

Biológicas

337

T.D

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS POBLACIONAL
DE LA VARIABILIDAD DEL DNA MITOCONDRIAL DEL ÁFIDO

Rhopalosiphum padi (HOMOPTERA: APHIDIDAE).

Memoria presentada por David Martínez Torres para optar al grado de Doctor en Ciencias

Biológicas por la Universitat de València, dirigida por los doctores:

Andrés Moya Simarro y Alberto Fereres Castiel.



Valencia, a 24 de Abril de 1994

UMI Number: U607671

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607671

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

→ Biològias

Nº Registre 6609

DATA 6.VI.94

SIGNATURA

337.T.D

Nº LIBIS: j21683128

30 ans.

INDICE

| | |
|--|---------------|
| I. INTRODUCCION..... | 3 |
| 1. Sistemática y filogenia de los áfidos..... | 5 |
| 2. Biología de los áfidos..... | 8 |
| 2.1. Ciclos biológicos..... | 8 |
| 2.2. Clasificación y terminología..... | 8 |
| 2.3. Evolución de los ciclos de vida..... | 10 |
| 2.4. Especificidad por el huésped..... | 14 |
| 2.5. Reproducción, citogenética y desarrollo..... | 16 |
| 2.6. Estructura de las poblaciones..... | 18 |
| 3. <i>Rhopalosiphum padi</i> : un áfido modelo..... | 21 |
| 4. El DNA mitocondrial como marcador genético..... | 26 |
| 4.1. Características básicas del DNA mitocondrial..... | 26 |
| 4.2. Organización y función..... | 26 |
| 4.3. Variabilidad del DNA mitocondrial..... | 29 |
| 4.4. Aplicaciones a la biología de poblaciones..... | 31 |
| II. OBJETIVOS..... | 34 |
| III. MATERIAL Y METODOS | |
| 1. Clones y "stocks" de <i>R. padi</i> | 35 |
| 2. Extracción del DNA mitocondrial..... | 38 |
| 3. Digestión del DNA mitocondrial con enzimas de restricción..... | 39 |
| 4. Hibridación con sondas no radiactivas..... | 39 |
| 5. Clonación de fragmentos del DNA mitocondrial de <i>R. Padi</i> | 42 |
| 6. Secuenciación de fragmentos del DNA mitocondrial de <i>R. Padi</i> | 42 |
| 7. Digestión con la nucleasa S1..... | 43 |
| IV. RESULTADOS. | |
| 1. Identificación de los fragmentos pertenecientes a la molécula de mtDNA de <i>R. Padi</i> | 44 |
| 2. Elaboración de un primer mapa de restricción de la molécula..... | 45 |
| 3. Polimorfismo de tamaño del mtDNA de <i>R. padi</i> | 47 |
| 3.1. Variación en tamaño de la región control..... | 47 |
| 3.1.1. Identificación de la zona variable..... | 48 |
| 3.1.2. Caracterización molecular..... | 50 |



| | |
|---|------------|
| 3.1.3. Estructura de la región control..... | 54 |
| 3.1.4. Variación en tamaño de la región control en poblaciones naturales de <i>R. padi</i> | 68 |
| 3.2. Variación en tamaño detectada en un fragmento de restricción <i>TaqI</i> | 80 |
| 3.3. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre las dos zonas variables en tamaño..... | 86 |
| 4. Análisis del polimorfismo de sitios restricción del mtDNA en poblaciones naturales de <i>R. padi</i> | 91 |
| 5. Análisis del polimorfismo de sitios de restricción de una molécula circular que se transmite por vía materna..... | 99 |
| V. DISCUSION. | |
| 1. Caracterización molecular de la región control: bases moleculares de la variación en tamaño..... | 103. |
| 2. Variación en tamaño del mtDNA en poblaciones naturales de <i>R. padi</i> | 113 |
| 3. Polimorfismo de restricción en dos moléculas circulares que se transmiten por vía materna..... | 119 |
| 4. Posibles implicaciones de los resultados obtenidos en este trabajo en estudios sobre la epidemiología del BYDV..... | 131 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 133 |
| VII. LITERATURA CITADA..... | 134 |

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Bajo el nombre de áfidos o pulgones se engloban más de 4000 especies de insectos succionadores de savia que se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo. Contrariamente a lo que sucede en otros grupos de insectos, la mayoría de estas especies se concentra en las regiones templadas del planeta, reflejando la relación inversa que existe entre diversidad vegetal en una determinada zona del planeta y el número de especies de pulgones que se puede encontrar (Dixon, 1990).

El estatus de plaga agrícola (con las consiguientes derivaciones económicas) de algunas especies de pulgones ha sido la principal motivación del interés investigador en este grupo de insectos. En este sentido parece existir una completa gradación en cuanto al efecto nocivo de diferentes especies e incluso de diferentes biotipos o razas dentro de una misma especie: desde especies y biotipos que se limitan a extraer nutrientes provocando daños mínimos a su planta hospedadora hasta aquellas que la lesionan gravemente produciendo síntomas senescentes prematuros (Campbell y Eikenbary, 1990). Junto a esta amplia gama de daños que los pulgones producen en los cultivos única y exclusivamente como consecuencia directa de su alimentación, hay que añadir los daños indirectos que algunas especies pueden producir como vectores de gran número de virus vegetales así como por las micosis asociadas a los azúcares que excretan (Tatchell, 1990; Dorschner, 1990).

Desde el punto de vista evolutivo la adaptación de los áfidos a los ciclos estacionales de sus huéspedes ha sido el principal motor que ha propiciado la diferenciación fisio-morfológica de los individuos y la complicación de sus ciclos de vida. Como consecuencia de ello, las funciones de nutrición, reproducción, dispersión y defensa se han transferido en parte del nivel individual al poblacional dando lugar a una sucesión temporal y/o espacial de grupos de individuos diferencialmente especializados así como a un elevado polifenismo. Los ciclos de vida de los pulgones se sitúan entre los más llamativos del mundo animal. La inclusión de varias generaciones partenogénicas vivíparas y telescópicas (hasta tres generaciones presentes en un único "individuo") permite alcanzar tasas de crecimiento poblacional enormes, ideales para la colonización de hábitats temporales (Dixon, 1987). Del mismo modo la alternancia entre formas ápteras y aladas en respuesta a factores tales como densidad poblacional, calidad del floema, temperatura y fotoperíodo favorece la expansión espacial de las poblaciones (Dixon, 1985; Shaposhnikov, 1987).

El estudio de los áfidos no es solamente interesante desde la perspectiva del diseño de estrategias para su control, sino que dada la concurrencia de un conjunto de peculiaridades de su biología, tales como ciclos de vida complejos, amplio polifenismo, alternancia estacional de huésped y control de la razón de sexos, son organismos ideales para investigar problemas cruciales de la biología evolutiva. Por ejemplo, el modo de reproducción parcialmente clonal puede ser útil para el contraste de hipótesis sobre las ventajas de la sexualidad al tiempo que

proporciona información sobre el componente genético de los caracteres de eficacia biológica (Moran, 1992). En los siguientes apartados se presentarán las principales características que hacen de los pulgones unos organismos interesantes desde el punto de vista de la Biología Evolutiva y del Desarrollo.

