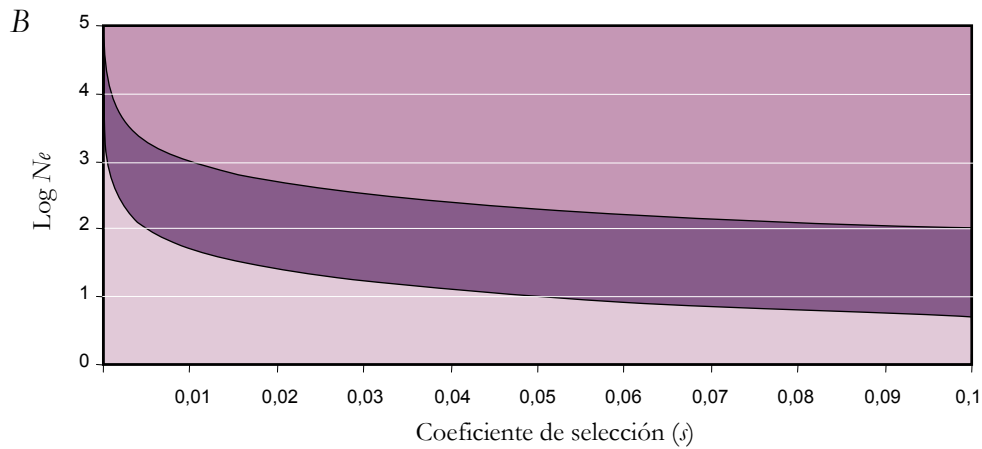
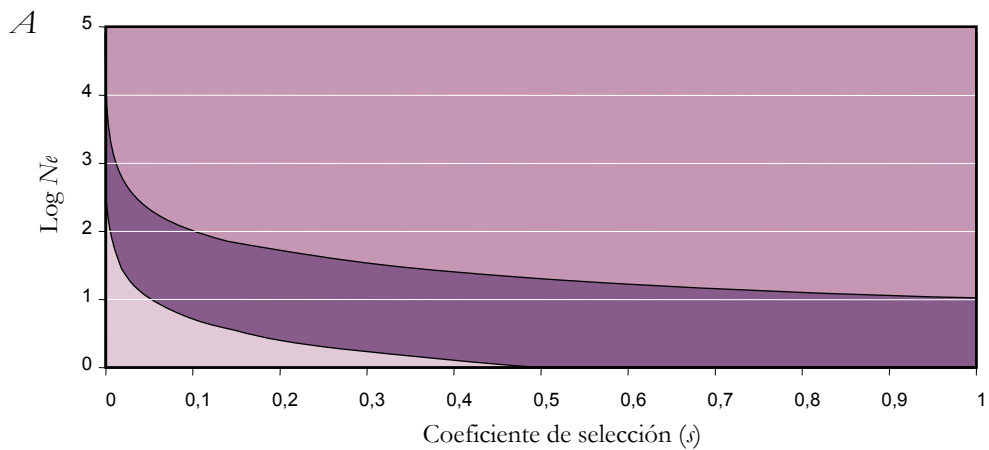
debido a la acción selectiva en su contra. Por tanto, las mutaciones deletéreas con efecto lo bastante pequeño como para escapar del control de la selección natural ( $s < 10/Ne$ ) podrían, en principio, acumularse en la población hasta amenazar su supervivencia.

Como se ilustra en la *Figura 1*, para especies con censo efectivo del orden de  $10^4$ , cuya supervivencia no plantea problemas, las mutaciones potencialmente acumulables por fijación serían aquellas con  $s < 10^{-3}$ . En poblaciones en peligro de extinción, con un censo efectivo del orden de unas decenas o centenas, las mutaciones comprendidas en esta ‘clase de riesgo’ serán aquellas con  $s < 0,05$ . De éstas, las que tienen efectos mayores serán las que más fácilmente podrían comprometer la supervivencia de la población a medio plazo. Por este motivo, desde el punto de vista de la conservación es de gran interés el estudio de la tasa a la que se producen mutaciones con efectos en torno a unos pocos puntos porcentuales (digamos  $0,005 < s < 0,05$ ), que llamaremos ‘tenues’.

Se han desarrollado modelos que predicen la magnitud del riesgo procedente de la mutación deletérea, y se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo las poblaciones naturales hacen frente a esta amenaza. Entre ellos, el sexo y la recombinación genética podrían haber evolucionado inicialmente como sistemas auxiliares para depurar el genoma de mutaciones perjudiciales (MULLER 1964; FELSENSTEIN 1974). Además, la mutación deletérea y sus consecuencias ocupan un lugar destacado en las teorías que intentan explicar la evolución de ciertos caracteres, como la senescencia, la tendencia a la exogamia o los sistemas de apareamiento (PAMILO *et al.* 1987; CHARLESWORTH 1993). Sin embargo, para valorar el papel real de la mutación deletérea en estos procesos es preciso disponer de determinaciones fiables de los parámetros mutacionales.



**Figura 1.** Destino de las mutaciones surgidas en una población en función del censo efectivo de la misma ( $N_e$ ) y del efecto deletéreo de la mutación en homocigosis ( $s$ ). Para cualquier valor del efecto deletéreo en la Gráfica A y, con mayor detalle, para efectos deletéreos de hasta un 10% en la Gráfica B.



- Mutaciones con  $s > 10/N_e$  que la selección eliminará casi con seguridad.
- Mutaciones con  $1/2N_e < s < 10/N_e$  cuya probabilidad de fijación final es sensiblemente menor que la de una mutación neutra.
- Mutaciones con  $s < 1/2N_e$  que se fijarán casi con la misma probabilidad que si fueran neutras.

Excepto para las mutaciones letales y las de efecto muy grande, el efecto de una sola mutación sobre eficacia es normalmente demasiado pequeño como para poder distinguirlo de la variación ambiental. Puesto que un análisis directo es impracticable, para el estudio de las mutaciones con un efecto deletéreo tenue es necesario recurrir a procedimientos indirectos. Aunque se ha propuesto que las propiedades de la mutación deletérea pueden inferirse a partir de las propiedades de la variación genética para eficacia biológica que muestran las poblaciones naturales (DENG y LYNCH 1996; DENG 1998; DENG *et al.* 2006), este método asume equilibrio mutación-selección para la población analizada, algo imposible de verificar.

La aproximación más usual consiste en realizar experimentos de acumulación de mutaciones (AM), en los que se permite la acumulación de mutaciones espontáneas durante varias generaciones en líneas de censo reducido derivadas de una población inicialmente carente de variabilidad genética. Mediante la reducción del censo se minimiza la acción de la selección natural, de manera que buena parte de las mutaciones deletéreas se fijan como si fueran neutras, mientras que la utilización de una población base homocigota permite atribuir únicamente a la mutación los cambios genéticos observados. Este procedimiento proporciona información tanto sobre la tasa de mutación como sobre los efectos mutacionales, que no depende de la suposición de un equilibrio mutación-selección. Sin embargo, dichas inferencias son indirectas y requieren el uso de técnicas estadísticas cuyas propiedades dependen de muchos factores, como la forma de la distribución de los efectos mutacionales y la magnitud de los errores residuales.

Para el análisis de los datos AM se han usado fundamentalmente los siguientes tres métodos:

BATEMAN-MUKAI (BM): Este método es el más común y sencillo (BATEMAN 1959; MUKAI 1964). Como consecuencia del proceso de acumulación independiente de mutaciones en cada una de las líneas esperamos que, a medida que las generaciones pasan, el valor medio de la eficacia (o de uno de sus componentes) de estas líneas disminuya y que el componente genético de la correspondiente varianza interlíneas aumente. A partir de las tasas de incremento en varianza genética entre las líneas AM ( $\Delta V$ ) y de declive en media del carácter de dichas líneas con respecto a un control ( $\Delta M$ ), se estima una cota inferior para la tasa de mutación con efecto sobre eficacia por gameto y generación ( $\lambda$ ) y una cota superior para el correspondiente valor esperado del efecto deletéreo ( $E(s)$ ) de las mutaciones implicadas (para una explicación más detallada ver *Material y métodos* página 35):

$$\frac{\Delta M^2}{\Delta V} = \lambda \left[ 1 - \frac{\sigma_s^2}{E(s^2)} \right], \quad \frac{\Delta V}{\Delta M} = E(s) \left[ 1 + \frac{\sigma_s^2}{E^2(s)} \right].$$

De modo que,

$$\lambda \geq \frac{\Delta M^2}{\Delta V}, \quad E(s) \leq \frac{\Delta V}{\Delta M}.$$

La validez de estas cotas es bastante general, aunque su aproximación a los verdaderos valores de la tasa de mutación y de su efecto promedio (y, por tanto, su utilidad) disminuye a medida que aumenta la varianza de los efectos mutacionales ( $\sigma_s^2$ ), como ponen de manifiesto las expresiones anteriores.

El principal inconveniente de este método surge a la hora de calcular el declive en eficacia media causado por la acumulación de mutaciones. Como es imposible evaluar simultáneamente la eficacia biológica de las líneas AM al principio y al final del proceso se hace necesario recurrir a algún tipo de

control. En especies vegetales, como *Arabidopsis thaliana*, se suelen guardar semillas producidas por los individuos de la generación previa al inicio del proceso de acumulación de mutaciones que, una vez finalizado éste, se hacen germinar y las plantas resultantes se evalúan de forma simultánea a las de las líneas AM. Algunas especies siguen siendo viables tras un periodo de congelación y es posible mantener parte de la población inicial congelada para luego evaluarla al mismo tiempo que las líneas AM, como ocurre, por ejemplo, con *Caenorhabditis elegans*. Otra posibilidad es mantener, en paralelo a las líneas AM, la población base inicial con un censo lo suficientemente elevado como para que la selección natural impida que la mayor parte de las mutaciones deletéreas que surjan se acumulen. En otros experimentos, se eligieron como controles en una generación determinada las líneas AM que mostraban una mayor eficacia en una evaluación posterior suponiendo que éstas no habían acumulado mutaciones. Se trata del ‘Rank Order Method’ que aquí denominaremos ‘método de clasificación’. Por último, también se ha calculado la tasa de declive en eficacia de las líneas AM (y de incremento en varianza entre-líneas) como la pendiente de la recta de regresión sobre el número de generación de los valores medios de eficacia de dichas líneas (y de los valores de varianza entre-líneas).

MÁXIMA VEROSIMILITUD (ML): La aplicación de este método requiere algunas suposiciones adicionales acerca de la distribución de los efectos deletéreos que hacen posible relajar la suposición de igualdad de efectos mutacionales. Ha sido desarrollado por KEIGHTLEY (1994) asumiendo una distribución gamma de dichos efectos en homocigosis ( $j$ ) o bien un efecto deletéreo constante ( $S$ ). El procedimiento determina la tasa de mutación y los parámetros de la función gamma (o el valor de  $S$ ) que maximizan la verosimilitud de la distribución observada de las medias de las líneas AM y del control. El método se ha ampliado a una distribución gamma reflejada, donde

$|s|$  se distribuye según una gamma pero el valor de  $s$  puede ser negativo con cierta probabilidad.

MÍNIMA DISTANCIA (MD): Ha sido desarrollado por GARCÍA-DORADO (1997) asumiendo para  $s$  una distribución gamma reflejada o una normal-gamma mixta que permiten relajar las suposiciones de igualdad de efectos mutacionales y de unidireccionalidad de dichos efectos. Este método establece los parámetros mutacionales que minimizan la distancia de Cramer-von Mises entre las distribuciones observadas de las medias de las líneas y las predichas teóricamente. Generalmente, los resultados MD están condicionados a la estima del incremento en varianza, pero no necesariamente a la del declive en media. Esta propiedad es particularmente interesante, porque  $\Delta V$  se estima con relativa facilidad pero  $\Delta M$  se obtiene por comparación con una población control, y el mantenimiento de un control fiable es muy problemático.

## 1.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES

### 1.2.1. ESTIMAS DE LA TASA Y EL EFECTO MEDIO DE LAS MUTACIONES

#### *Drosophila melanogaster*

Los primeros experimentos sobre el tema, hoy denominados clásicos, fueron realizados con *Drosophila melanogaster* por MUKAI (1964) y consistieron en permitir la acumulación de mutaciones durante varias generaciones en líneas en las que los correspondientes cromosomas II eran originalmente copias de un único cromosoma II libre de letales extraído de una población natural. Las réplicas del cromosoma II se mantenían en heterocigosis con un cromosoma marcador y se transmitían a la siguiente generación a través de un único

macho. De este modo, se impedía tanto la recombinación como, en gran medida, la acción de la selección natural. Este y otros trabajos desarrollados posteriormente por diversos autores (MUKAI *et al.* 1972; OHNISHI 1977a) siguiendo un diseño parecido, indicaban que el valor de la tasa de mutación deletérea ( $\lambda$ ) para viabilidad era de, al menos, 0,35 por genoma haploide y generación y que el efecto promedio en homocigosis ( $E(s)$ ) de las mutaciones era 0,03 o inferior. Estos resultados implican que la mayoría de los individuos serán portadores de nueva mutación con un efecto deletéreo sobre viabilidad de un 3%. Durante muchos años éstos fueron los únicos valores de  $\lambda$  y de  $E(s)$  y se convirtieron en unos parámetros típicos usados ampliamente en modelos genéticos evolutivos, que aparentemente apoyaban la visión pesimista de MULLER (1950) sobre el papel del lastre mutacional. Sin embargo, varios estudios posteriores (KEIGHTLEY 1996; GARCÍA-DORADO 1997) han cuestionado la validez de estos resultados.

En 1996, FERNÁNDEZ y LÓPEZ-FANJUL evaluaron un conjunto de líneas consanguíneas derivadas independientemente de la misma cepa isogénica y mantenidas mediante un apareamiento hermana por hermano por línea y generación. Tras 104 generaciones de acumulación de mutaciones obtuvieron, para viabilidad, una cota inferior para la tasa de mutación deletérea de 0,02 por genoma haploide y generación y una cota superior para el efecto medio en homocigosis de alrededor de 0,10 (GARCÍA-DORADO *et al.* 1998). En una evaluación posterior de estas mismas líneas realizada en la generación 210 volvieron a obtenerse una estima baja para  $\lambda$  y otra moderadamente alta para el efecto deletéreo, 0,003 y 0,246, respectivamente (CABALLERO *et al.* 2002).

Las discrepancias entre estas estimas y las obtenidas previamente por el grupo de MUKAI han sido atribuidas a varios factores. Para empezar, los distintos tipos de diseño experimental hacen que puedan existir diferencias entre los

tipos de mutaciones acumuladas en cada caso. Las mutaciones que surgen en cromosomas II mantenidos en heterocigosis con un cromosoma marcador eluden de forma eficiente la acción de la selección contra los homocigotos y, por tanto, las mutaciones de efecto deletéreo grande se acumularán con la misma probabilidad que las de efecto tenue, siempre que muestren cierta recesividad. En el caso de las líneas consanguíneas, la probabilidad de fijación de las mutaciones disminuye a medida que aumenta la magnitud de su efecto deletéreo en homocigosis, independientemente de su grado de recesividad, por lo que aquéllas de efecto muy grande tenderán a ser eliminadas por selección. Sin embargo, la descripción obtenida a partir de las líneas consanguíneas es fiable respecto de las mutaciones de efecto tenue, de modo que esta diferencia en el diseño no explica la mayor tasa de mutaciones de efecto tenue estimada por el grupo de MUKAI. Nótese que este tipo de mutaciones es más relevante con respecto a la variación genética de poblaciones naturales una vez que la selección natural ha actuado (LÓPEZ y LÓPEZ-FANJUL 1993). Una diferencia añadida consiste en que, en el primer tipo de experimentos, las mutaciones sólo se acumulan en el cromosoma II, mientras que empleando líneas consanguíneas las mutaciones se acumulan en todo el genoma.

Además, en los experimentos de MUKAI y OHNISHI, la viabilidad fue evaluada en condiciones competitivas (en cada tubo emergía la descendencia de cinco parejas), mientras que en los de FERNÁNDEZ y LÓPEZ-FANJUL la valoración se hizo en circunstancias más favorables (en cada tubo emergía la descendencia de una pareja). En ocasiones se ha argumentado que la expresión de las mutaciones deletéreas puede depender de la adversidad del ambiente (KONDRASHOV y HOULE 1994), de modo que su efecto podría no manifestarse en ambientes más propicios. En este caso, la presencia de algunas mutaciones no sería detectada y, por lo tanto, la tasa de mutación se subestimaría. Sin embargo, cuando, las líneas del experimento de FERNÁNDEZ

y LÓPEZ-FANJUL fueron evaluadas para viabilidad competitiva después de 255 generaciones de acumulación de mutaciones por CHAVARRÍAS *et al.* (2001), la estima obtenida para la tasa de mutación fue de 0,044 por genoma haploide y generación y la del efecto promedio de las mutaciones implicadas de 0,085, valores muy semejantes a los obtenidos en las condiciones presumiblemente más favorables de la evaluación previa.

Recientemente, MARTIN y LENORMAND (2006) han estudiado el efecto de las condiciones ambientales adversas sobre el valor de las estimas de los parámetros mutacionales de eficacia biológica (o sus componentes). Utilizando información procedente de experimentos AM realizados con varias especies se llegó a la conclusión de que el coeficiente de variación de los efectos mutacionales aumenta con la adversidad del medio de cultivo, manteniéndose aproximadamente constantes tanto el número de mutaciones que se expresan en distintos medios como su efecto promedio en cada uno de ellos.