1.1. SISTEMÁTICA Y FILOGENIA DE LOS AFIDOS.

Los áfidos pertenecen al orden *Homoptera* y dentro de él a la serie *Sternorrhyncha* en la que se incluyen como suborden *Aphidinea* que junto al suborden *Coccinea* constituye la subserie *Aphidomorpha*. Su clasificación está todavía sujeta a una gran controversia sobre todo en lo relativo al número de familias que integran el suborden *Aphidinea*. Las clasificaciones más conocidas son las de Baker (1920), Börner (1930), Börner y Heinze (1957), Shaposhnikov (1964), Hille Ris Lambers (1964) y Heie (1980). Todos los autores están de acuerdo en cuanto a los taxones de rango más elevado y el hecho de que haya numerosas clasificaciones no es considerado por los autores actuales como una cuestión importante. Así, para evitar un número excesivo de familias la clasificación de Heie (1980) se ha tomado muchas veces como estándar. Es esta clasificación la que aparece en la Tabla 1.1. A menudo se consideran áfidos en sentido estricto sólo los pertenecientes a la superfamilia *Aphidoidea* dado que en todos ellos la viviparidad es característica de las hembras partenogénicas. Por el contrario, en la superfamilia *Phylloxeroidea* las hembras partenogénicas se reproducen ovíparamente. En las dos superfamilias la hembra sexual es ovípara.

La información sobre el origen y evolución de cualquier taxón o grupo de taxones procede de estudios paleontológicos y filogenéticos. Ambos están basados en la comparación de caracteres y la estimación del grado de parentesco entre taxones. La Paleontología contribuye esencialmente proporcionando una escala temporal así como información relativa a taxones ya extinguidos. La contribución paleontológica al conocimiento de la evolución de los áfidos es limitada. Solamente se han descrito 125 especies fósiles, lo que representa un número muy bajo comparado con las más de 4000 especies existentes en la actualidad (Heie, 1987).

Algunos fósiles procedentes del Pérmico parecen relacionados de alguna forma con el ancestro de los áfidos pero no pueden ser clasificados ni como *Aphidomorpha* ni como *Aphidiformes* (ancestros comunes de áfidos y cóccidos). El resto más antiguo (una ala anterior) que puede considerarse como perteneciente a un áfido procede del Triásico. Procedentes del Jurásico se han descrito tres especies. Ya del Cretácico se han descubierto 32 especies de áfidos que se han dividido en los siguientes grupos: *Aphidoidea*, *Phylloxeroidea*, *Canadaphidoidea* y otros de clasificación incierta. De las aproximadamente 100 especies encontradas en la era Terciaria, la mayoría se asemeja ya a grupos conocidos de la actualidad y se agrupan bien dentro de *Aphidoidea* o dentro de *Phylloxeroidea*, no quedando ni trazas del grupo *Canadaphidoidea*.



Tabla 1.I. Clasificación de Heie de 1980 de suborden Aphidinea. El género *Rhopalosiphum* se encuadra en los grupos indicados en negrita.

| Familia | Subfamilia | Tribu | Subtribu |
|------------------------------------|---------------------|------------------|----------------|
| SUPERFAMILIA PHYLLOXEROIDEA | | | |
| Adelgidae | | | |
| Phylloxeridae | | | |
| SUPERFAMILIA APHIDOIDEA | | | |
| Mindaridae | | | |
| Hormaphididae | Oregminae | | |
| | Hormaphidinae | | |
| Phloeomyzidae | | | |
| Thelaxidae | | | |
| Anoeciidae | | | |
| Pemphigidae | Eriosomatinae | Eriosomatini | |
| | | Tetraneurini | |
| | Pemphiginae | Prociphilini | |
| | | Pemphigini | |
| | Fordinae | Fordini | Baizongiina |
| | | | Geoicina |
| | | | Fordina |
| Drepanosiphidae | Drepanosiphinae | Melaphidini | |
| | | Neophyllaphidini | |
| | | Paoliellini | |
| | | Spicaphidini | |
| | | Palaeosiphonini | |
| | | Israelaphidini | |
| | | Drepanosiphini | |
| | Phyllaphidinae | Phyllaphidini | Phyllaphidina |
| | | | Callaphidina |
| | | | Therioaphidina |
| | | Macropodaphidini | |
| | | Saltusaphidini | |
| | Chaitophorinae | Chaitophorini | |
| | | Siphini | |
| Greenideidae | Greenideinae | | |
| | Cervaphidinae | | |
| Aphididae | Baltichaitophorinae | | |
| | Pterocommatinae | | |
| | Aphidinae | Aphidini | |
| | | Macrosiphini | |
| Lachnidae | Lachninae | Stomaphidini | |
| | | Lachnini | |
| | Cinarinae | Cinarini | |
| | | Schizolachnini | |
| | | Eulachnini | |
| | Traminae | | |