El tipo de control empleado en cada caso para cuantificar el declive en media experimentado por las líneas AM también fue diferente. MUKAI (1964) empleó el ‘método de clasificación’ al que se ha aludido anteriormente. MUKAI *et al.* (1972) y OHNISHI (1977a) también estimaron las tasas de declive en media y de incremento en varianza genética por regresión de la viabilidad del cromosoma II relativa a la del cromosoma marcador *Cy* de una cepa de laboratorio sobre el número de generación. Se ha sugerido que parte del declive en media observado por MUKAI y OHNISHI podría tener un origen no mutacional como resultado de un aumento de la viabilidad de este cromosoma *Cy* durante el desarrollo del experimento (KEIGHTLEY 1996; GARCÍA-DORADO 1997), puesto que un análisis posterior de estos mismos datos usando la técnica de mínima distancia proporcionó estimas mucho menores de dicho declive. Por su parte, FERNÁNDEZ y LÓPEZ-FANJUL recurrieron a la



cepa isogénica precursora de las líneas AM mantenida de forma sincrónica y con un censo elevado. Es de destacar que en las generaciones 104-106 las estimas basadas en el uso de este control fueron similares a las obtenidas mediante MD sin usar control alguno, lo que avala la validez tanto del control como de las suposiciones implicadas en el análisis MD.

Más tarde, FRY *et al.* (1999) mejoraron el diseño experimental de MUKAI manteniendo simultáneamente a las líneas AM una población control de censo elevado, cuya viabilidad permaneció aproximadamente constante. En este caso, aunque el declive de la viabilidad fue mayor, el valor obtenido para la tasa de mutación deletérea fue de 0,05 por genoma haploide y generación y de 0,11 para su efecto promedio. Estas estimas, a pesar de la disparidad de diseños, son cualitativamente semejantes a las de FERNÁNDEZ y LÓPEZ-FANJUL (1996), que, además, realizaron evaluaciones en distintas condiciones ambientales, entre ellas viabilidad competitiva y no competitiva. Las estimas de los parámetros mutacionales que obtuvieron no se vieron afectadas en ningún caso por el tipo de medio considerado, aun cuando algunas de ellos fueran lo bastante adversos como para causar una reducción significativa de la viabilidad.

Siguiendo un diseño similar al de MUKAI, pero permitiendo la acumulación de mutaciones en el cromosoma III de *Drosophila melanogaster*, CHARLESWORTH *et al.* (2004) realizaron un nuevo experimento en el que evaluaron la viabilidad competitiva de 3 grupos, de 75 líneas AM cada uno, a lo largo de 31-41 generaciones. Para el cálculo de la tasa de declive en viabilidad los autores intentaron congelar embriones para utilizarlos más tarde como control (previa descongelación). Lamentablemente, no fue posible recuperar larvas viables de modo que, al igual que MUKAI, se vieron obligados a recurrir al ‘método de clasificación’ o de regresión de la viabilidad sobre el número de generación.

Las estimas correspondientes al método de regresión en cada uno de los grupos fueron muy dispares y, promediándolas, se obtiene una tasa de mutación de 0,20 y un efecto promedio de -0,39. Sin embargo, empleando el método de clasificación y promediando los resultados de los tres grupos, se obtiene una estima de la tasa de mutación haploide de 0,02 y un efecto promedio en homocigosis de 0,2.

GONG *et al.* (2005) estudiaron el proceso de acumulación de mutaciones a lo largo de 25 generaciones en el cromosoma X de *Drosophila melanogaster*, partiendo de tres grupos compuestos por 108, 225 y 225 líneas en cada uno de los grupos, de las que 80, 141 y 71, respectivamente, llegaron a la evaluación final. Los valores obtenidos para las estimas de BM fueron 0,15 para la tasa de mutación haploide y 0,14 para el efecto promedio en hemicigosis. El diseño experimental fue diferente a los anteriores pues las mutaciones no se acumulaban en un cromosoma extraído de una población segregante sino sobre un cromosoma X *Binscy* estabilizador portador de mutaciones e inversiones. Esto podría explicar por qué se pierden líneas tan rápidamente. A pesar de que la tasa de declive en viabilidad es de las más altas de todas las referenciadas y la tasa de mutación es también muy alta, la estima del efecto mutacional es consistente con las obtenidas en otros experimentos caracterizados por una baja tasa de mutación. La naturaleza del cromosoma X *Binscy* podría ser la explicación de esta tasa de mutación incrementada.

Los trabajos realizados con *Drosophila melanogaster* en los que el carácter estudiado fue la propia eficacia son escasos. En 1992, HOULE *et al.* (1992) realizaron un estudio de este tipo, pero más tarde se detectó que el control había sufrido una contaminación externa (HOULE *et al.* 1994), por lo que tanto la estima del declive en eficacia de las líneas AM como las de  $\lambda$  y  $E(x)$  no son fiables. No obstante, usando el método de mínima distancia sin condicionar por el declive en eficacia observado, se obtuvo una tasa de declive en media de

0,008, una tasa de mutación de 0,03 y un efecto deletéreo promedio de 0,26 para eficacia relativa (GARCÍA-DORADO *et al.* 1998). Estos valores de la tasa de mutación y el efecto promedio en homocigosis son similares a los obtenidos para viabilidad en experimentos recientes y en el reanálisis de los más antiguos, mostrando un pequeño incremento en las estimas de las tasas y efectos mutacionales, como cabría esperar si se tiene en cuenta que algunas mutaciones pueden menguar la eficacia sin reducir la viabilidad y que las mutaciones que disminuyen la viabilidad pueden tener también efectos deletéreos sobre otros componentes de eficacia.

Posteriormente, ÁVILA y GARCÍA-DORADO (2002) estimaron de nuevo los parámetros que caracterizan las propiedades de las mutaciones deletéreas con efecto sobre eficacia competitiva en las líneas AM estudiadas por FERNÁNDEZ y LÓPEZ-FANJUL, obteniendo unas estimas de 0,034 para la tasa de mutación y de 0,11 para el efecto deletéreo promedio en homocigosis. Éstas concuerdan con las obtenidas previamente, tanto en condiciones benignas como competitivas (CHAVARRÍAS *et al.* 2001), y también se ajustan a otras estimas MD obtenidas para viabilidad y eficacia (GARCÍA-DORADO *et al.* 1999).

### ***Escherichia coli***

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, observando 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 la viabilidad de *Drosophila* en los experimentos de MUKAI. La tasa genómica de mutación deletérea obtenida, 0,0002, es aproximadamente un 10% de otras estimas de la tasa de mutación

genómica total en ésta y otras especies relacionadas (DRAKE 1991; ANDERSSON 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 dicha línea (DRAKE *et al.* 1998), la tasa de mutación estimada es compatible con la 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*. En otras palabras, las dificultades de extrapolación desde el genoma bacteriano a genomas eucariotas no permiten la discriminación entre los dos grupos de resultados.

### ***Saccharomyces cerevisiae***

ZEYL y DEVISSER (2001) estudiaron la acumulación de mutaciones nucleares con efecto sobre eficacia competitiva en *Saccharomyces cerevisiae*. A partir de una cepa silvestre, fundaron 50 líneas AM que mantuvieron mediante la transferencia de colonias originadas a partir de una única célula. En varias líneas se detectó la presencia de la mutación mitocondrial *petite* que reduce considerablemente la eficacia, de modo que esas líneas se eliminaron del análisis. Las estimas ML obtenidas fueron de 0,000055 para la tasa haploide de mutación y de 0,22 para el efecto promedio (en heterocigosis). Sin embargo, el diseño empleado permite la selección en contra de las mutaciones deletéreas que surjan durante el crecimiento de la colonia, lo cual condiciona la validez de los resultados.

WLOCH *et al.* (2001) iniciaron un conjunto de líneas AM a partir de una única célula de una cepa diploide de *Saccharomyces cerevisiae*. Tras la inducción de la

meiosis evaluaron la tasa de crecimiento de las colonias haploides generadas por las tétradas. La tasa de mutación por genoma haploide fue de 0,00057 y el efecto promedio de las mutaciones de 0,086 (haploide).

### ***Caenorhabditis elegans***

KEIGHTLEY y CABALLERO (1997) llevaron a cabo el primer experimento de acumulación de mutaciones realizado con *Caenorhabditis elegans*. En este caso, las líneas AM se mantuvieron con un progenitor por generación, que se reproduce por autofecundación, durante 60 generaciones. VASSILIEVA y LYNCH (1999) también realizaron un experimento de este tipo durante 49 generaciones y los dos trabajos fueron reanalizados por KEIGHTLEY y BATAILLON (2000). Las estimas BM y ML de los parámetros mutacionales de varios caracteres relacionados con eficacia en ambos experimentos fueron similares, con unos valores medios de 0,013 (BM) y de 0,005 (ML) para la tasa de mutación por genoma haploide y generación de 0,06 (BM) y 0,32 (ML) para el efecto promedio de las mutaciones en homocigosis. A pesar de las diferencias apuntadas, ambos experimentos sugieren una tasa de mutación baja y un efecto promedio relativamente alto. En una fase posterior VASSILIEVA *et al.* (2000) analizaron los efectos de la acumulación de mutaciones tras 214 generaciones. Los valores obtenidos promediando las estimas para productividad y tasa de crecimiento intrínseco ( $r$ ) son comparables a los anteriores: una tasa de mutación por genoma haploide y generación de 0,016 (BM) o 0,008 (ML) y un efecto promedio de las mutaciones en homocigosis de 0,15 (BM) o 0,16 (ML).

BAER *et al.* (2005) evaluaron la eficacia total de líneas AM de tres especies de nematodos de la familia Rhabditidae. En *C. elegans* se obtuvieron unos valores BM medios de 0,004 para la tasa de mutación por genoma haploide y de 0,15 para su efecto promedio. Los valores obtenidos para las otras dos especies (*C.*

*briggsae* y *Oscheius myriophila*) también ponen de manifiesto una tasa de mutación pequeña y unos efectos moderados. En otro trabajo en el que se evaluó productividad y eficacia total en varias cepas de *C. elegans* y *C. briggsae* a 20° y 25° C BAER *et al.* (2006) se obtuvieron unas estimas BM de 0,007 para la tasa de mutación haploide y de 0,16 para el efecto promedio en el caso de *C. elegans*, y de 0,031 y de 0,07 en el caso de *C. briggsae* (promediando por cepa, temperatura y carácter).

### ***Arabidopsis thaliana***

Los primeros resultados obtenidos en *Arabidopsis thaliana* proceden del trabajo de SCHULTZ *et al.* (1999). A partir de un individuo con una homocigosis casi total ( $F \approx 0,98$ ) se generaron 1000 líneas AM que se mantuvieron por autofecundación de un individuo por generación. Tras 10 generaciones de acumulación de mutaciones se obtuvieron unas estimas BM de 0,05 para la tasa de mutación por genoma haploide para eficacia total y de 0,23 para el efecto promedio de las mutaciones implicadas. Sin embargo, en otro estudio llevado a cabo con esta misma especie y siguiendo un diseño parecido, SHAW *et al.* (2000) no encontraron un declive en media significativo para ninguno de los caracteres relacionados con eficacia ni para eficacia total tras 17 generaciones de acumulación de mutaciones, aunque sí observaron un aumento de la varianza genética similar al descrito en otras especies. Las estimas BM fueron 0,002 para la tasa de mutación y 0,36 para el efecto promedio de las mutaciones (promediando para los caracteres ‘número de frutos’ y ‘número de semillas por fruto’). Los autores atribuyen el exiguo (y no significativo) declive en media observado, entre otras causas, a la posibilidad de que las mutaciones implicadas no tuvieran un efecto deletéreo consistente. De este modo, sus resultados no apoyarían la idea de que la mayoría de las mutaciones tienen un efecto negativo sobre la eficacia biológica. SHAW *et al.* (2002) analizaron de nuevo estos datos sin suponer que los efectos

mutacionales debían ser necesariamente deletéreos sino que seguían una distribución gamma desplazada, añadiendo a la versatilidad de la función gamma la posibilidad de que los efectos mutacionales fueran positivos o negativos. Se obtuvo así una tasa de mutación de 0,08 (promediando ‘número de frutos’ y ‘número de semillas por fruto’) y un efecto promedio no significativamente distinto de cero. Estos resultados ilustran los problemas que pueden surgir cuando se estudian los efectos deletéreos de las mutaciones sobre eficacia a través de los efectos sobre otros caracteres que se consideran componentes principales de aquélla sin una justificación sólida. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, podría ocurrir que el número de frutos o semillas producido no fuese un auténtico componente principal de la eficacia, sino un carácter que experimenta mutaciones con efectos en ambos sentidos y que está sometido a alguna forma de selección estabilizadora.

### ***Daktuslophaira vitifoliae***

DOWNIE (2003) realizó un experimento de acumulación de mutaciones a corto plazo con *Daktuslophaira vitifoliae*, un insecto parásito de la vid que tiene un ciclo biológico complicado en el que se incluye una fase subterránea partenogenética. Aisló tres clones de distinta procedencia y, a partir de un único individuo por clon, generó varias líneas AM mantenidas con un progenitor partenogenético por generación y una población control independiente con un censo efectivo aproximado de 100 individuos. También intentó mantener una población control a una temperatura por debajo de la óptima para reducir el número de generaciones, pero no tuvo éxito. Después de unas 20 generaciones de AM sólo se apreciaron efectos deletéreos de la mutación para dos de los cuatro caracteres relacionados con eficacia estudiados en dos de los tres grupos de líneas, y variación genética heredable para dos de los cuatro caracteres y en uno de los tres grupos de líneas. Las estimas BM para la tasa de mutación haploide y para el efecto promedio en

heterocigosis obtenidas fueron de 0,012 y 0,11, respectivamente. Las estimas ML obtenidas en el supuesto de igualdad de efectos (el modelo con los valores más altos de verosimilitud) fueron algo más altas para la tasa de mutación (0,0345) y más bajas para el efecto mutacional (0,0465) que las estimas BM.

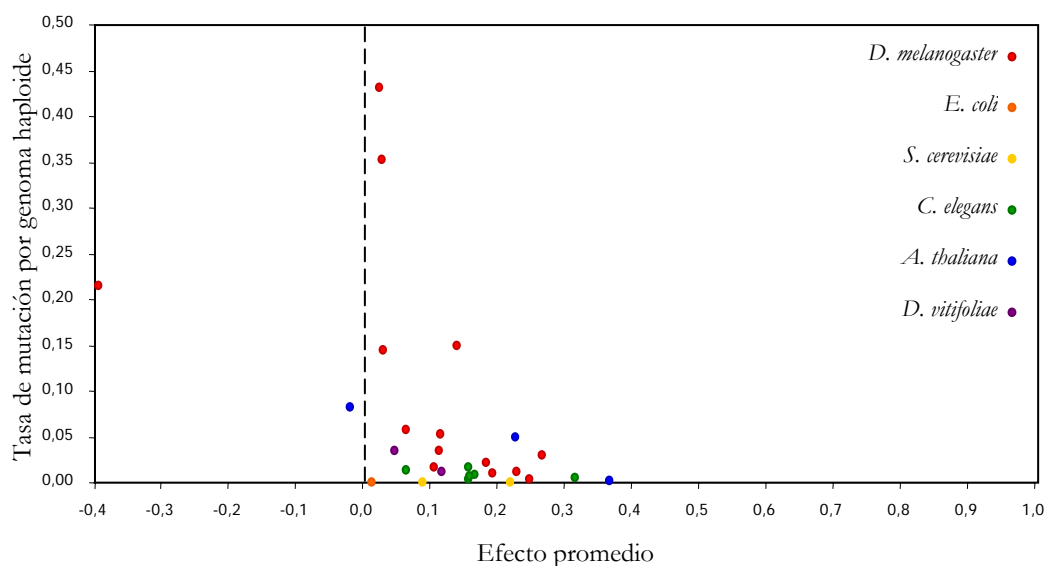
Las estimas de la tasa de mutación haploide y del efecto promedio obtenidas a partir de los experimentos de AM que acabamos de comentar aparecen recogidas en la *Tabla 1* y se resumen gráficamente en la *Gráfica 2*.



**Tabla 1.** Estimaciones de la tasa de mutación haploide y del efecto promedio deletéreo obtenidas en experimentos de acumulación de mutaciones realizados con varias especies.

ESPECIE	CARÁCTER	REFERENCIA	MÉTODO	$\lambda$	E(s)
<i>D. melanogaster</i>	Viabilidad	MUKAI (1964)	BM	0,353	0,027
		MUKAI <i>et al.</i> (1972)	BM	0,431	0,023
			MD	0,010	0,191
		OHNISHI (1977a)	BM	0,145	0,029
			MD	0,011	0,226
		FERNÁNDEZ y LÓPEZ-FANJUL (2000)	MD	0,016	0,103
		FRY <i>et al.</i> (1999)	BM	0,053	0,113
		CHAVARRÍAS <i>et al.</i> (2001)	BM	0,058	0,062
		CABALLERO <i>et al.</i> (2002)	BM	0,003	0,246
		CHARLESWORTH <i>et al.</i> (2004)	BM <sup>a</sup>	0,017	0,182
			BM <sup>b</sup>	0,174	-0,394
		GONG <i>et al.</i> (2005)	BM	0,150	0,138 <sup>c</sup>
		Eficacia	HOULE <i>et al.</i> (1992)	MD	0,030
ÁVILA y GARCÍA-DORADO (2002)	BM		0,034	0,112	
<i>E. coli</i>	Eficacia	KIBOTA y LYNCH (1996)	BM	0,0002	0,012 <sup>d</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	Eficacia	ZEYL y DEVISSER (2001)	ML	0,000055	0,217 <sup>e</sup>
		WLOCH <i>et al.</i> (2001)		0,00057 <sup>f</sup>	0,086 <sup>d,f</sup>
<i>C. elegans</i>	Productividad, <i>r</i> , y longevidad	KEIGHTLEY y BATAILLON (2000)	BM	0,013	0,063
			ML	0,005	0,314
	Productividad y <i>r</i>	VASSILIEVA <i>et al.</i> (2000)	BM	0,016	0,155
			ML	0,008	0,164
	Eficacia	BAER <i>et al.</i> (2005)	BM	0,004	0,154
BAER <i>et al.</i> (2006)			BM	0,007	0,156
<i>A. thaliana</i>	Eficacia	SCHULTZ <i>et al.</i> (1999)	BM	0,049	0,225
		SHAW <i>et al.</i> (2000)	BM	0,002	0,365
		SHAW <i>et al.</i> (2002)	ML	0,082	-0,020
<i>D. vitifoliae</i>	Supervivencia al 29º día	DOWNIE (2003)	BM	0,012	0,116 <sup>e</sup>
			ML	0,034	0,046 <sup>e</sup>
	BM	Bateman-Mukai	<sup>c</sup> Efecto en hemicigosis		
	ML	Máxima verosimilitud	<sup>d</sup> Efecto haploide		
	MD	Mínima distancia	<sup>e</sup> Efecto en homocigosis		
	<sup>a</sup>	Método de clasificación	<sup>f</sup> Estima directa obtenida a partir del análisis de tétradas		
	<sup>b</sup>	Método de regresión			

**Figura 2.** Representación gráfica de las estimas recogidas en la Tabla 1. El efecto promedio aparece en el eje de abscisas y la tasa de mutación haploide por generación en el eje de ordenadas.