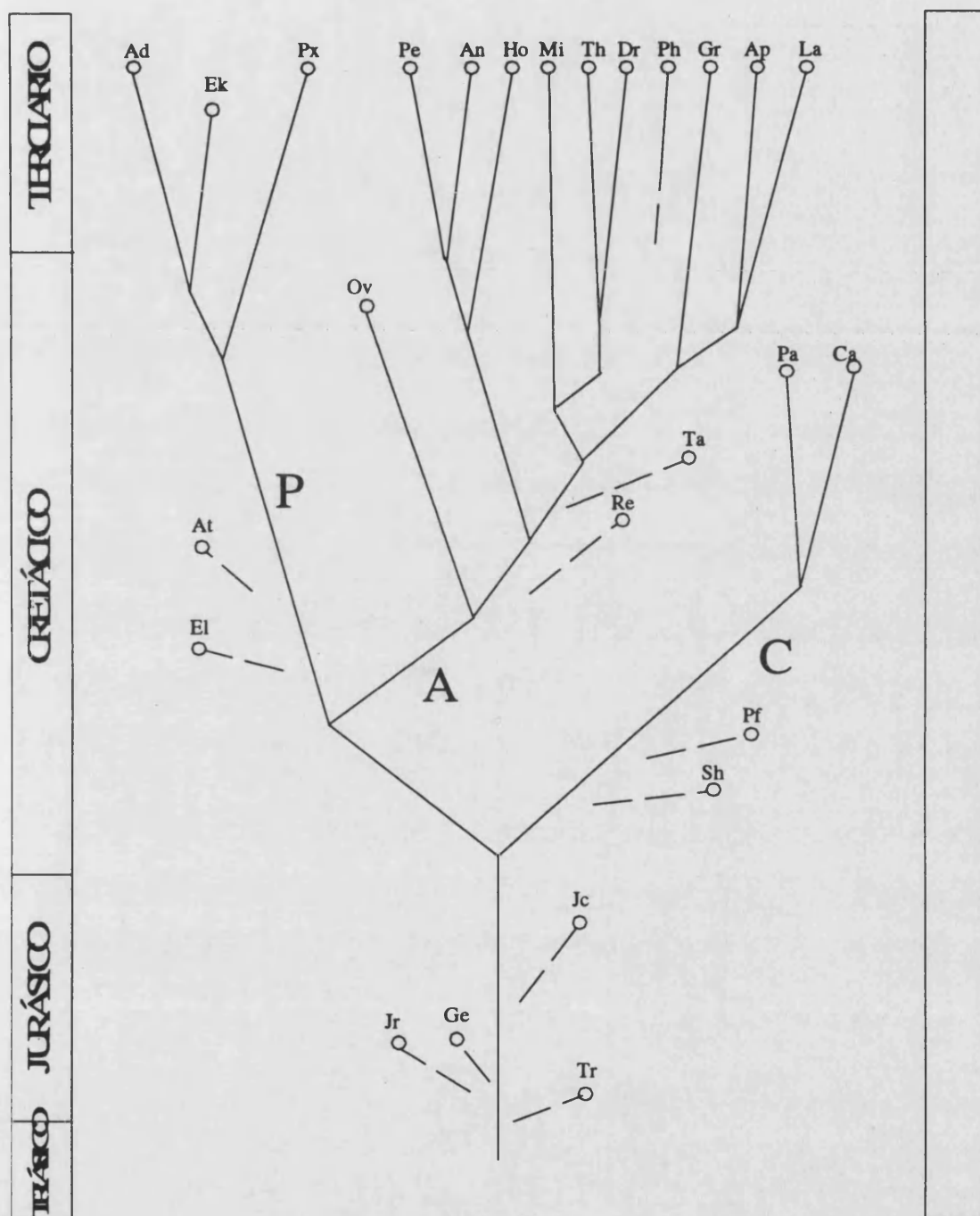


Figura 1.L. Arbol filogenético que muestra el origen y evolución de los tres grandes grupos de áfidos. A, C y P corresponden a las superfamilias Aphidoidea, Canadaphidoidea y Phylloxeroidea. Es de destacar la reciente diversificación de la superfamilia Aphidoidea. Las abreviaturas corresponden a familias o géneros algunos de ellos extinguidos pero presentes en el registro fósil: Ad, Adelgidae; An, Anoeciidae; Ap, aphididae; At, *Antonaphis*; Ca, Canadaphididae; Dr, Drepanosiphidae; El, *Ellinaphis* y *Annulaphis*; Ek, Elektraphididae; Ge, *Genaphis*; Gr, Greenideidae; Ho, Hormaphididae; Jc, *Jurocallis*; Jr, *Juraphis*; La, Lachnidae; Mi, Mindaridae; Ov, Oviparosiphidae; Pa, Paleoaphididae; Pe, Pemphigidae; Pf, *Paleoforda*; Ph, Pholeomyzidae; Px, Phylloxeridae; Re, *Retinaphis*; Sh, Shaposhnikoviiidae; Ta, Tajmyraphididae; Th, Thelaxidae; Tr, *Triassoaphis*.

El registro fósil indica tres grandes cambios en la composición de la fauna afídica desde su origen hace unos 250 millones de años (Figura 1.I). A partir de la aparición del primer áfido en el Pérmico tardío o ya en el Triásico se produce una diversificación considerable mediante especiación intensa o radiación adaptativa quizás en conexión con la evolución de las gimnospermas. La transición de la era de las gimnospermas a la de las angiospermas está probablemente relacionada con las grandes diferencias entre la fauna del Cretácico y la del Terciario temprano en la que se extinguen taxones elevados completos que son reemplazados por descendientes de taxones minoritarios en el Mesozoico. El cambio más reciente ha sido la enorme diversificación de las familias *Lachnidae* y *Aphididae* (Heie, 1987).

I.2. BIOLOGIA DE LOS AFIDOS.

Los dos factores más importantes determinantes últimos de la ecología y evolución del grupo han sido su forma de reproducirse y de alimentarse. La partenogénesis y la viviparidad han permitido a los miembros del grupo desarrollar generaciones literalmente imbricadas (telescópicas) y alcanzar así tasas de aumento poblacional verdaderamente prodigiosas (Dixon, 1987). Por otra parte, la alimentación basada en la succión del floema de las plantas impone determinadas constricciones que han sido importantes en la determinación de la especificidad del áfido por la planta hospedadora, en la especiación y en la distribución de los áfidos a escala mundial. Estas constricciones han sido también fundamentales en el diseño o en el mantenimiento de determinados tipos de ciclos de vida en muchas especies de áfidos. La combinación de estos dos factores ha sido así mismo la responsable del amplio polifenismo presente en la mayoría de las especies de pulgones.

I.2.1. Ciclos biológicos.

Los ciclos de vida de los áfidos se sitúan entre los más singulares del mundo animal. Generalmente incluyen generaciones partenogénicas y sexuales, polifenismos elaborados y, en muchos casos, alternancia obligada entre plantas huésped pertenecientes a taxones no relacionados. Aunque entre las aproximadamente 4000 especies existentes dentro de la superfamilia *Aphidoidea* se pueden encontrar todo tipo de combinaciones de estas y otras características, describiremos únicamente aquellos ciclos o variaciones de estos que se pueden considerar como más generales.

I.2.2. Clasificación y terminología.

Los ciclos de vida de los áfidos se pueden clasificar atendiendo a dos criterios distintos aunque interrelacionados. Uno de estos criterios es la presencia o no de dos grupos de

hospedadores taxonómicamente no relacionados. Según este criterio existen dos tipos de ciclos:

Ciclo autoico o monoico: las especies que lo presentan desarrollan todas las fases del ciclo sobre un único huésped o sobre un grupo de huéspedes relacionados.

Ciclo heteroico o dioico: la fase sexual del ciclo tiene lugar sobre un hospedador (huésped primario) que no está relacionado taxonómicamente con aquel en el que se desarrollan el resto de las fases (huésped secundario). Aunque existen excepciones, el huésped primario suele ser una planta leñosa y el secundario una planta herbácea.

Un segundo criterio es la existencia o no de fase sexual. De acuerdo con este criterio los áfidos pueden ser:

Holocíclicos: se caracterizan por la existencia de una fase de reproducción sexual que sucede a una serie de generaciones de hembras vivíparamente partenogénicas. Del huevo de invierno nace en la primavera una hembra que por partenogénesis da lugar a las hembras partenogénicas que se van a suceder durante el resto de la primavera y el verano. Al comenzar el otoño la última generación de partenogénicas produce individuos sexuados que tras la fecundación dan lugar al huevo de invierno que cierra así el ciclo.