Como se desprende de las estimas disponibles para varias especies que acabamos de resumir, no existe un acuerdo total acerca de las propiedades de la mutación espontánea deletérea. Podemos hablar de dos modelos que asumen distintos valores de los parámetros mutacionales y que difieren, por tanto, en sus predicciones sobre las consecuencias de la acumulación de mutaciones (GARCÍA-DORADO 2003). En un modelo SENSIBLE la eficacia sería fácilmente alterable por la mutación. Este modelo implica que la tasa de mutación deletérea por gameto y generación es alta ( $\lambda \sim 0,5$ ) y que los efectos deletéreos son tenues ( $s$  del orden de 0,02), y estaría apoyado por los resultados experimentales de MUKAI (MUKAI 1964; MUKAI *et al.* 1972), aunque, como hemos comentado anteriormente, su validez se ha cuestionado en reanálisis posteriores. En el modelo TOLERANTE la eficacia muestra una tolerancia considerable a las mutaciones. En este caso, la mayoría de las mutaciones tendrían un efecto muy pequeño, tanto que podría pasar

desapercibido en los experimentos de acumulación de mutaciones, y el resto surgirían a una tasa baja ( $\lambda \sim 0,03$  para eficacia) y tendrían un efecto deletéreo promedio moderado ( $s \sim 0,2$ ). Este modelo está apoyado, entre otros, por los resultados experimentales de FERNÁNDEZ y LÓPEZ-FANJUL (1996) y CHAVARRÍAS *et al.* (2001).

A pesar de la heterogeneidad de los organismos estudiados, los diseños experimentales y los métodos de análisis, en la *Gráfica 2* se observa un consenso general en torno a  $\lambda \leq 0,06$  y  $E(s) \sim 0,12$ . Los valores discrepantes corresponden a evaluaciones en un cromosoma de *D. melanogaster* (II, III o X). Sin embargo, reanálisis posteriores de los datos de MUKAI y OHNISHI por el método de mínima distancia (GARCÍA-DORADO 1997) arrojan estimas compatibles con las restantes.

### 1.2.2. ESTIMA DEL GRADO DE DOMINANCIA DE LAS MUTACIONES DELETÉREAS

Hasta aquí sólo hemos considerado los efectos deletéreos de mutaciones en homocigosis, de los que dependen fundamentalmente tanto su probabilidad de fijación final como el consiguiente deterioro de la eficacia biológica de la población. Sin embargo, cada nueva mutación se presenta durante un tiempo sólo en heterocigosis, de manera que su cambio en frecuencia a corto y medio plazo depende críticamente de la fracción de su efecto que se expresa en los heterocigotos, es decir, del grado de dominancia  $b$ . El estudio de los valores de  $b$  para la mutación deletérea es básico para entender la naturaleza y el comportamiento de la variabilidad genética de la eficacia biológica en las poblaciones naturales, o la tasa a la que dicha eficacia biológica se reduce al aumentar el coeficiente de consanguinidad de los individuos (depresión consanguínea). Si el estudio de los efectos deletéreos en homocigosis es complicado, es evidente que el de su grado de expresión en heterocigosis lo será aún más.

Para estimar el coeficiente de dominancia de las mutaciones se han utilizado varios métodos. Unos se basan en el análisis de cromosomas extraídos de poblaciones naturales segregantes pero, como se apuntaba anteriormente, la fiabilidad de sus conclusiones depende de la validez de la suposición de que dichas poblaciones se hallen en equilibrio mutación-selección. Nosotros nos centraremos en la comparación de los efectos sobre eficacia (o uno de sus componentes) de cromosomas de líneas AM, en homocigosis y heterocigosis. De estos datos pueden obtenerse estimas del grado de dominancia mediante diferentes análisis, pero las más usadas se basan en la relación entre las reducciones medias del carácter expresadas en heterocigotos y homocigotos (estima 'ratio') o en la regresión del valor del carácter en los heterocigotos

sobre el valor genotípico de sus homocigotos parentales (estima de regresión). El método de la ratio proporciona una estima de la media de los valores de  $b$  de las mutaciones ponderados por los correspondientes coeficientes de selección en homocigosis, lo que producirá valores menores que la media no ponderada debido a que las mutaciones con efectos más grandes tienden a tener valores inferiores de  $b$ . La principal desventaja de este método es que, si las reducciones en viabilidad no se deben sólo a la mutación sino también a otros factores genéticos o ambientales, los valores obtenidos sobreestiman el verdadero valor de  $b$ . Es decir, la validez de las estimas depende de la disponibilidad de un control fiable. Las estimas de regresión, por el contrario, no se ven afectadas por el problema anterior, pero refieren al promedio de los valores de  $b$  de las mutaciones ponderadas por su coeficiente de selección cuadrático, lo que producirá valores aún menores si las mutaciones con efectos más grandes tienden a tener valores inferiores de  $b$ . No obstante, la diferencia entre esta estima y el grado medio de dominancia será pequeña, pues los análisis suelen utilizar sólo las líneas denominadas cuasinormales, excluyendo por tanto las mutaciones más severas.

### ***Drosophila melanogaster***

*Drosophila melanogaster* es de nuevo el organismo para el que existe más información. SIMMONS y CROW (1977) discutieron los datos obtenidos para cromosomas II AM cuasinormales por el grupo de MUKAI y OHNISHI. De entre las estimas incluidas en esta discusión es notable que los resultados del grupo de MUKAI, obtenidos a partir de su primer experimento AM en distintas generaciones (MUKAI *et al.* 1964; MUKAI *et al.* 1965; MUKAI 1969), proporcionen estimas ratio radicalmente distintas según la naturaleza de los heterocigotos utilizados. Cuando los heterocigotos eran portadores de un cromosoma con mutaciones acumuladas y otro cromosoma que se consideraba equivalente al original sin mutaciones acumuladas (heterocigotos

en acoplamiento con el cromosoma original), el grado de dominancia en cinco evaluaciones diferentes fue consistentemente negativo, con una media de -0,17, indicando así acción génica sobredominante de las mutaciones deletéreas. Aquí hay que notar, no obstante, que el cromosoma considerado original no era sino un cromosoma de viabilidad elevada muestreado de una línea AM designada mediante el método de clasificación. Por el contrario, las estimas ratio fueron siempre positivas cuando las mutaciones acumuladas estaban en acoplamiento en un mismo cromosoma en heterocigosis con otro no isogénico (dos estimas ratio con un promedio 0,11), o cuando se ponían en heterocigosis parejas de cromosomas con mutaciones acumuladas (heterocigotos en repulsión, dos estimas ratio con un promedio 0,35). Las estimas de regresión obtenidas a partir de los datos de heterocigotos en repulsión son similares (MUKAI y YAMAZAKI 1968, promedio en torno a 0,4). Sin embargo, es interesante resaltar la existencia de un grupo de datos atípicos por su elevada viabilidad media, que hubieron de ser excluidos de las estimas de regresión por mostrar una pendiente negativa de la media de los heterocigotos sobre la de los homocigotos. En principio se interpretó que, al corresponder estos datos a cruces en que al menos una de las líneas tenía viabilidad alta, los heterocigotos correspondientes eran auténticos heterocigotos en acoplamiento, implicando de nuevo sobredominancia de los heterocigotos en acoplamiento con el cromosoma original. No obstante, un reanálisis de GARCÍA-DORADO y CABALLERO (2002) ha puesto de manifiesto que el grupo de líneas de viabilidad elevada de este experimento, utilizadas como control según el método de clasificación y como fuente del cromosoma original para obtener los heterocigotos en acoplamiento, es genéticamente distinto del resto desde el comienzo del experimento por razones desconocidas, habiéndose propuesto que procedan de una contaminación externa ocurrida durante los cruzamientos que dieron lugar a las líneas de acumulación. Estos autores muestran que esta circunstancia puede afectar

críticamente las estimas que incluyan esas líneas. Así pues, las estimas del grado de dominancia basadas en el primer experimento del grupo de MUKAI, que utilizan dichas líneas o heterocigotos con uno de sus cromosomas, han de tomarse con precaución.

Más tarde, OHNISHI (1977b) obtuvo elevadas estimas ratio para heterocigotos en acoplamiento con un cromosoma ‘original’ (0,49) y para heterocigotos en repulsión (0,40), ambas próximas a la aditividad. Sin embargo, GARCÍA-DORADO y CABALLERO (2000) reanalizaron estos datos y encontraron que los cambios en viabilidad media observados durante la primera mitad de este experimento parecen incluir un componente no genético. Por ello obtuvieron estimas por regresión, que estarían libres de los sesgos inducidos por este fenómeno, y éstas resultaron notablemente menores (0,10 para heterocigotos en acoplamiento y 0,03 para heterocigotos en repulsión).

HOULE *et al.* (1997) también aportaron estimas de regresión del grado medio de dominancia de mutaciones espontáneas con respecto a varios componentes de eficacia en *Drosophila melanogaster* que indicaban varios grados de recesividad parcial. El promedio bruto de dichas estimas fue 0,12, aunque la media ponderada por los efectos cuadráticos, como corresponde a las estimas de regresión, es aún menor, 0,05 (GARCÍA-DORADO y CABALLERO 2000). Sin embargo, 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 deletéreas tenues.

CHAVARRÍAS *et al.* (2001) obtuvieron una estima del grado de dominancia por regresión algo menor que las anteriores (0,33), a pesar de que se obtuvo

después de 250 generaciones de acumulación de mutaciones. En este momento la selección natural podría haber eliminado aquellas líneas portadoras de mutaciones deletéreas severas que son, probablemente, las más recesivas, lo que causaría una sobrestimación del verdadero valor del grado de dominancia promedio.

### ***Caenorhabditis elegans***

Los únicos resultados disponibles para otra especie son los obtenidos por VASSILIEVA *et al.* (2000) para *Caenorhabditis elegans* para distintos componentes de eficacia. En general, las estimas obtenidas parecen indicar una acción génica aditiva ( $b \sim 0,5$ ), pero los errores típicos son demasiado grandes y no permiten rechazar la recesividad parcial.

En definitiva, aunque las estimas disponibles más sólidas del grado de dominancia oscilan entre 0,05 y 0,5, diversas complicaciones experimentales, así como la magnitud de los errores típicos y la propia naturaleza y factores de ponderación que las afectan, hacen que el grado medio de dominancia de las mutaciones deletéreas, por no hablar de su distribución, sean aún objeto de debate.



## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es completar la descripción de las propiedades de la mutación deletérea en el mismo fondo genético utilizado en estudios previos (FERNÁNDEZ y LÓPEZ-FANJUL 1996; CHAVARRÍAS *et al.* 2001; ÁVILA y GARCÍA-DORADO 2002) para obtener unas estimas más precisas del grado de dominancia promedio en una fase más temprana del proceso, así como para estudiar los efectos de un periodo largo de acumulación de mutaciones sobre la viabilidad de las líneas AM y sobre la tasa de mutación deletérea.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 2.1.1. CONTROL C1

CABALLERO *et al.* (1991) obtuvieron una línea de *Drosophila melanogaster* isogénica para todos sus loci. A partir de esta línea se derivó un conjunto de 200 líneas de acumulación de mutaciones, AM1, y una población control, C1. Las líneas AM1 se mantuvieron mediante el apareamiento de una pareja de hermanos por línea y generación. El control C1 se perpetuó en 25 botellas (8 hasta la generación 200) con unos 100 padres potenciales de ambos sexos por botella, mediante un sistema de apareamiento circular (SANTIAGO *et al.* 1992). Las líneas AM1 se descartaron en la generación 300, pero el control C1 se mantuvo hasta el final de este experimento (generación 374).

Para garantizar que la única fuente de variación genética durante el experimento fuera la mutación y no la contaminación con individuos exógenos, la población base isogénica incorporaba un marcador en el cromosoma III que consistía en la mutación recesiva *sepia* (*se*) cuya manifestación fenotípica es un color de ojos marrón fácilmente distinguible del rojo silvestre.

Tras 265 generaciones, una de las líneas AM1 (85), que hasta entonces había mostrado buena viabilidad, fue elegida como población base para la obtención del material empleado en el presente experimento. Como ilustra la *Figura 3* esta población dio origen a las líneas AM2 y los controles C2 y C2F.

#### 2.1.2. LÍNEAS AM2

Se trata de un conjunto de 150 líneas mantenidas mediante el apareamiento de una única pareja de hermanos por línea y generación. En cada línea se

disponía, además, de dos apareamientos de reserva a los que se recurría cuando el primero no conseguía reproducirse, al igual que se había procedido con las líneas AM1.

### **2.1.3. CONTROL C2**

El control C2 lo constituye una población mantenida en 25 botellas con unos 100 padres potenciales de ambos sexos por botella siguiendo un sistema circular de apareamientos. De este modo, se aseguraba un número de progenitores lo suficientemente elevado (en torno a 2500 padres potenciales por generación) tanto para permitir la selección eficaz en contra de las mutaciones deletéreas como para reducir el cambio genético por deriva.

Esta población se mantenía a la misma temperatura que las líneas AM2 y el control C1 (25°C), con lo que se conseguía que las generaciones transcurrieran de forma simultánea en todos ellos.

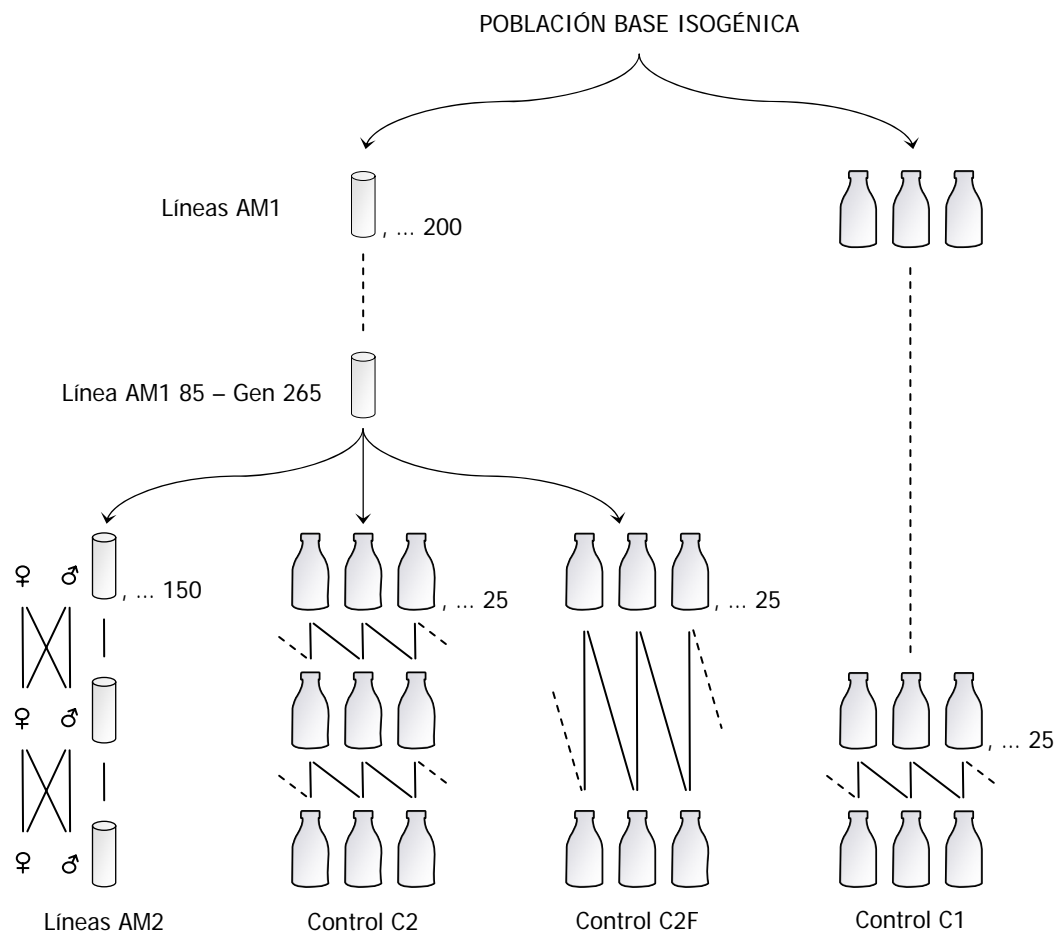
### **2.1.4. CONTROL C2F**

Esta población tiene las mismas características que el control C2, pero se perpetuó con un intervalo generacional más largo conseguido gracias a un mantenimiento parcial a menor temperatura (16°C). De este modo se intentaba, reduciendo el número de generaciones transcurridas, disminuir el número esperado de mutaciones acumuladas.

Lo que inicialmente se pretendía era que por cada generación del control C2F transcurrieran 2 generaciones del control C2. Para ello los adultos del control C2F, emergidos de forma sincrónica a los del control C2 en la generación  $t$ , se mantenían a 16°C hasta que, al mismo tiempo que los adultos del control C2 de la generación  $t + 1$ , se transferían a nuevas botellas. Se mantenían a partir de ese momento a 25°C, hasta que la descendencia emergía simultáneamente a la de la generación  $t + 2$  del control C2.

Sin embargo, en la práctica, el transcurso de las generaciones del control C2F no se ajustó completamente a este diseño. Los 16°C a los que se mantenía el control C2F están muy por debajo de la temperatura óptima de *Drosophila melanogaster* (25°C) y los individuos no se reproducían bien. Por este motivo, cuando se consideraba necesario, se omitía el mantenimiento a 16°C, por lo que las generaciones transcurridas para el control C2F no fueron exactamente la mitad de las transcurridas para el C2.

**Figura 3.** Esquema de la obtención de las poblaciones empleadas.



## 2.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Las líneas AM2 se mantenían en tubos de vidrio de fondo plano de 20 mm de diámetro y 90 mm de altura, y las poblaciones control en botellas de 250 ml de capacidad. En el fondo del recipiente se disponía una capa de medio de cultivo de unos 2 cm de espesor.

El medio de cultivo se preparaba por cocción de 100 gramos de levadura, 100 gramos de azúcar, 12 gramos de agar industrial y 2,5 gramos de sal por litro de agua. Para evitar contaminaciones fúngicas se añadía a esta mezcla ácido propiónico al 0,5% (v/v).

Tanto las líneas AM2 como las poblaciones control C1 y C2 se mantenían bajo condiciones de temperatura y humedad controladas ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $40 \pm 5\%$  HR, respectivamente) y con iluminación constante. Con el control C2F se procedía de igual modo con la única salvedad de que, durante el tiempo equivalente a una generación de las líneas AM2 y de los controles C1 y C2, se mantenía a los adultos del control C2F a  $16^\circ\text{C}$  para aumentar el intervalo generacional.

Las manipulaciones se realizaron a la temperatura ambiente del laboratorio y utilizando como anestésico gas  $\text{CO}_2$ .

### 2.3. EVALUACIÓN DE VIABILIDADES

El esquema descrito anteriormente se prolongó durante 108 generaciones (374 en el control C1). Durante este periodo se evaluó la viabilidad de los cromosomas II tanto de las líneas AM2 como de los controles C1, C2 y C2F en varias ocasiones.

Para evaluar la viabilidad de los cromosomas II de las distintas poblaciones se emplearon como referencia dos cepas marcadoras. La cepa (*In(2LR)O, Cy dp<sup>h1</sup> pr cn<sup>2</sup> / L<sup>2</sup>*) en las evaluaciones realizadas en las generaciones 41 y 46 y la cepa (*In(2LR) CyO, Cy / L<sup>2</sup>*) en el resto de evaluaciones. Ambas cepas eran portadoras de las mutaciones del cromosoma II *Curly (Cy)* y *Lobe (L<sup>2</sup>)*, en heterocigosis y repulsión. El marcador *Curly* se encuentra en posición 6.1 asociado a una inversión que impide el sobrecruzamiento. 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 a los individuos que la portan, mientras que en homocigosis causa ojos diminutos y una viabilidad muy reducida.

El proceso de evaluación requiere realizar una serie de apareamientos entre los individuos a evaluar e individuos de la cepa de referencia, y la viabilidad de cada cromosoma II se calcula a partir de la segregación fenotípica observada en la descendencia del último de estos apareamientos.

La evaluación de la viabilidad de las diferentes poblaciones en una misma generación se realizó simultáneamente para evitar la confusión de efectos ambientales en las diferencias halladas entre los distintos tratamientos.

### 2.3.1. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS II DE LAS LÍNEAS AM2 EN HOMOCIGOSIS Y EN HETEROCIGOSIS CON CROMOSOMAS II DEL CONTROL C2F

Estas evaluaciones se realizaron en las generaciones 41, 77 y 85 para las líneas AM2 (generaciones 25, 44 y 50 para el control C2F, respectivamente). Asumimos que cada línea AM2 es genéticamente uniforme, de modo que cada par de cromosomas II muestreados aleatoriamente de una misma línea ( $l$ ) pueden considerarse idénticos.

Como se muestra en la *Figura 4A* se aparearon 20 hembras vírgenes ( $l/l$ ) con 20 machos  $Cy/L^2$  para cada línea AM2. Al mismo tiempo se realizaron 64 apareamientos cada uno de ellos entre 20 hembras vírgenes del control C2F ( $c/c$ ) y 20 machos  $Cy/L^2$ . A partir de la descendencia obtenida se realizaron los siguientes cruzamientos (cada uno de ellos replicados 5 veces en la generación 41 y 8 veces en las generaciones 77 y 85):

- para evaluar la viabilidad del cromosoma  $l$  de cada línea AM2 en homocigosis, se aparearon 5 hembras vírgenes  $Cy/l$  con 5 machos  $L^2/l$ .
- para evaluar la viabilidad del mismo cromosoma  $l$  en heterocigosis con cromosomas control ( $c$ ) se aparearon 5 hembras vírgenes  $Cy/c$  con 5 machos  $L^2/l$

### 2.3.2. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS II DE LAS LÍNEAS AM2 EN HOMOCIGOSIS Y DE LOS CROMOSOMAS II DE LOS CONTROLES C2 Y C2F EN PANMIXIA

Estas evaluaciones se realizaron de forma simultánea para las líneas AM2 y para el control C2 en la generación 46, y para el control C2F en la generación 29 (*Figura 4B*). De nuevo, asumimos que cada línea AM2 es genéticamente uniforme, mientras que las poblaciones control son potencialmente segregantes. En cada línea AM2 se aparearon 20 hembras vírgenes  $l/l$  con 20 machos  $Cy/L^2$ . Para evaluar la viabilidad en homocigosis de los cromosomas



II de las líneas AM2, a partir de la descendencia, se aparearon 5 hembras  $Cy/l$  con 5 machos  $L^2/l$ . Este apareamiento se replicó 3 veces para cada línea AM2. Paralelamente y para cada una de las poblaciones control C2 y C2F, se realizaron 40 apareamientos entre 20 hembras vírgenes del control ( $c/c$ ) y 20 machos  $Cy/L^2$ . Para evaluar la viabilidad en panmixia de los cromosomas II de cada uno de los controles se aparearon 5 hembras  $Cy/c$  con 5 machos  $L^2/c$ . Para cada uno de los controles se realizaron 300 apareamientos.

### **2.3.3. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS II DE LAS LÍNEAS AM2 Y DE LOS CROMOSOMAS II DE LOS CONTROLES C2 Y C2F EN HOMOCIGOSIS**

Estas evaluaciones se realizaron simultáneamente para las líneas AM2 y para el control C2 en la generación 98 y para el C2F en la generación 59. Como ilustra la *Figura 4C*, se realizaron 5 apareamientos entre 2 hembras vírgenes  $Cy/L^2$  y 2 machos  $l/l$  para cada línea AM2. Para los controles C2 y C2F se realizaron 100 apareamientos análogos entre 2 hembras vírgenes  $Cy/L^2$  y 2 machos  $c/c$ . De la descendencia de cada cruzamiento se elegía un único macho  $L^2/+$  que se apareaba con 5 hembras  $Cy/L^2$  (donde + indica el cromosoma muestreado de los controles o de las líneas AM2). Todos los cromosomas + que aparezcan en la descendencia de este cruzamiento serán copia de un único cromosoma + muestreado en el macho  $L^2/+$ . De la descendencia emergida en cada uno de estos nuevos cruzamientos se cruzaron 5 hembras vírgenes  $Cy/+$  con 5 machos  $L^2/+$  para evaluar la viabilidad de estos cromosomas + en homocigosis. Cada uno de estos cruzamientos se replicó 5 veces.

### **2.3.4. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS II DE LOS CONTROLES C1, C2 Y C2F EN HOMOCIGOSIS Y EN PANMIXIA**

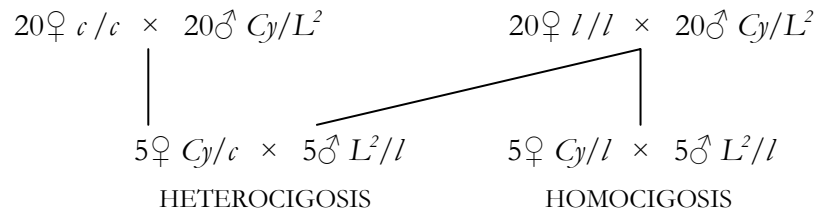
Estas evaluaciones se realizaron de forma sincrónica para el control C1 en la generación 374, para el control C2 en la generación 108 y para el control C2F

en la generación 69 (*Figura 4D*). Para cada población control se establecieron 50 cruzamientos entre 2 hembras vírgenes  $Cy/L^2$  y 2 machos del control. De la descendencia del cruzamiento  $i$ -ésimo se eligió un único macho  $L^2/c_i$  que se cruzó con 3 hembras vírgenes  $Cy/L^2$ . De la descendencia de este cruzamiento se recogieron 10 hembras vírgenes  $Cy/c_i$  y 10 machos  $L^2/c_i$ , todos portando copias del mismo cromosoma  $c_i$  del macho, y se aparearon. Con los individuos de la descendencia de cada uno de estos apareamientos se realizaron dos tipos de apareamientos:

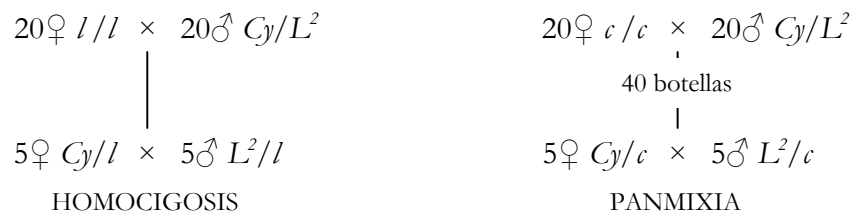
- para evaluar la viabilidad de los cromosomas II del control en homocigosis, se aparearon 5 hembras vírgenes  $Cy/c_i$  con 5 machos  $L^2/c_i$ .
- para evaluar la viabilidad de los cromosomas II del control en panmixia se aparearon 5 hembras vírgenes  $Cy/c_i$  con 5 machos  $L^2/c_{i+1}$ .

**Figura 4.** Esquema de los cruces realizados en cada evaluación.

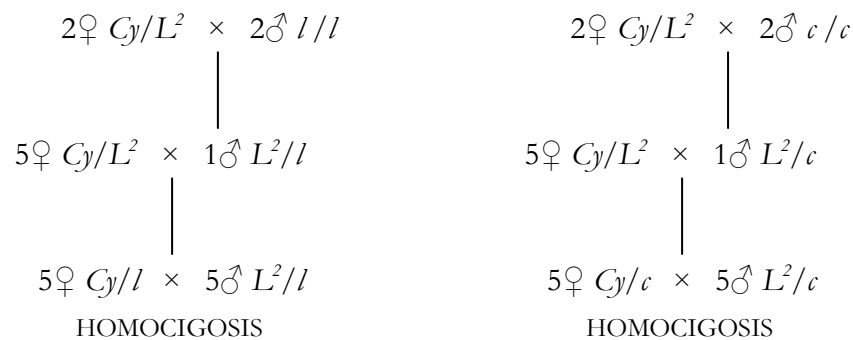
A



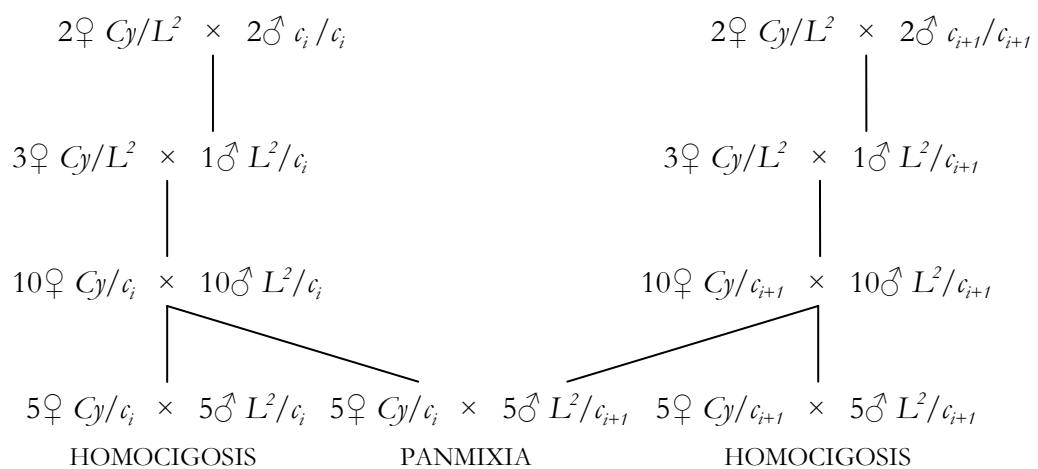
B



C



D



### 2.3.5. CÁLCULO DE LA VIABILIDAD

La viabilidad de los cromosomas II pertenecientes a los controles y a las líneas AM2 se evaluó en escala logarítmica a partir de la segregación del fenotipo silvestre en los apareamientos que acabamos de describir.

Durante las evaluaciones de las generaciones 41 y 46 se observó que el marcador  $Cy$  mostraba una expresión reducida cuando se encontraba en presencia del marcador  $L^2$ , de modo que no siempre se podía distinguir si un individuo era de genotipo  $Cy/L^2$  o  $+/L^2$ . Para evitar tener que utilizar estos genotipos en el cálculo de la viabilidad en estas generaciones, la segregación relativa del fenotipo silvestre se determinó frente al fenotipo  $Cy/+$  en vez de frente al fenotipo  $Cy/L^2$ . Además, para eliminar el problema aludido, en las evaluaciones posteriores se empleó una nueva cepa marcadora que expresaba correctamente sus marcadores en cualquier fondo genético. Así pues, las medidas de viabilidad utilizadas fueron las siguientes:

1) Índice  $\mathcal{V}^*$ : en las evaluaciones correspondientes a las generaciones 41 y 46 para las líneas AM2 y el control C2 (y a las generaciones 25 y 29 para el control C2F), la viabilidad se calculó como el logaritmo neperiano del cociente entre el número de individuos de fenotipo silvestre y el de individuos de fenotipo  $Cy/+$  recolectados.

2) Índice  $\mathcal{V}$ : en el resto de evaluaciones la viabilidad se calculó como el logaritmo neperiano del cociente entre el total de individuos silvestres y el total de individuos de fenotipo  $Cy/L^2$ .

De todo el análisis necesario para el cálculo de los parámetros mutacionales se excluyeron dos tipos de líneas (y, por tanto, de mutaciones). En primer lugar, las líneas que llevaban mutaciones letales y que podíamos distinguir porque durante su evaluación no se encontraron individuos de fenotipo silvestre. Además, para evitar que las líneas portadoras de mutaciones muy severas

produjeran sesgos importantes en las cotas de BATEMAN-MUKAI (haciendo que la cotas obtenidas para la tasa de mutación y el efecto en homocigosis estén muy por debajo y muy por encima, respectivamente, de los valores reales), en lo que respecta a las estimas de parámetros mutacionales, se utilizaron sólo las líneas cuasinormales. No existe en la literatura un criterio uniforme para definir lo que es una línea cuasinormal. En este trabajo se define línea cuasinormal como aquella cuya viabilidad media no difiere en más de tres desviaciones típicas de la viabilidad media de todas las líneas, coincidiendo con el criterio utilizado por CHAVARRÍAS *et al.* (2001).

## 2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 2.4.1. MODELO GENERAL

Supongamos que:

1) el número de mutaciones con efecto sobre viabilidad  $V$  que aparecen en el cromosoma II por gameto y generación es una variable aleatoria Poisson de parámetro  $\lambda_{II}$ .

2) las mutaciones tienen un efecto deletéreo  $s$  en homocigosis, entendido como la diferencia en viabilidad relativa entre los homocigotos silvestre y mutante, que se distribuye con una media  $E(s)$  y una varianza  $\sigma_s^2 = E(s^2) - E^2(s)$

3) si  $m$  es el alelo mutante y  $+$  el silvestre, las viabilidades relativas medias de los genotipos  $++$ ,  $+m$  y  $mm$  se especifican como 1,  $1-sh$  y  $1-s$ , respectivamente, donde  $s$  es el efecto en homocigosis de las mutaciones y  $h$  su grado de dominancia, que se consideran variables aleatorias continuas.

4) una población isogénica de una especie diploide, homocigota para todos sus loci, se subdivide en líneas independientes (líneas AM) mantenidas cada una de ellas, durante  $t$  generaciones, con un censo lo suficientemente pequeño como para hacer despreciables tanto el efecto de la selección natural sobre las frecuencias génicas como la magnitud de la varianza genética intralínea por generación.

5) se dispone también de un control derivado de la misma población isogénica y mantenido de forma sincrónica a las líneas AM. Esta población control tiene un censo lo suficientemente elevado como para evitar que la acumulación de nuevas mutaciones deletéreas cause una reducción relevante de su viabilidad media.

En una línea determinada, la frecuencia  $q$  de cada una de las mutaciones aparecidas en la generación  $j$  fluctuará aleatoriamente durante un pequeño número de generaciones, hasta que la mutación se pierda ( $q = 0$ ) o se fije ( $q = 1$ ).