Anholocíclicos: no existe la fase de reproducción sexual desarrollándose todo el ciclo como una sucesión de generaciones de hembras partenogénicas.

Androcíclicos: representan un caso especial de anholociclia (carecen de fase de reproducción sexual) pero conservan la capacidad de generar machos, siendo incapaces de generar hembras sexuadas.

La terminología asociada a los distintos tipos de individuos (o morfos) que aparecen a lo largo de los ciclos descritos es complicada pero conviene definir algunos términos que necesariamente aparecerán a lo largo de la presente tesis:

Fundatrix: es la primera generación de hembras partenogénicas procedentes de un huevo fecundado. La fundatrix es generalmente áptera pero morfológicamente distinguible de las ápteras que se producirán en generaciones partenogénicas sucesivas.

Clon: línea partenogénica iniciada por la fundatrix que finaliza con la producción de individuos sexuados. Cada fundatrix da lugar a un clon genotípicamente distinto del resto.

Virginóparas: son las hembras partenogénicas que suceden a la fundatrix y que como ella se reproducen vivíparamente. Estas hembras pueden ser ápteras o aladas en respuesta a ciertas condiciones ambientales. En las especies o razas heteroicas la secuencia de generaciones partenogénicas se suele dividir en dos fases según el huésped al que estén asociadas. A las primeras generaciones asociadas al huésped primario se les denomina **fundatrigenas** mientras que las siguientes, asociadas al huésped secundario, reciben el nombre de **exiladas** o **alienícolas**. Ambos tipos difieren en propiedades biológicas como preferencia por el huésped y por el hábitat, y a menudo también en caracteres morfológicos. La fundatrigena

que desarrolla alas, casi de forma obligatoria ha de volar (en los pulgones heteroicos) en busca del huésped secundario y se le suele denominar emigrante.

Ginópara, sexúpara y andrópara: en especies heteroicas holocíclicas, al llegar el otoño terminan las generaciones partenogénicas con la producción de los individuos sexuados. En las especies de la familia *Aphididae*, los machos y las hembras sexuadas nacen de hembras vivíparas pertenecientes a generaciones distintas. Bajo determinadas condiciones ambientales (fotoperiodos cortos y bajas temperaturas), la última generación de virginóparas produce machos alados y ginóparas. Estas últimas (que normalmente nacen antes que los machos) son igualmente aladas y vuelan hasta el huésped primario donde de forma vivípara depositarán las hembras sexuadas. En algunas especies la producción de machos también requiere una generación previa de hembras que solo paren machos. Estas hembras son las andróparas. Por último en la familia *Pemphigidae* machos y hembras sexuadas nacen de una misma hembra vivípara denominada sexúpara. Este término también se aplica a la hembra que da lugar a los dos tipos de individuos sexuados en especies holocíclicas monoicas de *Aphididae*.

Sexuados (macho y hembra sexuada): generados mediante alguna de las formas descritas, tanto los machos como las hembras sexuadas son morfológicamente distinguibles del resto de formas. Los machos de las especies heteroicas suelen ser alados mientras que los de especies monoicas pueden no serlo. Por el contrario, la hembra sexuada suele ser siempre áptera. Esta hembra también recibe el nombre de ovípara ya que es la única (y esto es válido para toda la superfamilia *Aphidoidea*) que se reproduce ovíparamente.

Junto a todas estas formas ampliamente extendidas entre los áfidos, en algunas especies como en el caso de las pertenecientes a los géneros *Colophina* y *Pseudoregma*, existen además formas especializadas en defensa ("soldados"). También existen especies (*Drepanosiphum platanoides* Schrank, *Periphyllus testudinaceus* Fernie) que incluyen en su ciclo vital formas estivantes o formas hibernantes distintas del huevo (*Pemphigus bursarius* Linnaeus).

La Figura 2.I. presenta algunos de los ciclos vitales más representativos entre los áfidos así como la terminología empleada más habitualmente.

I.2.3. Evolución de los ciclos de vida.

La complejidad de los ciclos biológicos desarrollados por los pulgones resulta más comprensible cuando se considera desde una perspectiva histórica (Moran, 1992). Las transformaciones evolutivas que han dado lugar a la variedad de ciclos que presentan los áfidos modernos se esquematiza en la Figura 3.I.

Los acontecimientos más importantes en la evolución de los ciclos biológicos de los áfidos han sido el origen de la partenogénesis y la viviparidad, el desarrollo de un considerable polifenismo con adaptaciones que sincronizan el crecimiento y la reproducción con los periodos óptimos del ciclo del huésped, la adquisición o la pérdida de la alternancia de

ORIGEN DE LA
PARTENOGENESIS
CICLICA

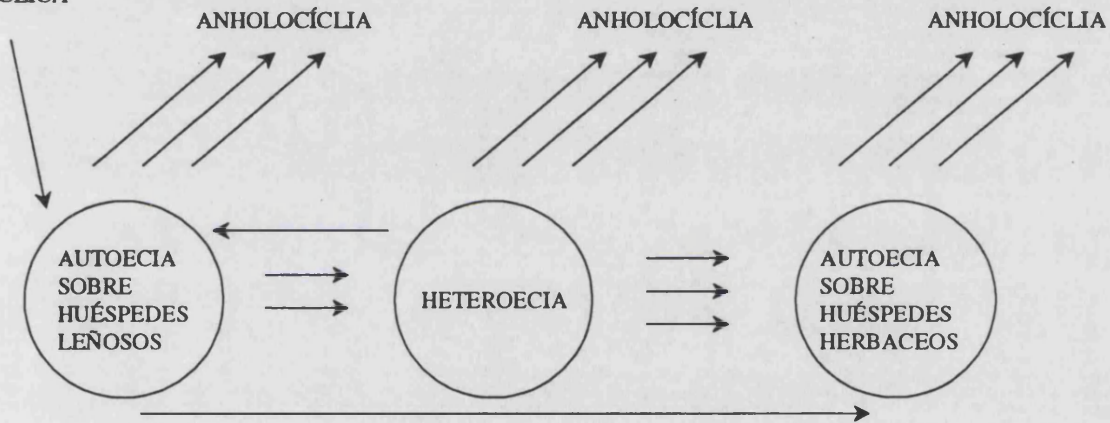


Figura 3.1. Esquema que representa las transiciones evolutivas más importantes que han dado lugar a los distintos tipos de ciclos de vida de los áfidos

hospedador y la pérdida de la fase sexual. Todos estos acontecimientos así como las presiones evolutivas a que parecen responder se describen a continuación.