Como las líneas AM2 derivan de una línea de acumulación de mutaciones previa, suponemos que se encuentran desde un principio en equilibrio mutación – selección – deriva, de modo que las mutaciones que se comporten como neutras se fijarán a una tasa constante  $\lambda_{II}$ , y el número  $i$  de mutaciones fijadas en el cromosoma II de una línea en la generación  $t$  será una variable Poisson con media  $\mu_{II} = \lambda_{II} t$ .

En esta situación, la media y varianza de la distribución de las medias de las líneas respecto del carácter estudiado,  $\overline{V}_t$ , en la generación  $t$  serán:

$$E(\overline{V}_t) = m_{0t} - \lambda_{II} t E(s) \quad (1)$$

$$\sigma^2(\overline{V}_t) = \sigma_R^2 + \lambda_{II} t E(s^2) \quad (2)$$

donde  $m_{0t}$  es la viabilidad media del genotipo correspondiente a la generación inicial y  $\sigma_R^2$  la varianza residual entre líneas de la viabilidad del cromosoma II, es decir, el componente de la varianza observada entre las medias de las líneas que es atribuible al muestreo.

#### 2.4.2. ESTIMAS DE $\lambda_{II}E(s^2)$ Y $\lambda_{II}E(s)$

La obtención de las estimas de  $\lambda_{II}E(s^2)$  y  $\lambda_{II}E(s)$  se basa en las ecuaciones (1) y (2). Según la ecuación (2), la varianza interlíneas en la generación  $t$  es  $\sigma_b^2 = \sigma^2(\overline{V}_t) - \sigma_R^2 = \lambda_{II}t E(s^2)$ , por lo que la tasa de incremento de dicha varianza  $\Delta V_{II}$  permite estimar  $\lambda_{II}E(s^2)$

$$\lambda_{II}E(s^2) \equiv \Delta V_{II} = \frac{\hat{\sigma}_b^2}{t}$$

En este caso, la variabilidad genética interlíneas del carácter considerado se estimó a partir del análisis de la varianza basado en el modelo

$$v_{ij} = l_i + e_{ij},$$

donde  $l_i$  es el efecto de la  $i$ -ésima línea y  $e_{ij}$  el error aleatorio correspondiente a la  $ij$ -ésima repetición. Todos los efectos descritos se consideran aleatorios.

La varianza interlíneas se estima entonces a partir del componente interlíneas de la varianza ( $\sigma_b^2$ ), estimado en el análisis de varianza descrito anteriormente, como:

$$\hat{\sigma}_b^2 = \frac{MCL - MCE}{k},$$

siendo  $MCL$  y  $MCE$  las medias de cuadrados correspondientes a las líneas y al error y  $k$  el número de réplicas evaluadas por línea.

El error típico (ET) de  $\lambda_{II}E(s^2)$  se obtuvo a partir de la expresión:

$$ET[\lambda_{II}E(s^2)] = \frac{\sqrt{\sigma_{MCL}^2 + \sigma_{MCE}^2}}{kt},$$

en la que  $\sigma_{MCL}^2$  se corresponde con  $2MCL^2/\gamma_L$  y  $\sigma_{MCE}^2$  con  $2MCE^2/\gamma_E$ , siendo  $\gamma_L$  y  $\gamma_E$  los grados de libertad de las medias de cuadrados correspondientes a cada caso.

A partir de la ecuación (1) se puede deducir una estima de  $\lambda_{II}E(s)$ , para lo que es necesario conocer el valor de  $m_{0t}$ . Suponiendo que nuestra población control se ha mantenido genéticamente invariable, se puede obtener una estima de  $m_{0t}$  a partir de la evaluación del carácter en dicha población en las



mismas condiciones ambientales que la evaluación de las líneas AM. Por lo tanto,  $\lambda_{II} E(s)$  podría estimarse como:

$$\lambda_{II} E(s) = E(\bar{V}_t) - m_{0t} \equiv \Delta M_{II} = \frac{m_c - m_l}{t},$$

siendo  $m_c$  y  $m_l$  los valores medios de la población control y de las líneas AM, respectivamente, ambas promediadas por réplica y apareamiento. Así, la estima de  $\lambda_{II} E(s)$  es la tasa de declive en media  $\Delta M_{II}$  observado en las líneas AM.

El error típico de  $\lambda_{II} E(s)$  se obtiene de la siguiente expresión:

$$ET [\lambda_{II} E(s)] = \frac{\sqrt{ET^2(\bar{X}_C) + ET^2(\bar{X}_L)}}{t},$$

donde  $ET^2(\bar{X}_C)$  y  $ET^2(\bar{X}_L)$  son los errores típicos al cuadrado de la media del control y de las líneas AM, respectivamente.

### 2.4.3. ESTIMAS DE $\lambda_{II}$ Y $E(s)$

Una vez estimados los valores de  $\lambda_{II} E(s^2)$  y  $\lambda_{II} E(s)$ , esto es, de  $\Delta V_{II}$  y  $\Delta M_{II}$ , y dado que,

$$\frac{\Delta M_{II}^2}{\Delta V_{II}} = \lambda_{II} \left[ 1 - \frac{\sigma_s^2}{E(s^2)} \right] \quad \frac{\Delta V_{II}}{\Delta M_{II}} = E(s) \left[ 1 + \frac{\sigma_s^2}{E^2(s)} \right]$$

podemos estimar  $\lambda_{II}$  y  $E(s)$  como:

$$\lambda_{II} \geq \frac{\Delta M_{II}^2}{\Delta V_{II}} \quad E(s) \leq \frac{\Delta V_{II}}{\Delta M_{II}}$$

Estas estimas representan unas cotas, inferior y superior, respectivamente, de  $\lambda_{II}$  y  $E(s)$ , conocidas como estimas BATEMAN-MUKAI (BM) (BATEMAN 1959; MUKAI 1964).

El error típico aproximado asociado a estas estimas se calculó como la raíz cuadrada de la varianza de un cociente, bajo la suposición de independencia entre el numerador y el denominador, esto es:

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

Los distintos términos que componen esta ecuación se calculan 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  $\Delta V_{II}$  y  $\Delta M_{II}$ , respectivamente, al estimar el error típico de  $E(s)$  y con  $\Delta M_{II}$  y  $E(s)$  al estimar el de  $\lambda_{II}$ .

Para el cálculo de estas estimas BM, otros autores (MUKAI 1964; MUKAI y YAMAZAKI 1968; MUKAI *et al.* 1972; CHARLESWORTH *et al.* 2004) no emplean una población independiente a las líneas AM para estimar la viabilidad inicial,  $m_{0t}$ , si no que recurren a un control interno al propio experimento de acumulación de mutaciones (control de ‘clasificación’). El conjunto de líneas AM se evalúa en dos generaciones próximas y se eligen como líneas control de la primera evaluación aquellas que en la segunda evaluación mostraron una mayor viabilidad, en la suposición de que esta alta viabilidad indicaba que dichas líneas no habían sufrido un deterioro mutacional relevante para viabilidad. La viabilidad media de estas líneas se utiliza para inferir la viabilidad inicial  $m_{0t}$ . En nuestro caso, empleamos como control interno para la generación 41 la viabilidad media en la generación 41 de las 3 líneas que habían mostrado mayor viabilidad en la generación 46.

Los parámetros mutacionales también se estimaron utilizando análisis de Mínima Distancia (MD) (GARCÍA-DORADO 1997) y de Máxima Verosimilitud (ML) (KEIGHTLEY 1998) siguiendo los procedimientos descritos en GARCÍA-DORADO y GALLEGO (2003). En función de la importancia que se le dé a la información proporcionada por un control independiente, se pueden distinguir varios tipos de estimas MD. Si esta información no se tiene en cuenta, bien porque no existe tal control o porque éste no es fiable, se habla de estimas MD-CI ( $m_{0t}$  se estima mediante MD ignorando la información del control caso de que exista). Si se asume que el valor de  $m_{0t}$  es la media observada en el control, se obtienen estimas MD-CD ( $m_{0t}$  determinada por el control). Si se explora un entorno de 2 errores típicos alrededor de la estima de  $m_{0t}$  proporcionada por el control, se habla de estimas MD-CC ( $m_{0t}$  considerando el control).

#### 2.4.4. ESTIMAS DEL GRADO DE DOMINANCIA

En las generaciones 41, 77 y 85 se evaluó la viabilidad media de los cromosomas II de las líneas AM2 en homocigosis y en heterocigosis con cromosomas del control C2F muestreados aleatoriamente.

En cada una de las líneas AM2 surgirán mutaciones diferentes, por lo que podemos suponer que cada mutación sólo estará representada en una línea  $l$ . Si llamamos  $x$  al valor genotípico de la viabilidad de cada cromosoma AM en homocigosis e  $y$  a la viabilidad del mismo cromosoma en heterocigosis, la covarianza entre  $x$  e  $y$ ,  $\sigma_{x,y} = E(x - \bar{x})(y - \bar{y})$ , puede expresarse como:

$$\sigma_{x,y} = \frac{1}{n-1} \left[ (x_l - \bar{x})(y_l - \bar{y}) + \sum_{j \neq l} (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y}) \right] \quad (3)$$

donde  $x_l$  e  $y_l$  representan los valores genotípicos de la viabilidad en homocigosis y heterocigosis de la línea  $l$  portadora de cierta mutación fijada  $m$ ,

$x_j$  e  $y_j$ , la viabilidad en homocigosis y heterocigosis de una línea genérica  $j$  y  $\bar{x}$  e  $\bar{y}$  la viabilidad media en homocigosis y heterocigosis del conjunto de todas las líneas. Si la mutación  $m$  fijada en la línea  $l$  tiene efectos  $s$  y  $sb$  en homocigosis y heterocigosis, respectivamente, ignorando las demás fuentes de variabilidad y utilizando  $E$  para designar valores esperados,

$$\begin{aligned}\bar{x} &= E(x) - \frac{s}{n} \quad , \quad \bar{y} = E(y) - \frac{sb}{n} \quad , \\ x_l &= E(x) - s \quad , \quad y_l = E(y) - sb \quad , \\ x_{j \neq l} &= E(x) \quad , \quad y_{j \neq l} = E(y) \quad .\end{aligned}$$

Sustituyendo en la ecuación (3), obtenemos que la contribución de la mutación  $m$  a la covarianza entre  $x$  e  $y$  es:

$$\sigma_{x,y} = \frac{1}{n-1} \left[ s^2 b \left( 1 - \frac{1}{n} \right)^2 + (n-1) \frac{s^2 b}{n^2} \right] = \frac{s^2 b}{n}$$

Por otro lado, la varianza de la viabilidad de los cromosomas de las líneas en homocigosis sería:

$$\sigma_x^2 = E(x - \bar{x})^2 = \frac{1}{n-1} \left[ (x_l - \bar{x})^2 + \sum_{j \neq l} (x_j - \bar{x})^2 \right],$$

y sustituyendo, igual que en el caso anterior, la contribución de  $m$  a la varianza de  $x$  resulta:

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{n-1} \left[ s^2 \left( 1 - \frac{1}{n} \right)^2 + (n-1) \frac{s^2}{n^2} \right] = \frac{s^2}{n}.$$

Sumando las contribuciones de todas las mutaciones acumuladas, y suponiendo que no hay covarianzas ambientales, obtenemos:

$$\sigma_{x,y} = \sum_i \frac{s_i^2 b_i}{n} \quad \sigma_x^2 = \sum_i \frac{s_i^2}{n}.$$

De este modo, la regresión de la viabilidad de los cromosomas AM en heterocigosis sobre el valor genético de la viabilidad del homocigoto correspondiente ( $b_{y,x}$ ) estima el grado de dominancia promedio ponderado por el efecto de las mutaciones en homocigosis al cuadrado ( $E(b_{ns^2})$ ).

$$b_{y,x} = \frac{\sigma_{x,y}}{\sigma_x^2} = \frac{\sum_i b_i s_i^2}{\sum_i s_i^2} = E(b_{ns^2})$$

Sin embargo, únicamente se pueden medir los valores fenotípicos de la viabilidad en homocigosis y en heterocigosis. De modo que lo que se calcula es la regresión de la media fenotípica observada en los heterocigotos sobre la de los homocigotos,  $b_{m_y, m_x}$ .

$$b_{m_y, m_x} = \frac{\sigma_{m_x, m_y}}{\sigma_{m_x}^2}$$

donde  $\sigma_{m_x, m_y}$  es igual a la covarianza entre las medias fenotípicas de viabilidad de los heterocigotos y los homocigotos y  $\sigma_{m_x}^2$  la varianza fenotípica de la viabilidad de los homocigotos.

En ausencia de covarianza ambiental, la covarianza entre las medias fenotípicas de heterocigotos y homocigotos  $\sigma_{m_x, m_y}$  es igual a la covarianza entre sus valores genotípicos  $\sigma_{x,y}$ . Así que, para obtener  $b_{y,x}$ , hemos de multiplicar la regresión de valores fenotípicos,  $b_{m_y, m_x}$ , por una constante  $C$ :

$$b_{y,x} = C \cdot b_{m_y, m_x},$$

donde  $C$  es el cociente entre la varianza de las medias muestrales fenotípicas obtenidas para los cromosomas de las líneas en homocigosis y la correspondiente varianza genotípica estimada mediante ANOVA ( $C = \sigma_{m_x}^2 / \sigma_x^2$ ).

El error típico aproximado de  $E(b_{ns^2})$  se obtuvo como:

$$ET[E(b_{ns^2})] = C \cdot ET[b_{m_y, m_x}]$$

#### 2.4.5. ESTIMAS DE LA TASA DE DEPRESIÓN CONSANGUÍNEA

La depresión consanguínea en viabilidad para cada cromosoma II no letal ( $\delta_{II}$ ) se estimó como la diferencia entre las viabilidades medias de los genotipos homocigoto y panmítico, y, para cada población control la tasa de depresión consanguínea no letal para cromosomas II ( $\bar{\delta}_{II}$ ) se calculó como el promedio de la depresión consanguínea de los cromosomas correspondientes.

## **RESULTADOS**

### 3. RESULTADOS

En lo sucesivo nos referiremos a cada evaluación indicando la generación correspondiente a las líneas AM2 y el control C2.

#### 3.1. DESCRIPTIVOS PARA LA VIABILIDAD DEL CROMOSOMA II

En las siguientes tablas aparecen estadísticos descriptivos que caracterizan a las poblaciones estudiadas en cada una de las evaluaciones.

La *Tabla 2* recoge los valores medios de la viabilidad de los cromosomas II cuasinormales de las distintas poblaciones. Si nos fijamos en los datos en su conjunto, podemos apreciar que la diferencia que existe entre generaciones es mayor que la que se observa entre evaluaciones realizadas en la misma generación. Esto se debe a que existen pequeñas diferencias en el diseño experimental.

La primera diferencia es la medida de viabilidad efectuada. Por los motivos explicados en *Material y métodos*, en las generaciones 41 y 46, la viabilidad se evaluó en referencia al genotipo  $Cy/+$  ( $V^*$ ), mientras que en el resto de generaciones, las viabilidades se establecieron en referencia al genotipo  $Cy/L^2$  ( $V$ ).

Las cuatro últimas evaluaciones no difieren en la cepa marcadora empleada, pero sí en la dirección de los cruzamientos previos a la evaluación de la viabilidad. En las dos últimas generaciones, las hembras procedían de la cepa marcadora y en las dos anteriores, de la línea a evaluar. Sucede que la viabilidad del genotipo  $Cy/L^2$  es mucho mayor (y la del genotipo silvestre mucho menor) cuando se evalúa en cruzamientos donde la descendencia tiene tanto el



citoplasma como el cromosoma X procedente de la cepa marcadora, un fenómeno que se podría atribuir a un proceso de coadaptación entre el citoplasma y/o el cromosoma X y el resto del genoma.

**Tabla 2.** Viabilidad media ( $\bar{V}^*$  o  $\bar{V}$ ), junto con su error típico (E.T.), de los cromosomas II cuasinormanles.

Gen		AM2		C2		C2F		C1	
		HO	HE	HO	PMX	HO	PMX	HO	PMX
41	$\bar{V}^*$	- 0,419	- 0,197						
	E.T.	0,020	0,016						
	N	106	106						
46	$\bar{V}^*$	- 0,289		- 0,120		- 0,203			
	E.T.	0,023		0,021		0,022			
	N	102		99		97			
77	$\bar{V}$	1,046	1,073						
	E.T.	0,023	0,024						
	N	93	95						
85	$\bar{V}$	1,080	0,929						
	E.T.	0,037	0,025						
	N	93	92						
98	$\bar{V}$	0,214		0,113		0,233			
	E.T.	0,019		0,029		0,022			
	N	75		79		79			
108	$\bar{V}$			0,132	0,366	0,330	0,331	0,389	0,418
	E.T.			0,068	0,041	0,051	0,029	0,044	0,033
	N			46	47	48	48	51	51
		HO	Homocigosis	HE	Heterocigosis con cromosomas II del control C2F				
		PMX	Panmixia	N	Número de líneas evaluadas				

Otro factor a tener en cuenta es la drástica reducción de viabilidad que mostraron los cromosomas II del control C2F, mantenido a baja temperatura. Esta reducción persistió incluso después de que el C2F se mantuviera a 25°C durante unas pocas generaciones de recuperación, pero fue inapreciable tras 10

generaciones de recuperación, lo que hace pensar que no se trataba de cambios genéticos. Este fenómeno de herencia, sólo a corto plazo, de alteraciones que se transmiten asociadas al material genético, pero cuya reversión en unas pocas generaciones indicaría que no afectan directamente a la secuencia de ADN, es lo que se conoce como cambios epigenéticos. HOULE y NUZHIDIN (2004) observaron un fenómeno similar en controles criopreservados.

Esta observación impide la utilización del C2F para el cálculo de las estimas BM de la tasa de mutación y del efecto promedio de las mutaciones, puesto que afecta al valor estimado de la viabilidad inicial.

Las *Tablas 3 y 4* muestran los resultados de los análisis de varianza y los valores del componente entre-líneas de la varianza, respectivamente, para la viabilidad de los cromosomas II cuasinormales.

La varianza entre las líneas de acumulación de mutaciones fue siempre significativamente mayor que cero, tanto en homocigosis como en heterocigosis, excepto en la evaluación de la generación 46. La varianza entre cromosomas control en homocigosis también fue significativa en todos los casos, mientras que en panmixia sólo lo fue en el caso del control C2 en la generación 108. Estos resultados parecen indicar que el C2 presenta una variación genética mayor que la de los controles C2F y C1.

**Tabla 3.** Medias de cuadrados obtenidas en los análisis de variança.

Gen	AM2			C2			C2F			C1		
	HO	HE	gl	HO	PMX	gl	HO	PMX	gl	HO	PMX	gl
41	MCB	105	0,224	105	0,169							
	MCW	407	0,141	407	0,130							
	P		0,00087		0,03662							
46	MCB	101	0,241		98	0,167		96	0,167			
	MCW	203	0,214		195	0,185		193	0,180			
	P		0,23768		0,71503			0,66467				
77	MCB	92	0,467	94	0,486							
	MCW	626	0,259	600	0,312							
	P		0,00002		0,00133							
85	MCB	92	1,390	91	0,705							
	MCW	643	0,434	628	0,503							
	P		$8,4 \times 10^{-18}$		0,01215							
98	MCB	74	0,149	78	0,361		78	0,188				
	MCW	300	0,086	316	0,108		316	0,092				
	P		0,00063		$2,9 \times 10^{-14}$			$8,0 \times 10^{-6}$				
108	MCB			45	1,034	46	0,456	47	0,217	50	0,544	50
	MCW			163	0,203	160	0,216	159	0,246	168	0,230	175
	P				$7,6 \times 10^{-15}$		0,00036		$1,4 \times 10^{-6}$		0,58025	0,00024
												0,12234

HO	Homocigosis	MCB	Media de cuadrados entre líneas
HE	Heterocigosis con cromosomas II del control C2F	MCW	Media de cuadrados dentro de líneas
PMX	Pannixia	p	p-valor
		gl	Grados de libertad

**Tabla 4.** Componente entre-líneas de la varianza, junto con su error típico, calculado a partir de los análisis de varianza.

Gen	AM2			C2			C2F			C1		
	HO	HE		HO	PMX		HO	PMX		HO	PMX	
41	0,017 ± 0,007 ***	0,008 ± 0,005 *										
46	0,009 ± 0,013 (NS)			- 0,006 ± 0,010 (NS)						- 0,004 ± 0,010 (NS)		
77	0,027 ± 0,009 ***	0,024 ± 0,010 **										
85	0,121 ± 0,026 ***	0,026 ± 0,014 *										
98	0,013 ± 0,005 ***			0,051 ± 0,012 ***			0,019 ± 0,006 ***					
108				0,183 ± 0,048 ***	0,099 ± 0,022 ***		0,100 ± 0,033 ***	- 0,003 ± 0,011 (NS)		0,061 ± 0,024 ***		0,013 ± 0,013 (NS)

HO	Homocigosis	NS	p > 0,05
HE	Heterocigosis con cromosomas II del control C2F	*	p < 0,05
PMX	Pannixia	**	p < 0,01
		***	p < 0,001

A modo de resumen, en la *Tabla 5* aparecen los valores medios y el componente entre-líneas de la varianza para la viabilidad de los cromosomas II cuasinormales de las líneas AM2 en homocigosis y de la correspondiente evaluación sincrónica del control C2, en homocigosis o en panmixia, en las generaciones 46 y 98.

**Tabla 5.** Valor medio ( $\bar{V}^*$  o  $\bar{V}$ ) y componente entre-líneas de la varianza ( $\sigma_b^2$ ) en las generaciones 46 y 98, junto con su correspondiente error típico, de la viabilidad del cromosoma II de las líneas AM2 (en homocigosis) y del control C2 (en homocigosis o en panmixia).

		AM2	C2	C2
	Generación	HOMOCIGOSIS	HOMOCIGOSIS	PANMIXIA
$\bar{V}^*$	46	-0,278 ± 0,023 *		-0,120 ± 0,021
$\sigma_b^2$		0,009 ± 0,013 (NS)		-0,006 ± 0,010 (NS)
N		102		99
$\bar{V}$	98	0,214 ± 0,019 *	0,113 ± 0,029	
$\sigma_b^2$		0,013 ± 0,005 **	0,050 ± 0,012 **	
N		75	79	

\* Media de las líneas AM2 significativamente diferente de la media del C2 evaluado sincrónicamente (p < 0.005)

\*\*  $\sigma_b^2$  significativamente mayor que cero (p < 0.001)

NS  $\sigma_b^2$  no significativamente mayor que cero (p > 0.05)

Lo primero que debemos tener en cuenta es que tanto el carácter evaluado como la cepa marcadora empleada fueron diferentes en cada generación. Estas diferencias nos impiden establecer comparaciones directas entre evaluaciones llevadas a cabo en distinta generación. Lo que sí podemos comparar son las diferencias entre la viabilidad de los cromosomas de las líneas AM2 en homocigosis y la correspondiente evaluación sincrónica del control C2 en cada generación.

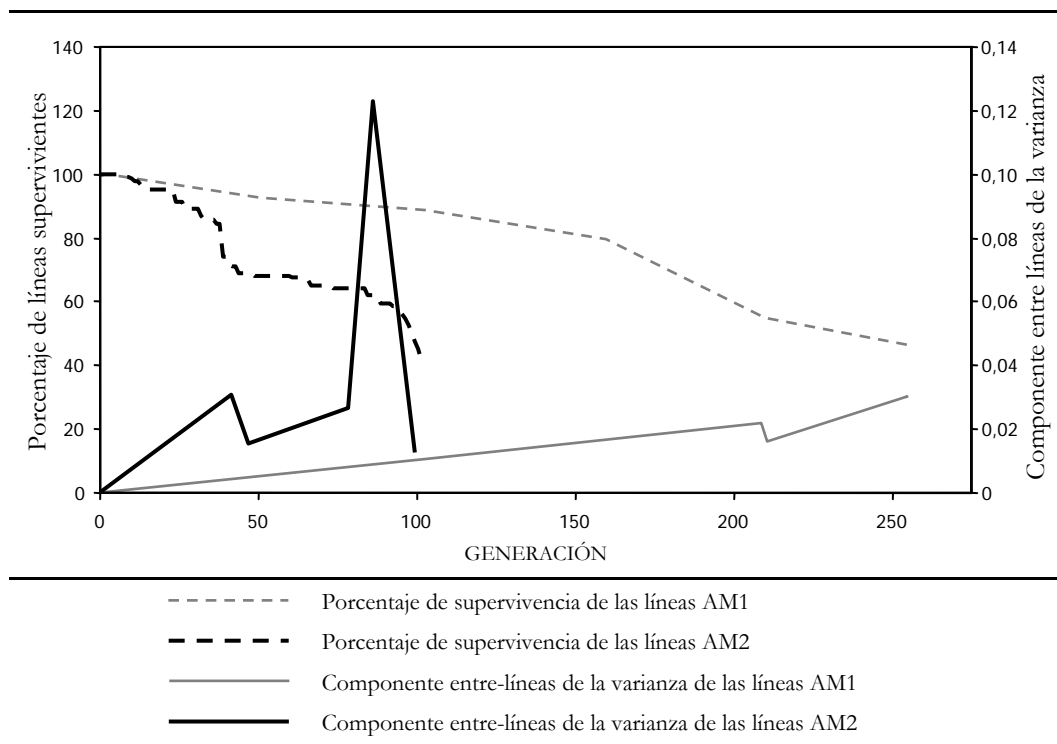
En la generación 46, la viabilidad de los cromosomas AM2 en homocigosis fue significativamente menor que la de los cromosomas C2 en panmixia. Sin embargo, en la generación 98 la viabilidad en homocigosis de los cromosomas de las líneas AM2 fue significativamente mayor que la de los cromosomas del control C2. Estos resultados sugieren que en las líneas AM2 las mutaciones con un efecto deletéreo grande se han purgado, pero en una población de censo elevado como el control C2, y debido a su acción génica presumiblemente recesiva, algunas de estas mutaciones siguen segregando a baja frecuencia. Como consecuencia, observamos una depresión consanguínea importante cuando evaluamos la población control C2 en homocigosis, pero cuando se evalúa en panmixia, el declive en viabilidad es imperceptible.

En cuanto a la estima del componente entre líneas de la varianza, podemos ver que para las líneas AM2 en la generación 46 no fue significativamente mayor que cero, pero sí lo fue en la generación 98.

La *Figura 5* representa la evolución del componente entre-líneas de la varianza para la viabilidad de los cromosomas de las líneas AM2 en homocigosis y del porcentaje de supervivencia de las líneas AM2. Para poder establecer comparaciones también aparecen los valores correspondientes a las líneas AM1 (GARCÍA-DORADO *et al.* 2000; CHAVARRÍAS *et al.* 2001). Los valores de varianza entre-líneas de la viabilidad relativa huevo-adulto se ajustaron para el cromosoma II dividiendo por 2,5 y los componentes de la varianza para  $\mathcal{V}^*$  (generaciones 41 y 46) se convirtieron a  $\mathcal{V}$  multiplicando por un factor de escala de 1,75 (CHAVARRÍAS *et al.* 2001). En esta figura no se pretende establecer comparaciones punto por punto entre los dos conjuntos de líneas AM o entre generaciones del mismo grupo de líneas AM. Sin embargo, sí podemos apreciar que la varianza entre líneas del conjunto de líneas AM2 fue mayor y tuvo un comportamiento más errático que el de las líneas AM1 (los

errores típicos de los valores de la varianza entre-líneas en la *Figura 5* son 0,0008, 0,0032, 0,0134 y 0,0124 en las generaciones 105, 208, 210 y 255 de líneas AM1 y 0,0117, 0,0234, 0,0111, 0,0261 y 0,0051 en las generaciones 41, 46, 77, 85 y 98 de las líneas AM2).

**Figura 5.** Evolución del porcentaje de supervivencia y de la estima del componente entre líneas de la varianza para las líneas AM1 y AM2.



La reducción final del componente entre-líneas de la varianza que observamos en las líneas AM2 no podemos atribuirla a la extinción de aquellas líneas con una menor viabilidad pues el valor de la varianza entre-líneas en la generación 85 para el subgrupo de líneas que sobrevivieron hasta la generación 98 ( $0,1208 \pm 0,0261$ ) fue similar al estimado usando todas las líneas ( $0,1313 \pm 0,0306$ ).

La *Figura 5* también muestra que, tras un corto período inicial, la tasa de extinción de líneas fue mucho mayor en las líneas AM2 que en las AM1, mostrando una aceleración progresiva en el conjunto de líneas AM2.

### 3.2. ESTIMAS DE LOS PARÁMETROS MUTACIONALES PARA LA VIABILIDAD DEL CROMOSOMA II

La *Tabla 6* recoge los parámetros mutacionales para la viabilidad del cromosoma II evaluada por referencia al genotipo  $Cy/+$  ( $V^*$ ), que se obtuvieron a partir de los datos de la generación 46, junto a los que se obtuvieron para las líneas AM1 en la generación 255 (CHAVARRÍAS *et al.* 2001).

**Tabla 6.** *Estimas Bateman-Mukai de los parámetros mutacionales para la viabilidad del cromosoma II ( $V^*$ )*

	AM1 (Gen 255)	AM2 (Gen 46)
$\Delta M_{II} (\times 10^{-3})$	0,140 $\pm$ 0,023	0,344 $\pm$ 0,034
$\Delta V_{II} (\times 10^{-3})$	0,087 $\pm$ 0,027	0,197 $\pm$ 0,292
$\lambda_{II} \geq$	0,023 $\pm$ 0,011	0,058 $\pm$ 0,072
$E(s) \leq$	0,062 $\pm$ 0,023	0,057 $\pm$ 0,084

$\Delta M_{II}$	Tasa de declive en media (por cromosoma II y generación)
$\Delta V_{II}$	Tasa de incremento en varianza (por cromosoma II y generación)
$\lambda_{II}$	Tasa de mutación (por cromosoma II y generación)
$E(s)$	Efecto promedio de las mutaciones en homocigosis

Las estimas de las tasas de declive en viabilidad media y del incremento en la varianza entre-líneas por generación calculadas para las líneas AM2 en la generación 46 fueron aproximadamente 2,5 veces superiores a las calculadas para las líneas AM1 en la generación 255. La estima obtenida para la tasa de mutación también fue 2,5 veces mayor en las líneas AM2 que en las líneas AM1. El aumento en la tasa de incremento en varianza no fue significativo, de modo que el aumento en la tasa de mutación tampoco es significativo, pero el aumento en la tasa de declive en viabilidad media fue altamente significativo.



Para la generación 41 se pueden calcular estas mismas estimas utilizando como control interno, según el método de clasificación, las 3 líneas que mostraron una viabilidad mayor en la generación 46. Los valores obtenidos aparecen en la *Tabla 7* junto con las estimas MD y ML.

**Tabla 7.** *Parámetros mutacionales para la viabilidad del cromosoma II estimados por distintos métodos.*

Método de estimación	$\lambda_{II}$	$E(s)$
BM (control interno)	0,006	0,290
BM (control C2)	0,058	0,057
MD (CC)	0,111	0,034
MD (DC)	0,098	0,039
ML	0,036	0,092

BM – Bateman-Mukai; MD – Mínima Distancia; ML – Máxima Verosimilitud;

MD-CC ( $m_{0t}$  estimada considerando el control) Se explora un entorno de 2 errores típicos alrededor de la estima de  $m_{0t}$  proporcionada por el control; MD-DC ( $m_{0t}$  determinada por el control) Se asume que  $m_{0t}$  es la media observada en el control.

La tasa de declive en viabilidad media que se obtiene en la generación 41 con el método del control interno es la mitad que la estimada en la generación 46 usando el control C2. Como consecuencia, la tasa de mutación es un orden de magnitud inferior a la correspondiente estima de la generación 46 y el efecto mutacional mucho mayor. La menor estima obtenida de  $\Delta M_{II}$  ( $0,0017 \pm 0,0031$ ) usando el método del control interno podría atribuirse a que el declive mutacional de las líneas que constituyen este control es mayor que en el control C2 panmítico, motivo por el cual, en lo sucesivo, omitiremos estos resultados.

Cuando se ignora la información sobre la tasa de declive en media que proporciona el control C2 en el análisis de MD (MD-CI), el perfil de distancias no muestra un mínimo y, por lo tanto, no se pueden obtener las estimas MD.

Si usamos la información del control C2 para estimar la tasa de declive en media (MD-CC y MD-DC), los correspondientes perfiles de MD y ML son bastante planos. El mínimo de la distancia no es significativo, y en el caso de ML el límite de confianza para  $\lambda_{II}$  tiende a infinito. Aun así, estos métodos proporcionan estimas relativamente parecidas:  $0,04 \leq \lambda_{II} \leq 0,11$  y  $0,03 \leq E(s) \leq 0,09$ .

En la *Tabla 8* aparecen las estimas del grado de dominancia obtenidas mediante regresión para las mutaciones deletéreas acumuladas en las líneas AM2 calculadas a partir de los datos de las generaciones 41, 77 y 85.

**Tabla 8.** *Estimas del grado de dominancia para las mutaciones con efecto sobre viabilidad acumuladas en el cromosoma II.*

Generación	$E(h_{ws^2}) \pm \text{E.T.}$
41	-0,05 $\pm$ 0,16 (NS)
77-85 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,08 **
77-85 <sup>b</sup>	0,39 $\pm$ 0,18 *

<sup>a</sup> Promedio de las estimas obtenidas para las generaciones 77 y 85.  
<sup>b</sup> Estima calculada usando como viabilidad de los homocigotos y los heterocigotos el promedio de las dos generaciones.  
NS No significativamente diferente de cero.  
\* significativamente diferente de cero ( $p < 0,013$ ).  
\*\* significativamente diferente de cero ( $p < 0,0017$ ).

En principio, estas estimas no deberían verse afectadas por el efecto epigenético provocado por la baja temperatura en la viabilidad de los cromosomas del C2F, puesto que dicho efecto no contribuye a la varianza genética de los homocigotos AM2 ni a la covarianza entre los homocigotos AM2 y los heterocigotos AM2-C2F.

En la generación 41 el grado de dominancia no fue significativamente distinto de cero, pero, en las generaciones 77-85 fue relativamente alto.

Merece la pena destacar que el promedio de las estimas calculadas de forma independiente para las generaciones 77 y 85 fue sustancialmente menor que la estima obtenida usando las viabilidades promediadas por generación. Esta diferencia podría atribuirse al comportamiento errático de la varianza genética de los homocigotos AM2 el cual podría asociarse a una considerable variación de los efectos mutacionales atribuibles a diferencias ambientales entre las generaciones.

### 3.3. TASA DE DEPRESIÓN CONSANGUÍNEA PARA VIABILIDAD EN LAS POBLACIONES CONTROL

La *Tabla 9* muestra la viabilidad de los cromosomas no letales del control C1 en la generación 374 y del C2 en la generación 108 en homocigosis y panmixia, evaluadas simultáneamente, junto con los datos de una evaluación anterior del control C1 en la generación 250 (CHAVARRÍAS *et al.* 2001). También aparecen en la tabla las depresiones consanguíneas que mostraron estas poblaciones en las generaciones evaluadas.