El establecimiento de la partenogénesis cíclica parece haber sucedido de forma muy temprana en un ancestro común a todos los *Aphidinea*. La gran uniformidad existente en este aspecto en las especies actuales así como la evidencia fósil (Heie, 1981 y 1987) apoyan esta idea. La viviparidad y el solapamiento de generaciones caracteriza a la superfamilia *Aphidoidea* confiriendo a este grupo la potencialidad de alcanzar unas tasas reproductivas muy altas (Dixon, 1987). La oviparidad de la hembra sexuada se conserva tanto en la superfamilia *Aphidoidea* como en la superfamilia *Phylloxeroidea*.

Por otra parte, el amplio polifenismo existente dentro de un mismo tipo de ciclo refleja una adaptación a condiciones ambientales cambiantes a lo largo del ciclo. De esta forma caracteres de historia de vida tales como capacidad de volar, tolerancia a la limitación de los nutrientes y a temperaturas extremas, habilidad en la localización del huésped, tasa de desarrollo y fecundidad se han seleccionado con diferente intensidad bajo ambientes diferentes. De la existencia de morfos comparables entre los principales taxones de áfidos no se deriva necesariamente una homología entre ellos, siendo necesario considerar el papel de los procesos de convergencia: como resultado de fuerzas selectivas similares actuando sobre sistemas de desarrollo también similares se pueden obtener morfos análogos (Moran, 1988; 1992). La adición o eliminación de determinados morfos o la transferencia de alguna capacidad de unos morfos a otros ha determinado la evolución de los ciclos biológicos de los áfidos.

El áfido ancestral poseía un ciclo bastante sencillo. Una vez establecida la partenogénesis cíclica, todas las hembras eran ovíparas y aladas desarrollando su ciclo completo sobre un único hospedador leñoso (Saposhnikov, 1985; Moran, 1992). Algunas subfamilias hoy existentes conservan este tipo de ciclo aunque incluyendo la viviparidad en aquellas pertenecientes a la superfamilia *Aphidoidea*. Para estas especies la principal limitación es la escasez de nutrientes durante el verano debido a la menor concentración de los nutrientes limitantes en el floema (Dixon, 1985). Este problema se ha resuelto con la inclusión de formas estivantes (Eastop, 1972), o mediante la abreviación del ciclo reproduciéndose sexualmente al comienzo de verano y pasando el resto del verano, otoño e invierno en forma de huevo (Blackman and Eastop, 1984). Otra solución a este problema es la adquisición de un huésped secundario (heteroecia), generalmente herbáceo, de mayor poder nutritivo para los insectos fitófagos (Llewellyn, 1987) sobre todo en el verano. Como mínimo la heteroecia ha tenido tres orígenes diferentes en los *Aphidoidea* siendo por tanto un carácter polifilético. Sin embargo, aunque sólo el 10% de los áfidos actuales presentan esta alternancia o heteroecia (Eastop, 1977) muchas especies monoicas actuales proceden de ancestros heteroicos. El mantenimiento de dos grupos de huéspedes diferentes, dada la aparente mayor calidad de uno de ellos, es explicado por muchos autores como una consecuencia de la sobre-especialización de la fundatrix que estaría más estrechamente adaptada al hospedador ancestral que el resto de

morfos. La fundatrix tendría, según esta hipótesis (Moran, 1988), una menor capacidad para adquirir nuevos hospedadores que puedan aparecer a lo largo de la evolución. Gran parte de la diversificación de los áfidos está relacionada con la eliminación de uno de los hospedadores. Esta eliminación puede ocurrir de tres formas distintas:

- a) Eliminación del huésped primario transfiriendo las formas sexuales, la fase de huevo y la fundatrix al huésped secundario.
- b) Pérdida del huésped secundario eliminando o transformando las formas emigrantes.
- c) Eliminación del hospedador primario mediante eliminación de las formas sexuales y por tanto perdiendo la capacidad de reproducción sexual dando lugar a la anholociclia.

Aunque la anholociclia también ha aparecido en especies autoicas el hecho de que su establecimiento se haya producido mayoritariamente en las especies heteroicas (Blackman and Eastop, 1984), sugiere que en su adquisición juega un papel importante la selección contra la alternancia obligada (Moran, 1992).

La aparición de la anholociclia puede ser consecuencia tanto de cambios genéticos que conduzcan a la pérdida definitiva de la sexualidad, como de cambios ambientales. Entre estos últimos tienen relevancia las variaciones en los factores que gobiernan la aparición de las formas sexuales (fotoperiodo y temperatura) y la escasez o ausencia del hospedador primario. Distintas combinaciones de estos factores hacen que dentro de una misma especie coexistan tanto líneas (clones) holocíclicas como anholocíclicas. Dentro de estas últimas, algunas sólo lo son como consecuencia de que en la latitud en la que se encuentran no se llegan a producir las señales ambientales necesarias para la inducción de la fase sexual (Moran, 1992). La mayor parte de especies plaga son anholocíclicas sobre todo en zonas de clima templado (Blackman, 1984).

I.2.4. Especificidad por el huésped.

En general los áfidos presentan una alta especificidad por su hospedador. Como ya se ha dicho, la mayoría de los pulgones actuales son autoicos sobre una especie o un grupo de especies vegetales filogenéticamente relacionadas. Aunque las especies heteroicas se clasifican muchas veces como polífagas, lo cierto es que de ellas se podría decir que son secuencialmente monófagas ya que cada una de las formas que aparecen en su ciclo biológico está altamente especializada en cuanto a su alimentación. Sin embargo, existen algunas especies heteroicas como *Myzus persicae* (Sulzer) y *Aphis fabae* (Scopoli), que presentan un rango amplísimo de huéspedes secundarios. Pero incluso en estas especies altamente polífagas, el rango de hospedadores secundarios puede considerarse limitado, con ciertos genotipos adaptados a huéspedes específicos (Takada, 1979; Weber, 1982).

El floema se puede considerar como una dieta no equilibrada rica en azúcares pero relativamente pobre en aminoácidos. Este problema ha sido solucionado en los áfidos y en otros insectos succionadores de savia de dos formas diferentes: por un lado mediante la ingestión de

gran cantidad de floema (filtrando los aminoácidos necesarios) y excretando el exceso de carbohidratos con ayuda de un aparato digestivo especializado que posee una cámara filtrante (cita), y por otro con la incorporación de endosimbiontes bacterianos que suministran sustancias ausentes o escasas en el floema (principalmente aminoácidos esenciales, Douglas, ...). En el caso de los áfidos, estos endosimbiontes bacterianos están confinados a unas células hipertrofiadas denominadas micetocitos que se comportan realmente como un órgano esencial para la supervivencia y la capacidad reproductora de los áfidos. De hecho, esta asociación simbiótica puede ser lo que les ha permitido explotar el floema como fuente de alimento y por lo tanto hay que tenerla en cuenta cuando se considera el fenómeno de la especificidad.