**Tabla 9.** Viabilidad media de los cromosomas II no letales de los controles C1 y C2 en homocigosis y en panmixia, y la depresión consanguínea ( $\bar{\delta}_{II}$ ) que mostraron estas poblaciones en las generaciones evaluadas.

	C1 (Gen 250)	C1 (Gen 374)	C2 (Gen 108)
HOMOCIGOSIS	0,373 ± 0,025	0,347 ± 0,060	0,085 ± 0,081
PANMIXIA	0,458 ± 0,028	0,438 ± 0,038	0,366 ± 0,041
$\bar{\delta}_{II}$	0,090 ± 0,037	0,091 ± 0,060	0,281 ± 0,077

Los valores que aparecen en la *Tabla 9* se refieren a cromosomas II no letales. De los cromosomas C1 y C2 evaluados simultáneamente en las generaciones

---

374 y 108, respectivamente, resultaron ser letales tres cromosomas del control C1 (5,5%) y nueve del control C2 (16,1%).

No se pueden establecer comparaciones directas entre las viabilidades medias de C1 en la generación 250 y el resto de evaluaciones puesto que la cepa de referencia empleada fue diferente. Lo que sí podemos comparar son los valores obtenidos para la depresión consanguínea. Como vemos, la depresión consanguínea del control C1 es muy similar en las dos generaciones evaluadas mientras que el control C2 muestra una depresión consanguínea aproximadamente 3 veces superior a la del control C1 en cualquiera de sus evaluaciones. Esta diferencia es significativa en ambos casos ( $p < 0,012$  y  $p < 0,027$ , en las respectivas pruebas  $t$ )

## **DISCUSIÓN**

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. AUMENTO DE LA TASA DE MUTACIÓN EN LAS LÍNEAS AM2

Hemos analizado las propiedades mutacionales de la viabilidad del cromosoma II de *D. melanogaster* en un experimento de acumulación de mutaciones (AM2) constituido por 150 líneas hermano por hermana y un control (C2), derivados de una misma línea de un experimento similar previo (AM1) tras 265 generaciones de acumulación de mutaciones (CHAVARRÍAS *et al.* 2001). En dicho experimento previo, la viabilidad del cromosoma II se calculó por referencia al genotipo  $Cy/L^2$  (medida denominada  $\mathcal{V}$ , véase *Material y métodos* página 57), y los valores de sus tasas de declive y mutación en la generación 255 AM1 ( $\Delta M = 0,0038$  y  $\lambda \geq 0,044$ , ajustadas para el genoma haploide) fueron aproximadamente el doble de los obtenidos entre las generaciones 104-106, aunque los efectos deletéreos promedio de las mutaciones implicadas fueron notablemente similares en ambos momentos ( $E(s) = 0,087$  y  $0,085$ , respectivamente) (GARCÍA-DORADO 1997). Si tenemos en cuenta que en la generación 255 la viabilidad se evaluó en condiciones más competitivas que en las generaciones 104-106, el resultado anterior podría indicar que la tasa de mutación para viabilidad aumenta a medida que lo hace el grado de competición larvaria. Sin embargo, esta suposición no concuerda con las observaciones de FRY y HEINSOHN (2002), que no encontraron diferencias entre las tasas de declive en viabilidad correspondientes a distintas densidades de cultivo y, además, solamente detectaron un aumento de la tasa de mutación cuando la densidad era baja. Como hipótesis alternativa cabe proponer una aceleración de la tasa de mutación deletérea entre las generaciones 105 y 255 aunque, en todo caso, dicha aceleración sólo podría haberse producido a partir de la generación 211, puesto que tanto la tasa de declive en media como la de incremento en varianza para viabilidad no competitiva en las generaciones

208-210 fueron comparables a las estimadas en las generaciones 104-106 (GARCÍA-DORADO y CABALLERO 2000; CABALLERO *et al.* 2002). En todo caso, los distintos resultados obtenidos en el experimento AM1 encajan dentro de lo previamente observado en poblaciones segregantes de *Drosophila*, es decir, la tasa de mutación deletérea estuvo comprendida entre 0,005 y 0,05, con un efecto promedio  $E(s) \sim 0,10$  (GARCÍA-DORADO *et al.* 2004).

Las comparaciones entre los resultados del primer experimento (AM1) y los del actual (AM2) requieren que la viabilidad haya sido evaluada de la misma manera en ambas situaciones. En el experimento previo se observó que la varianza entre líneas para la viabilidad  $\mathcal{V}^*$  de los cromosomas AM1 en homocigosis  $l_i/l_i$  (que es una medida relativa a los heterocigotos  $Cy/l_i$ , donde  $l_i$  representa el cromosoma evaluado e implica por tanto la suposición de que las mutaciones son recesivas frente al cromosoma  $Cy$ ) infraestimaba la varianza entre líneas para la correspondiente viabilidad medida como  $\mathcal{V}$  (libre de estas suposiciones por ser relativa a la del genotipo  $Cy/L^2$ ) (CHAVARRÍAS *et al.* 2001). Así, la tasa de mutación deletérea haploide ( $\lambda \geq 0,058$ ) y el efecto deletéreo promedio ( $E(s) \leq 0,062$ ) para  $\mathcal{V}^*$  podrían sobreestimar y subestimar, respectivamente, la tasa y el efecto deletéreo medio en homocigosis para la auténtica viabilidad del cromosoma II. No obstante, dichos resultados para  $\mathcal{V}^*$  son los que pueden compararse válidamente con los del experimento actual en la generación 46 en que se utilizó la misma evaluación de viabilidad. Este contraste puso de manifiesto que las tasas de declive en media e incremento en varianza de las líneas AM2 eran, aproximadamente, unas 2,5 veces mayores que las calculadas para las líneas AM1 durante el periodo final del experimento previo y, por lo tanto, la estima de la tasa de mutación también se ve incrementada en la misma magnitud mientras que, una vez más, el efecto promedio de las mutaciones deletéreas permaneció prácticamente

invariable. Aunque la tasa de declive en viabilidad de las líneas AM2 fue significativamente mayor que la de las AM1 ( $p < 4 \times 10^{-7}$ ), los errores típicos de la tasa de incremento en varianza fueron grandes y, por consiguiente, también lo fueron los de las estimas de la tasa de mutación y del efecto promedio en homocigosis. Por esta razón, el incremento significativo de la tasa de declive en viabilidad podría también atribuirse a una sinergia de los efectos deletéreos de las nuevas mutaciones en un fondo genético deteriorado por la acumulación de éstas. Sin embargo, la varianza genética aditiva del número de quetas (GARCÍA-DORADO *et al.* 2007) y la tasa de depresión consanguínea para viabilidad en el control C2 aumentaron con respecto a las del control C1 en la misma proporción en que lo hizo la tasa de declive de las líneas AM1 con respecto a la de las AM2. Estas observaciones proporcionan un apoyo adicional a la hipótesis de que la tasa de mutación ha aumentado en una fase temprana del segundo experimento, quizás incluso en la línea AM1 utilizada como fundadora de la población base de éste. Por último, la proporción de líneas supervivientes cayó dramáticamente hacia el final del experimento AM2, sugiriendo tanto un posterior incremento de la tasa de mutación deletérea como una epistasia sinérgica limitada a aquellos genomas que ya fueran homocigotos para otras mutaciones deletéreas severas. Resumiendo, nuestros resultados indican que la tasa de mutación deletérea se ha incrementado en la fase inicial del experimento AM2, lo cual es compatible con la aparición de un efecto sinérgico de las mutaciones durante las últimas fases de este experimento.

Es posible que en otros experimentos se haya producido también una aceleración del proceso mutacional, y existen indicios de que este fenómeno podría haber ocurrido en sus fases tempranas en algunos casos, induciendo así la sobreestima de la tasa inicial de mutación espontánea en la población original. En el primer experimento AM de MUKAI (1964), la estima de  $\Delta M$



durante las primeras 25 generaciones de acumulación ajustada al genoma completo fue  $\sim 0,01$  (0,007 usando datos de las 32 primeras generaciones, FRY 2004). Sin embargo, esta estima se había obtenido utilizando como control un conjunto de líneas elegidas según el método de clasificación y forzando por el origen la regresión del declive en media sobre el número de la generación, en la suposición de que dichas líneas eran originalmente idénticas a las demás líneas del experimento. Sin embargo existen evidencias de que esta suposición es infundada, de modo que un análisis sin forzar la regresión por el origen sugiere un declive inicial mucho menor ( $\Delta M \approx 0,003$ ), pero que se acelera en la fase temprana (GARCÍA-DORADO y CABALLERO 2002). Usando un método indirecto FRY (2004) detectó también cierta aceleración en el experimento de OHNISHI (1977a), aunque este dato es difícil de compatibilizar con un aumento de la varianza entre líneas que fue lineal durante todo el proceso. Queda por dilucidar si la aceleración del deterioro mutacional, cuando ocurre, se debe a un aumento de la tasa de mutación deletérea, a un incremento de los efectos deletéreos de las mutaciones acumuladas que sería atribuible a sinergia, o a la combinación de ambas causas. En nuestro caso, las estimas sugieren que la aceleración se debe inicialmente a un aumento de la tasa mutacional, y que la sinergia sólo aparece en las últimas fases del experimento, caracterizadas por un aumento drástico de la tasa de extinción de líneas tras un proceso prolongado de degradación mutacional. Esta observación es consistente con las de otros experimentos en que la sinergia de los efectos deletéreos sólo se manifestó en genomas con una carga deletérea importante (WHITLOCK y BOURGUET 2000; RIVERO *et al.* 2003; ROSA *et al.* 2005).

## 4.2. POBLACIONES CONTROL

Analicemos seguidamente la acumulación de nueva variabilidad genética en dos poblaciones control de censo elevado (C1 y C2). Aunque el control C1 ha

sido mantenido en ocho botellas hasta la generación 200 y en 25 a partir de entonces, su tasa de depresión consanguínea en las generaciones 250 y 374 fue la misma, lo que implicaría que, después de haber sido mantenida en 25 botellas durante 50 generaciones, esa población prácticamente ha alcanzado el equilibrio mutación-selección-deriva con respecto a las mutaciones responsables de la depresión consanguínea observada para el cromosoma II, cuya magnitud fue del orden de un 30% del promedio de las estimas publicadas referentes a poblaciones segregantes (TEMIN *et al.* 1969; MUKAI y YAMAGUCHI 1974; SEAGER y AYALA 1982; MUKAI y NAGANO 1983; KUSAKABE y MUKAI 1984; KUSAKABE *et al.* 2000). El control C2 se mantuvo siempre en 25 botellas por lo que se espera que, tras 108 generaciones, también haya alcanzado el equilibrio mutación-selección-deriva. En ese momento, su tasa de depresión consanguínea era tres veces mayor que la detectada en el control C1, lo que concuerda con el factor de aumento de 2,5 observado para la tasa de declive en viabilidad de las líneas AM2. Por otra parte, la reducida viabilidad en homocigosis de los cromosomas de C2 obtenida en la generación 98, que es inferior a la viabilidad en homocigosis correspondiente a las líneas AM2, sugieren que la tasa de depresión consanguínea de la población C2 se debe fundamentalmente a mutaciones mayormente recesivas con efectos deletéreos grandes, que pueden segregarse a frecuencias bajas en poblaciones de censo elevado (como el control) pero que son purgadas eficientemente por selección natural en las líneas AM2. Por lo tanto, la tasa de depresión consanguínea en la población control C2 parece deberse, al menos en parte, a mutaciones distintas de las responsables de la tasa de declive en viabilidad de las líneas AM2, y el hecho de que ambas tasas hayan aumentado por un factor similar sugiere una causa común, siendo más probable que se trate de un aumento general de la tasa de mutación espontánea que de la aparición de una sinergia entre los efectos de las mutaciones implicadas.

En la última evaluación simultánea de la viabilidad de los controles (generación 108 de C2), la media de los genotipos panmícticos C2 fue inferior a la de los C1. Esto podría atribuirse en parte a un declive en viabilidad experimentado por la línea AM1 85 en el momento en el que fue usada como población base de la que se derivó el control C2. Sin embargo, debemos tener en cuenta que esta línea se eligió por su alta viabilidad, de manera que podría considerarse como un ‘control clasificado’. Por esta razón, ignorando la posibilidad de un declive en viabilidad de la línea AM1 85, así como la posibilidad de acumulación de mutaciones beneficiosas en C1, podemos interpretar que la baja viabilidad en panmixia de los cromosomas C2 se debe al mayor declive en viabilidad experimentado por este control. Sin embargo, en una población de este tipo, cuyo censo es relativamente grande, la tasa de declive en viabilidad debida a fijación debería ser despreciable incluso en el equilibrio (GARCÍA-DORADO 2003). Por lo tanto, el mayor declive en viabilidad debería atribuirse fundamentalmente a un mayor lastre debido las mutaciones que segregan en el equilibrio mutación-selección-deriva y, por ello, es de esperar que la diferencia en viabilidad entre los controles C1 y C2 estime la diferencia entre los correspondientes lastres mutacionales. Puesto que el lastre mutacional en el equilibrio para poblaciones con censos efectivos mayores que 100 es muy semejante al correspondiente a poblaciones infinitas (GARCÍA-DORADO 2003), que es igual a la tasa cigótica de mutaciones deletéreas que no sean completamente recesivas, la diferencia en  $\lambda_{II}$  entre los grupos de líneas AM asociados a ambos controles ( $0,058 - 0,023 = 0,035$ ) debería ser aproximadamente igual a la mitad de la diferencia entre las viabilidades en panmixia de los respectivos cromosomas II, tal como reflejan los datos pertinentes ( $(0,438 - 0,366)/2 = 0,036$ ).

Aunque las causas del incremento de la tasa de mutación detectado en nuestro experimento se desconocen, es posible que éste pueda deberse a un aumento

paralelo de la tasa de transposición. En el experimento previo (AM1), la tasa de transposición por copia de elemento y generación fue  $\sim 10^{-4}$ , en excelente acuerdo con otros datos obtenidos en fondos genéticos diferentes (MASIDE *et al.* 2001). Sin embargo, como se ha documentado para el elemento *copia*, se espera que la tasa de transposición esté correlacionada positivamente con el número de elementos insertados (PASYUKOVA *et al.* 1998), lo cual puede resultar en cierta aceleración del proceso después de un periodo largo de acumulación de mutaciones. La forma de la distribución de los efectos deletéreos de las nuevas transposiciones también se ignora. A partir del coeficiente de regresión de la eficacia sobre el número de elementos *copia* en líneas AM de *Drosophila*, HOULE y NUZHIDIN (2004) obtuvieron un efecto deletéreo promedio de 0,0076 por nuevo elemento *copia*, pero esta estima es compatible con diversas distribuciones como, por ejemplo, con que el 90% de las inserciones ocurran en el ADN no funcional (con efectos deletéreos tan pequeños que sean experimentalmente indetectables) mientras que el 10% restante tengan unos efectos deletéreos que sigan la distribución estimada en el experimento AM1. En otras palabras, las distintas estimas publicadas de las tasas de mutación y efectos promedio pueden ser explicadas mediante diferentes tasas de transposición dependiendo de cual sea la forma de la distribución de efectos. No obstante, las estimas obtenidas a partir de datos relativos a los periodos iniciales de los experimentos AM muestran una mayor consistencia, lo que indicaría unas tasas de mutación bajas del orden de 0,02 por gameto y generación y un efecto promedio de aproximadamente 0,1 cuando se obtienen a partir de líneas consanguíneas AM (hermano por hermana), o efectos algo mayores cuando los datos proceden de cromosomas AM protegidos de la selección natural por ser mantenidos en heterocigosis. Esto concuerda con la hipótesis de que la selección regula tanto el número medio de copias transponibles en el genoma como la tasa de transposición total en las poblaciones naturales (MASIDE *et al.* 2001).

### 4.3. GRADO DE DOMINANCIA DE LAS MUTACIONES

El coeficiente de regresión  $b$  de los valores genotípicos de los heterocigotos sobre los de los homocigotos estima  $E(b_{ms^2})$ , esto es, el grado de dominancia promedio de las nuevas mutaciones deletéreas ponderado por sus efectos cuadráticos en homocigosis. Nuestras estimas de  $b$  fueron bastante heterogéneas: las obtenidas en las generaciones 77 y 85 no difirieron significativamente entre sí, pero su valor promedio (0,234) fue significativamente mayor que el obtenido en la generación 41 (-0,046). Una posible explicación de esta discrepancia sería que se hubiera producido un aumento temporal de  $E(b_{ms^2})$ . No obstante hemos de tener en cuenta que, debido a la ponderación por  $s^2$ , el valor de  $E(b_{ms^2})$  está determinado fundamentalmente por los valores de  $b$  correspondientes a las mutaciones cuyo efecto deletéreo en homocigosis es muy grande, los cuales suelen ser muy pequeños. Esto implicaría que  $E(b_{ms^2})$  podría ser muy inferior al grado de dominancia promedio no ponderado  $E(b)$ . Sin embargo, en líneas consanguíneas AM la selección natural actúa fundamentalmente sobre el efecto en homocigosis de las mutaciones, eliminando aquéllas de efecto deletéreo grande que son comúnmente recesivas. Esto causará un incremento en  $E(b_{ms^2})$  que puede llegar a ser importante, dependiendo de la forma de la distribución conjunta de  $s$  y  $b$ . Para un amplio intervalo de valores posibles de estos parámetros, los resultados de simulación muestran que en experimentos AM se pueden esperar estimas de  $b$  próximas a cero si la estima no ponderada de  $b$  es relativamente pequeña ( $E(b) < 0,2$ , FERNÁNDEZ *et al.* 2004, Tabla 6). Por consiguiente, el incremento temporal de  $b$  sugiere que, al final del experimento AM2, la acumulación de mutaciones estuvo acompañada por un incremento de la intensidad de selección purgadora en contra de las mutaciones con efectos deletéreos severos. Esto corrobora las conclusiones de FERNÁNDEZ *et al.* (2004) sobre la posible subestimación de la tasa de

mutación severamente deletérea y fundamentalmente recesiva en experimentos AM, que también puede conducir a predicciones sesgadas a la baja de la tasa de depresión consanguínea de la viabilidad en poblaciones naturales. El incremento de  $b$  podría también atribuirse a una transposición acelerada, tal como sugirieron FRY y NUZHDIN (2003). Estos autores observaron que las mutaciones espontáneas deletéreas con efecto sobre viabilidad eran generalmente recesivas pero que las causadas por inserción de elementos  *copia* mostraban una acción génica aditiva. Sin embargo, la diferencia entre las correspondientes estimas de  $b$  no alcanzó la significación.

Debemos destacar que el grado de dominancia promedio estimado en las generaciones 77 y 85 fue mayor que el promedio de las estimas correspondientes a cada generación. Aunque esta diferencia no fue significativa, los resultados sugieren que, debido a una posible interacción genotipo-medio, los efectos deletéreos promediados sobre generaciones pueden ser menos recesivos que los estimados en una generación determinada. Nótese también que la varianza de la expresión de los efectos deletéreos entre generaciones puede provocar que la utilización de los datos de viabilidad pertenecientes a una generación resulte en una subestimación de la tasa a la que ocurren las mutaciones que, promediando sobre varias generaciones, tienen efecto deletéreo, así como en una sobreestimación de este efecto promedio. Esta posibilidad ha sido señalada por GARCÍA-DORADO (1997) que, sin embargo, obtuvo estimas bajas de la tasa de mutación deletérea sobre generaciones para viabilidad huevo-adulto usando los datos AM1. Nuestros resultados sugieren que, aunque el efecto deletéreo de las mutaciones fuese menor al promediarse sobre generaciones, el grado de dominancia de dicho efecto promedio podría ser mayor que el estimado en una generación, de manera que la selección natural sería aún capaz de eliminarlas con una eficiencia relativamente elevada.

Teniendo en cuenta tanto los nuevos análisis de los datos de los experimentos clásicos como las estimas obtenidas durante la última década (véase revisión por GARCÍA-DORADO *et al.* (2004)), las tasas de mutación deletérea relevantes para la descripción de las propiedades evolutivas de las poblaciones naturales, esto es, las observadas durante los periodos iniciales de los experimentos AM, están comprendidas en un intervalo que va de 0,005 a 0,05, con la excepción de las estimas BM obtenidas por MUKAI *et al.* (1972). En el experimento previo (AM1), las mutaciones deletéreas surgían a una tasa que también está incluida en ese intervalo ( $\lambda \approx 0,02$  para viabilidad huevo-adulto durante las primeras 100 generaciones con un efecto promedio de  $E(s) \approx 0,10$ ;  $\lambda \approx 0,04$  para viabilidad competitiva durante las primeras 250 generaciones con un efecto promedio de  $E(s) \approx 0,08$ ). Sin embargo, la tasa de mutación con efecto sobre caracteres morfológicos o componentes de eficacia fue 2,5 veces mayor en el experimento actual (AM2). En las últimas generaciones de este experimento se produjo el colapso mutacional de las líneas AM2 (hermano por hermana), pero la eficacia biológica de la población control C2, cuyo censo era relativamente grande, sólo sufrió un deterioro menor. En conclusión, nuestros resultados indican que la tasa de mutación deletérea puede aumentar tras una degradación mutacional importante, mientras que la sinergia de los efectos mutacionales deletéreos sólo puede llegar a ser una causa de extinción importante en líneas de censo muy pequeño una vez que hayan acumulado un lastre mutacional considerable, pero no en poblaciones de censo moderado.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 5. BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSSON, D. I. y D. HUGHES, 1996. *Muller's ratchet decreases fitness of a DNA-based microbe*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 906-907.
- ÁVILA, V. y A. GARCÍA-DORADO, 2002. *The effects of spontaneous mutation on competitive fitness in Drosophila melanogaster*. Journal of Evolutionary Biology **15**: 561-566.
- BAER, C. F., N. PHILLIPS, D. OSTROW, A. AVALOS, D. BLANTON, A. BOGGS, T. KELLER, L. LEVY *et al.*, 2006. *Cumulative effects of spontaneous mutations for fitness in caenorhabditis: Role of genotype, environment and stress*. Genetics **174**: 1387-1395.
- BAER, C. F., F. SHAW, C. STEDING, M. BAUMGARTNER, A. HAWKINS, A. HOUPPERT, N. MASON, M. REED *et al.*, 2005. *Comparative evolutionary genetics of spontaneous mutations affecting fitness in rhabditid nematodes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**: 5785-5790.
- BATEMAN, A. J., 1959. *The Viability of near-Normal Irradiated Chromosomes*. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics Chemistry and Medicine **1**: 170-180.
- CABALLERO, A., E. CUSI, C. GARCÍA y A. GARCÍA-DORADO, 2002. *Accumulation of deleterious mutations: additional Drosophila melanogaster estimates and a simulation of the effects of selection*. Evolution **56**: 1150-1159.
- 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 Mutations in Drosophila-Melanogaster*. Genetics **128**: 89-102.
- CHARLESWORTH, B., 1993. *Evolutionary mechanisms of senescence*. Genetica (Dordrecht) **91**: 11-19.
- CHARLESWORTH, B., H. BORTHWICK, C. BARTOLOME y P. PIGNATELLI, 2004. *Estimates of the genomic mutation rate for detrimental alleles in Drosophila melanogaster*. Genetics **167**: 815-826.
- CHAVARRÍAS, D., C. LÓPEZ-FANJUL y A. GARCÍA-DORADO, 2001. *The rate of mutation and the homozygous and heterozygous mutational effects for competitive*

- viability: A long-term experiment with Drosophila melanogaster*. Genetics **158**: 681-693.
- DENG, H.-W., 1998. *Characterization of deleterious mutations in outcrossing populations*. Genetics **150**: 945-956.
- DENG, H.-W. y M. LYNCH, 1996. *Estimation of deleterious-mutation parameters in natural populations*. Genetics **144**: 349-360.
- DENG, H. W., J. LI, M. E. PFRENDER, J. L. LI y H. Y. DENG, 2006. *Upper limit of the rate and per generation effects of deleterious genomic mutations*. Genetical Research **88**: 57-65.
- DOWNIE, D. A., 2003. *Effects of short-term spontaneous mutation accumulation for life history traits in grape phylloxera, Daktulosphaira vitifoliae*. Genetica **119**: 237-251.
- DRAKE, J. W., 1991. *A constant rate of spontaneous mutation in dna-based microbes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**: 7160-7164.
- DRAKE, J. W., B. CHARLESWORTH, D. CHARLESWORTH y J. F. CROW, 1998. *Rates of spontaneous mutation*. Genetics **148**: 1667-1686.
- FELSENSTEIN, J., 1974. *The evolutionary advantage of recombination*. Genetics **78**: 737-756.
- FERNÁNDEZ, B., A. GARCÍA-DORADO y A. CABALLERO, 2004. *Analysis of the estimators of the average coefficient of dominance of deleterious mutations*. Genetics **168**: 1053-1069.
- FERNÁNDEZ, J. y C. LÓPEZ-FANJUL, 1996. *Spontaneous mutational variances and covariances for fitness-related traits in Drosophila melanogaster*. Genetics **143**: 829-837.
- FRY, J. D., 2004. *On the rate and linearity of viability declines in Drosophila mutation-accumulation experiments: genomic mutation rates and synergistic epistasis revisited*. Genetics **166**: 797-806.
- FRY, J. D. y S. L. HEINSOHN, 2002. *Environment dependence of mutational parameters for viability in Drosophila melanogaster*. Genetics **161**: 1155-1167.
- FRY, J. D., P. D. KEIGHTLEY, S. L. HEINSOHN y S. V. NUZHIDIN, 1999. *New estimates of the rates and effects of mildly deleterious mutation in Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 574-579.
- FRY, J. D. y S. V. NUZHIDIN, 2003. *Dominance of mutations affecting viability in Drosophila melanogaster*. Genetics **163**: 1357-1364.
- GARCÍA-DORADO, A., 1997. *The rate and effects distribution of viability mutation in Drosophila: Minimum distance estimation*. Evolution **51**: 1130-1139.

- GARCÍA-DORADO, A., 2003. *Tolerant versus sensitive genomes: The impact of deleterious mutation on fitness and conservation*. *Conservation Genetics* **4**: 311-324.
- GARCÍA-DORADO, A., V. ÁVILA, E. SÁNCHEZ-MOLANO, A. MANRIQUE y C. LÓPEZ-FANJUL, 2007. *The build up of mutation-selection-drift balance in laboratory Drosophila populations*. *Evolution* **61**: 653-665.
- GARCÍA-DORADO, A. y A. CABALLERO, 2000. *On the average coefficient of dominance of deleterious spontaneous mutations*. *Genetics* **155**: 1991-2001.
- GARCÍA-DORADO, A. y A. CABALLERO, 2002. *The mutational rate of Drosophila viability decline: Tinkering with old data*. *Genetical Research* **80**: 99-105.
- GARCÍA-DORADO, A., J. FERNÁNDEZ y C. LÓPEZ-FANJUL, 2000. *Temporal uniformity of the spontaneous mutational variance of quantitative traits in Drosophila melanogaster*. *Genetical Research* **75**: 47-51.
- GARCÍA-DORADO, A. y A. GALLEGRO, 2003. *Comparing analysis methods for mutation-accumulation data: A simulation study*. *Genetics* **164**: 807-819.
- GARCÍA-DORADO, A., C. LÓPEZ-FANJUL y A. CABALLERO, 1999. *Properties of spontaneous mutations affecting quantitative traits*. *Genetical Research* **74**: 341-350.
- GARCÍA-DORADO, A., C. LÓPEZ-FANJUL y A. CABALLERO, 2004. Rates and effects of deleterious mutations and their evolutionary consequences, pp. 20-32 in *Evolution: From Molecules to Ecosystems*, edited by A. MOYA y E. FONTDEVILLA. Oxford University Press, Oxford.
- 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 (Dordrecht)* **102-103**: 255-265.
- GONG, Y., R. C. WOODRUFF y J. N. THOMPSON, JR., 2005. *Deleterious genomic mutation rate for viability in Drosophila melanogaster using concomitant sibling controls*. *Biol Lett* **1**: 492-495.
- 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, 1994. *The Genomic Mutation-Rate for Fitness in Drosophila (Vol 359, Pg 58, 1992)*. *Nature* **371**: 358-358.
- HOULE, D., K. A. HUGHES, S. ASSIMACOPOULOS y B. CHARLESWORTH, 1997. *The effects of spontaneous mutation on quantitative traits.2. Dominance of mutations with effects on life-history traits*. *Genetical Research* **70**: 27-34.

- HOULE, D. y S. V. NUZHIDIN, 2004. *Mutation accumulation and the effect of copia insertions in Drosophila melanogaster*. *Genetical Research* **83**: 7-18.
- KEIGHTLEY, P. D., 1994. *The Distribution of Mutation Effects on Viability in Drosophila-Melanogaster*. *Genetics* **138**: 1315-1322.
- KEIGHTLEY, P. D., 1996. *Nature of deleterious mutation load in Drosophila*. *Genetics* **144**: 1993-1999.
- KEIGHTLEY, P. D., 1998. *Inference of genome-wide mutation rates and distributions of mutation effects for fitness traits: A simulation study*. *Genetics* **150**: 1283-1293.
- KEIGHTLEY, P. D. y T. M. BATAILLON, 2000. *Multigeneration maximum-likelihood analysis applied to mutation-accumulation experiments in Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **154**: 1193-1201.
- KEIGHTLEY, P. D. y A. CABALLERO, 1997. *Genomic mutation rates for lifetime reproductive output with lifespan in Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 3823-3827.
- KIBOTA, T. T. y M. LYNCH, 1996. *Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in E. coli*. *Nature* **381**: 694-696.
- KIMURA, M., 1962. *On Probability of Fixation of Mutant Genes in a Population*. *Genetics* **47**: 713-&.
- KONDRASHOV, A. S. y D. HOULE, 1994. *Genotype-environment interactions and the estimation of the genomic mutation rate in Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* **258**: 221-227.
- LÓPEZ, M. A. y C. LÓPEZ-FANJUL, 1993. *Spontaneous mutation for a quantitative trait in Drosophila melanogaster: II distribution of mutant effects on the trait and fitness*. *Genetical Research* **61**: 117-126.
- MARTIN, G. y T. LENORMAND, 2006. *The fitness effect of mutations across environments: A survey in light of fitness landscape models*. *Evolution* **60**: 2413-2427.
- MASIDE, X., C. BARTOLOMÉ, S. ASSIMACOPOULOS y B. CHARLESWORTH, 2001. *Rates of movement and distribution of transposable elements in Drosophila melanogaster: in situ hybridization vs Southern blotting data*. *Genetical Research* **78**: 121-136.
- MUKAI, T., 1964. *Genetic Structure of Natural Populations of Drosophila Melanogaster.1. Spontaneous Mutation Rate of Polygenes Controlling Viability*. *Genetics* **50**: 1-19.

- MUKAI, T., 1969. *The genetic structure of natural populations of drosophila-melanogaster part 8 natural selection on the degree of dominance of viability poly genes*. *Genetics* **63**: 467-478.
- MUKAI, T., S. CHIGUSA y I. YOSHIKAWA, 1964. *Genetic Structure of Natural Populations of Drosophila Melanogaster.2. Overdominance of Spontaneous Mutant Polygenes Controlling Viability in Homozygous Genetic Background*. *Genetics* **50**: 711-715.
- MUKAI, T., S. CHIGUSA y I. YOSHIKAWA, 1965. *Genetic Structure of Natural Populations of Drosophila Melanogaster.3. Dominance Effect of Spontaneous Mutant Polygenes Controlling Viability in Heterozygous Genetic Backgrounds*. *Genetics* **52**: 493-501.
- MUKAI, T., S. I. CHIGUSA, J. F. CROW y L. E. METTLER, 1972. *Mutation Rate and Dominance of Genes Affecting Viability in Drosophila-Melanogaster*. *Genetics* **72**: 335-355.
- MUKAI, T. y T. YAMAZAKI, 1968. *Genetic Structure of Natural Populations of Drosophila Melanogaster.V. Coupling-Repulsion Effect of Spontaneous Mutant Polygenes Controlling Viability*. *Genetics* **59**: 513-535.
- MULLER, H. J., 1950. *Our Load of Mutations*. *American Journal of Human Genetics* **2**: 111-176.
- MULLER, H. J., 1964. *The Relation of Recombination to Mutational Advance*. *Mutation Research* **1**: 2-9.
- OHNISHI, O., 1977a. *Spontaneous and Ethyl Methanesulfonate-Induced Mutations Controlling Viability in Drosophila-Melanogaster.2. Homozygous Effect of Polygenic Mutations*. *Genetics* **87**: 529-545.
- OHNISHI, O., 1977b. *Spontaneous and Ethyl Methanesulfonate-Induced Mutations Controlling Viability in Drosophila-Melanogaster.3. 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*. *Genetical Research* **49**: 135-146.
- PASYUKOVA, E. G., S. V. NUZHIDIN y D. A. FILATOV, 1998. *The relationship between the rate of transposition and transposable element copy number for copia and Doc retrotransposons of Drosophila melanogaster*. *Genetical Research* **72**: 1-11.
- RIVERO, A., F. BALLOUX y S. A. WEST, 2003. *Testing for epistasis between deleterious mutations in a parasitoid wasp*. *Evolution* **57**: 1698-1703.
- ROSA, J. M., S. CAMACHO y A. GARCÍA-DORADO, 2005. *A measure of the within-chromosome synergistic epistasis for Drosophila viability*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 1130-1137.

- SANTIAGO, E., J. ALBORNOZ, A. DOMÍNGUEZ, M. A. TORO y C. LÓPEZ-FANJUL, 1992. *The Distribution of Spontaneous Mutations on Quantitative Traits and Fitness in Drosophila-Melanogaster*. *Genetics* **132**: 771-781.
- SCHULTZ, S. T., M. LYNCH y J. H. WILLIS, 1999. *Spontaneous deleterious mutation in Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 11393-11398.
- SHAW, F. H., C. J. GEYER y R. G. SHAW, 2002. *A comprehensive model of mutations affecting fitness and inferences for Arabidopsis thaliana*. *Evolution* **56**: 453-463.
- SHAW, R. G., D. L. BYERS y E. DARMO, 2000. *Spontaneous mutational effects on reproductive traits of Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **155**: 369-378.
- SIMMONS, M. J. y J. F. CROW, 1977. *Mutations Affecting Fitness in Drosophila Populations*. *Annual Review of Genetics* **11**: 49-78.
- VASSILIEVA, L. L., A. M. HOOK y M. LYNCH, 2000. *The fitness effects of spontaneous mutations in Caenorhabditis elegans*. *Evolution* **54**: 1234-1246.
- VASSILIEVA, L. L. y M. LYNCH, 1999. *The rate of spontaneous mutation for life-history traits in Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **151**: 119-129.
- WHITLOCK, M. C. y D. BOURGUET, 2000. *Factors affecting the genetic load in Drosophila: synergistic epistasis and correlations among fitness components*. *Evolution* **54**: 1654-1660.
- WLOCH, D. M., K. SZAFRANIEC, R. H. BORTS y R. KORONA, 2001. *Direct estimate of the mutation rate and the distribution of fitness effects in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**: 441-452.
- ZEYL, C. y J. A. G. M. DEVISSER, 2001. *Estimates of the rate and distribution of fitness effects of spontaneous mutation in Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 53-61.