Por otra parte, las plantas difieren enormemente en la naturaleza y cantidad de productos de metabolismo secundario tóxicos o de defensa que producen. Esto obliga a los áfidos al desarrollo de sistemas de detoxificación o de mecanismos que eviten la inducción de la producción de tales sustancias. Dado lo variado de tales compuestos el desarrollo de mecanismos específicos probablemente ha sido otro factor determinante en la especificidad por el hospedador. En este contexto es destacable el hecho de que en varias especies de áfidos se han descrito biotipos o razas diferencialmente adaptadas a alimentarse en diferentes especies de plantas o en diferentes variedades de una misma especie, o bien manifestando distintos grados de virulencia o de resistencia a insecticidas (Eastop, 1973; Maxwell y Jennings, 1980; Puterka y Burton, 1989).

Como ya se ha mencionado al hablar de los ciclos biológicos, los áfidos han sincronizado su desarrollo con los cambios estacionales que sufren los hospedadores, optimizando así la combinación de estrategias de los distintos morfos que constituyen el ciclo vital completo.

Otro factor a considerar es la gran variación que existe en la estructura de las plantas y, por lo que aquí concierne, en el tamaño de los elementos floemáticos y en su localización. El reducido tamaño de los áfidos es posiblemente resultado de su adaptación a alimentarse sobre elementos floemáticos individuales.

Después de esta breve descripción de algunos de los elementos que han podido ser determinantes de la alta especificidad por el hospedador, emerge una conclusión general: dado que los áfidos han evolucionado manteniendo un tamaño específico en respuesta a la estructura y fisiología de los elementos floemáticos, estableciendo una asociación íntima con endosimbiontes, desarrollando una fisiología digestiva en respuesta a la composición química del floema y adaptando sus ciclos vitales a los ciclos estacionales de las plantas, la alta especificidad parece una consecuencia necesaria más que una característica peculiar difícil de interpretar.

L2.5. Reproducción: citogenética y desarrollo.

Aunque muchos aspectos citogenéticos y del desarrollo en los áfidos todavía son desconocidos, describiremos brevemente aquellos aspectos generales que pueden ayudar a comprender la aparición a lo largo del ciclo vital de los áfidos de individuos distintos desde el punto de vista de su forma de reproducción: vivíparas, ovíparas y machos.

El desarrollo embrionario de las hembras partenogénicas y de las sexuales es idéntico en sus inicios hasta la completa formación de sus respectivos ovarios (germarios). A partir de aquí el desarrollo del sistema reproductor de ambos tipos de embriones es distinto. Aunque pueden existir factores de tipo genético que determinen la categoría reproductiva de los embriones, esta parece ser consecuencia de la respuesta a ciertos estímulos ambientales sufridos por la madre, entre los cuales el más crítico parece ser el fotoperiodo (Marcovitch, 1924; Kenten, 1955; Kawada, 1976; Blackman, 1975; Dixon and Glen, 1971), y en menor grado la temperatura. Se asume que el receptor del fotoperiodo se localiza en el protocerebro, aunque se desconoce la naturaleza de los intermediarios producidos en respuesta a los diferentes estímulos. Solo se ha logrado identificar el responsable de la determinación del sexo y por tanto de la producción de machos. Varios experimentos con diferentes especies apoyan la hipótesis (Mittler et al., 1979) de que son los niveles de hormona juvenil los que controlan el proceso de determinación del sexo en áfidos. Se considera que la actividad de esta hormona en insectos consiste en activar o reprimir determinados conjuntos de genes dando lugar a pautas de desarrollo alternativas (Nijhout and Wheeler, 1982), por lo que tampoco se descarta su participación en el desarrollo del polifenismo observado en los áfidos.

Vivíparas. Bajo un fotoperiodo con corta escotofase, el embrión se desarrollará dando lugar a una hembra partenogénica vivípara. Una de las 32 oogonias, que están en profase meiótica temprana, de uno de sus germarios ya formados, se empieza a desarrollar como óvulo. Aumenta de tamaño, hasta alcanzar el tamaño del germario y sale fuera de este (ovulación). Los cromosomas homólogos, que estaban parcialmente condensados y aparentemente emparejados (Blackman, 1978) se separan, aumentando entonces su estado de condensación. Algunos autores han sugerido que en el aparente emparejamiento de cromosomas homólogos de la profase temprana podría haber formación de quiasmas y por tanto recombinación en un proceso que denominaron endomeiosis (Cognetti, 1961). Sin embargo, no hay evidencias claras de que este tipo de recombinación mitótica ocurra realmente (Blackman, 1979; Tomiuk and Wöhrman, 1982). Se produce entonces una metafase mitótica normal y se elimina un cuerpo polar (división maduracional). A partir de aquí se suceden rápidamente las divisiones mitóticas que inician el rápido desarrollo del embrión. Después de la primera división mitótica un grupo de unas siete oogonias del germario se diferencia en oocitos presuntivos en los que, a diferencia del primer oocito, los cromosomas se encuentran condensados desde el principio (Orlando and Mary, 1968; Blackman, 1978), y uno tras otro van desarrollando el esquema del primer oocito. Cuando nace la futura vivípara, ya ha ovulado

tres veces y los dos primeros oocitos ya están en fases sucesivas del desarrollo embrionario. En la vida larvaria se suceden las ovulaciones y el desarrollo de los embriones. Así, tras la última muda, cada ovario contiene un rosario de embriones, algunos de ellos ya listos para vivir de forma independiente.

Ovíparas. En condiciones de fotoperiodo con escotofase larga, ocho oogonias de la parte basal del germario de los embriones destinados a desarrollarse como ovíparas entran en meiosis. Contrariamente a lo que sucede en los embriones destinados a ser vivíparas, no se produce un crecimiento de los oocitos hasta que la futura ovípara nace. En el inicio de la meiosis se pueden distinguir claramente las tétradas y los quiasmas que se forman entre cromátidas (Blackman, 1976). Iniciada la vida larvaria, el oocito aumenta de tamaño y sale del germario (ovulación). Cuando la ovípara es adulta deposita sus huevos todavía en la primera metafase meiótica. Si habían sido fecundados, se completarán la primera y segunda divisiones meióticas con la expulsión de dos cuerpos polares y se iniciará el desarrollo embrionario, que normalmente pasará por una fase de diapausa.

Machos. Su producción es inducida igualmente por fotoperiodos con escotofase larga. Los machos son XO por lo que el oocito destinado a desarrollarse como macho ha de perder un cromosoma sexual en el transcurso de la división maduracional (primera mitosis del oocito). Esto se consigue gracias a una "minimeiosis" que afecta solo al cromosoma X (Orlando, 1974). Contrariamente a lo que sucede en los autosomas, los dos cromosomas X homólogos permanecen unidos por sus extremos formando un bivalente hasta la metafase de la primera mitosis. En esta fase se rompe la conexión entre ambos cromosomas X y uno de ellos (el más próximo a la membrana del oocito) ya no participa en los acontecimientos posteriores. En las siguientes fases, las dos cromátidas del cromosoma X restante se separan de la misma forma que en los autosomas. Al final se produce el óvulo maduro y un cuerpo polar ambos con un solo cromosoma X. El óvulo maduro inicia rápidamente las divisiones mitóticas que inician a su vez el desarrollo embrionario del futuro macho. El comportamiento de los cromosomas X antes o durante la división maduracional, y por tanto la determinación del sexo, estaría controlado por los niveles de hormona juvenil (Mittler et al., 1979; Hales and Mittler, 1987).

El proceso de espermatogénesis en los machos asegura que sus descendientes sean solo hembras mediante eliminación selectiva de los espermatocitos secundarios que carecen del cromosoma X (Morgan, 1915; Schwartz, 1932). Esto es debido probablemente a que el cromosoma X es portador de algunos factores indispensables para una espermiogénesis correcta y aquellos espermatocitos secundarios que carecen de ellos degeneran.

Por otra parte, aunque los datos existentes son contradictorios, la idea de que las meiosis asociadas a la espermatogénesis son aquiasmáticas es la más generalizada (Ris, 1942; Blackman, 1976) aunque puede haber cierto grado de variación dependiendo de las especies estudiadas (Blackman, 1987).

Desarrollo postembrionario.

Como insectos heterometábolos que son, los áfidos presentan una serie de estadios ninfales que se asemejan al adulto aunque en el caso de las formas aladas, sus ninfas en las primeras fases todavía no presentan los esbozos alares. Además, las formas ninfales tienen los mismos hábitos ecológicos que los adultos por lo que los pulgones han de ser considerados como insectos paurometábolos (!!!!!).

Como norma general los áfidos presentan cuatro estadios ninfales con sus correspondientes ecdisis antes de alcanzar el estado imaginal. Sin embargo existen algunas excepciones distribuidas en las principales familias que presentan una quinta muda tras el nacimiento de una pequeña parte de la progenie (Takahashi, 1924a, b).

Cromosomas y variación cariotípica en áfidos. (Blackman, 1987)

Los cromosomas de los áfidos como los de otros insectos hemipteroides son holocéntricos, careciendo de centrómeros localizados. La actividad centromérica en este tipo de cromosomas está repartida de forma difusa a lo largo del cromosoma. De esta forma, en la anafase de la célula en división, cada cromosoma está unido a las fibras del huso en toda su longitud lo que provoca que el desplazamiento de los cromosomas hacia los polos de la célula tenga distinto aspecto al de los cromosomas con centrómeros localizados.

La naturaleza difusa de los centrómeros tiene efectos importantes en los cambios y reordenaciones cromosómicas que pueden darse a lo largo de la especiación y la evolución. Los cromosomas holocéntricos pueden fragmentarse por muchos puntos rindiendo productos de disociación todavía estables. Esto es posible porque todos los fragmentos presentan actividad centromérica y por tanto se pueden orientar correctamente en la placa ecuatorial durante la mitosis dividiéndose y pasando normalmente a las células hijas. Como consecuencia de ello, ciertos géneros y especies de áfidos presentan una considerable variación en el número de cromosomas asociada a pocos cambios morfológicos. En particular, en aquellas especies que han perdido total o parcialmente la fase sexual, el número de alteraciones cromosómicas que se pueden acumular en diferentes líneas partenogénicas que evolucionan independientemente, es ilimitado. A pesar de esta potencialidad, parece existir una fuerte tendencia a la estabilización del número de cromosomas a nivel de género o subgénero (Blackman, 1987).

I.2.6. Estructura de las poblaciones.

Como ya se ha descrito, la estructura temporal de las poblaciones de áfidos depende de la secuencia de formas especializadas que aparecen a lo largo del ciclo biológico. Este polimorfismo estacional es activado por factores ambientales de forma que las poblaciones combinan sus patrones adaptativos firmemente fijados con una relativa flexibilidad. Esta permite adecuaciones a cambios bruscos en las condiciones ambientales.

Por otra parte, la estructura espacial de las poblaciones depende tanto de la distribución de los posibles hospedadores como de las interacciones entre individuos. En muchas especies existe una tendencia a la agregación o formación de colonias. Sin embargo, esta tendencia es limitada. Superados unos niveles de densidad de individuos por hospedador, se favorece la aparición de formas aladas que dispersan la población buscando hospedadores adecuados libres de áfidos. Otro factor a tener en cuenta es el carácter monoico o heteroico de una especie, ya que influye decisivamente en el grado de aleatoriedad que puede darse en el apareamiento. Desde este mismo punto de vista es importante en las especies heteroicas la forma en que se producen las formas sexuales. El grado de endogamia será mayor en especies en que ambos sexos nacen de un mismo tipo de individuo (sexúpara) que en aquellas en que hay una separación temporal entre la aparición de machos y de hembras sexuadas mediante la inclusión de una generación intermedia (ginóparas).

El hecho de que el carácter holocíclico o anholocíclico no sea algo absolutamente definitorio de algunas especies si no que puede ser aplicado igualmente y como carácter diferenciador a subespecies, poblaciones e incluso clones, complica el estudio de la estructura genética de las poblaciones de áfidos dado que en una misma zona geográfica pueden coexistir clones indefinidamente partenogénéticos con otros que incluyen la fase de reproducción sexual. Que ambos tipos de formas puedan o no ser considerados como miembros de una misma población es algo que debe ser discutido.

Desde el punto de vista de la genética de poblaciones, no existe ninguna diferencia básica entre aquellas especies o poblaciones de áfidos holocíclicas y cualquier otro organismo de apareamiento aleatorio (Wöhrmann y Hales, 1989). En ambos casos la variabilidad genotípica es regenerada durante la fase sexual mediante recombinación. Durante el desarrollo del cigoto a individuo adulto pueden actuar tanto la selección como la deriva. Esta última además tendría un papel importante en el proceso de migración entre huéspedes alternativos en las especies heteroicas. Sin embargo en aquellas especies, poblaciones o clones anholocíclicos la selección actuaría de forma mucho más drástica, ya que incluso pequeñas variaciones en la eficacia entre diferentes fenotipos como consecuencia de cambios ambientales no previsibles pueden producir grandes cambios en la composición genotípica de una población mediante la extinción de líneas partenogénéticas (clones) completas.

Aunque el papel de la selección puede llegar a ser importante, la estructura de las poblaciones de áfidos y su variabilidad genética están determinadas en gran medida por sucesos aleatorios. Estos sucesos son importantes en varios momentos a lo largo del ciclo anual. El tamaño de las poblaciones está sujeto a enormes fluctuaciones como consecuencia de una serie de factores tales como predación intensa, condiciones fisiológicas poco óptimas del hospedador y condiciones climáticas desfavorables. En las épocas de migración entre los dos hospedadores en especies heteroicas, o entre distintos tipos de hospedadores en especies relativamente polífagas, se producen cuellos de botella importantes en las poblaciones de

pulgones. Como consecuencia, en poblaciones de tamaño reducido, se puede llegar a la fijación de genotipos. En el caso de las especies o poblaciones anholocíclicas no sólo se puede producir la fijación de genotipos homocigóticos sino también de genotipos heterocigóticos (Tomiuk y Wöhrmann, 1984; Voegtlin et al., 1987). Pero esto no implica necesariamente una ausencia total de variabilidad genética, existiendo algunos mecanismos que contrarrestan los efectos de la deriva: la recombinación en especies o grupos con reproducción sexual, la migración, tasas diferenciales de predación en distintos hospedadores, y diferentes tasas reproductivas en hospedadores diferentes.

La mayoría de los estudios sobre polimorfismo en las poblaciones de áfidos se han basado fundamentalmente en el análisis de diferentes caracteres de historia de vida y del polimorfismo enzimático. Mientras que el estudio de los primeros ha revelado un amplio polimorfismo (MacKay, 1993), los segundos han puesto de manifiesto una variabilidad limitada. Así, en estudios de polimorfismo enzimático, mientras Ayala (1984) estima la heterocigosidad media en invertebrados en 0.10, en áfidos Tomiuk (1987) estimó un valor de un orden de magnitud menor. Sin embargo, factores como el tipo de ciclo de vida desarrollado o el rango de hospedadores utilizado hacen que de unas especies a otras puedan existir grandes diferencias en los valores estimados de polimorfismo y heterocigosidad (Wöhrmann y Hales, 1989). En este sentido, estudios comparativos de polimorfismo enzimático en especies con fase sexual y en especies exclusivamente partenogenéticas parecen apoyar la idea de que estas últimas poseen menor variabilidad genética (Wöhrmann y Tomiuk, 1988).

La pérdida de la capacidad de reproducción sexual de forma independiente en diferentes poblaciones de una misma especie, y la adaptación diferencial a distintos hospedadores, son los mecanismos básicos que han propiciado la aparición de poblaciones o razas aisladas reproductivamente en varias especies de áfidos. Es por ello que los áfidos representan un grupo ideal de organismos sobre los que plantear cuestiones básicas de la biología y la genética de poblaciones. ¿Representan estas poblaciones grupos aislados reproductivamente?; ¿en qué grado han divergido?; ¿cuando se ha producido esta divergencia?; ¿ha sido una divergencia simpátrica o alopátrica?; ¿cuales son las relaciones filogenéticas entre estas poblaciones?. Todas estas cuestiones tienen gran relevancia teórica, pero también práctica por cuanto el diseño de estrategias para el control de las especies consideradas plaga dependerá en parte de las respuestas.

La mayor parte de los estudios sobre la estructura y la dinámica de las poblaciones de áfidos se ha basado en el análisis de los polimorfismos enzimáticos (Tomiuk and Wöhrmann, 1984; Loxdale et al., 1983, 1985a, b; Loxdale and Brookes, 1988; Steiner et al., 1985). La mayor limitación del uso de alozimas ha sido los bajos niveles de variabilidad genética detectados. Es por ello que en los últimos años se han empezado a utilizar técnicas basadas en la manipulación y análisis del DNA: estudios de variabilidad del DNA mitocondrial (Powers et al., 1989; Martínez et al., 1991), técnicas de "fingerprinting" (Lupoli et al, 1990; Black, 1990;

Carvalho et al., 1991) y análisis basados en la amplificación de fragmentos específicos o aleatorios de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Black IV et al., 1991; Cenis et al., 1993).

L3. RHOPALOSIPHUM PADI: UN AFIDO MODELO.

El pulgón conocido en inglés como "bird cherry-oat aphid", *Rhopalosiphum padi* (L.), está ampliamente reconocido como un importante insecto plaga de cereales. Puede producir importantes pérdidas en los cultivos cerealícolas tanto por la acción directa de su alimentación, al consumir parte del floema de la planta, como por la transmisión del virus del enanismo amarillo de la cebada (Barley Yellow Dwarf Virus o BYDV), que es considerado como el virus de mayor importancia económica en cultivos de cereal a nivel mundial (Burnett, 1984; Blackmer y Bishop, 1991). La importancia relativa de ambos tipos de daños es diferente según zonas geográficas. Así, en los países del norte de Europa el calificativo de plaga lo debe principalmente a los daños directos que produce en los cultivos (Leather et al., 1989), mientras que en el resto de Europa y América del Norte merece tal calificativo por ser un importante vector del BYDV (Carter et al., 1980; Gillet et al., 1990; Plumb, 1983; Caldwell et al., 1983; Rothman et al., 1959; Gill, 1980), demostrando en algún caso ser el vector más importante del virus (Halbert et al., 1992). En el caso concreto de España, *R. padi* es responsable de la transmisión de los dos serotipos más predominantes de este virus (PAV y RPV) a los cultivos de cereal de invierno (Fereres et al., 1989).

Rhopalosiphum padi (L.) es un áfido presumiblemente de origen paleártico aunque en la actualidad se puede considerar como virtualmente cosmopolita (Blackman y Eastop, 1985; Zapparoli, 1993). Es una especie heteroica entre *Prunus* y gramíneas. La fase sexual de su ciclo biológico se desarrolla sobre un hospedador primario leñoso del género *Prunus*. Presenta en esta fase una clara preferencia por la especie *Prunus padus* (L) (Dixon y Glen, 1971) aunque también se ha descrito sobre otras especies espontáneas y ocasionalmente sobre especies cultivadas del mismo género (Blackman y Eastop, 1985; Nieto Nafria, 1974). Como hospedadores secundarios puede encontrarse sobre un gran número de especies de gramíneas espontáneas y cultivadas, incluyendo los cereales más habituales y las gramíneas para pasto. También se ha descrito sobre *Cyperaceae*, *Iridaceae*, *Juncaceae* y *Typhaceae*.

Su ciclo biológico completo (holociclo) se inicia con el huevo de invierno depositado sobre *P. padus* del que nace en la primavera la fundatrix que se alimenta sobre las yemas y el envés de las hojas de su hospedador. La fundatrix inicia una línea partenogenética o clon en el que a una o unas pocas generaciones de individuos desarrollados sobre el hospedador primario le suceden las formas emigrantes aladas que colonizarán los hospedadores secundarios. En estos se sucederán una serie de generaciones partenogenéticas de exiladas ápteras y aladas a lo

largo del verano. Al final del verano nacen las ginóparas, que son aladas y que retornarán al hospedador primario en donde darán lugar a las ovíparas (hembras sexuadas). Estas últimas se aparearán con los machos alados y depositarán el huevo de invierno que iniciará un nuevo ciclo. Los machos generalmente nacen de las mismas hembras que dieron lugar a las ginóparas pero retrasados en el tiempo respecto a ellas, previniendo en gran medida apareamientos endogámicos por cuanto el retorno al hospedador primario se realiza de forma separada en el tiempo. El polifenismo asociado con las diferentes partes del ciclo biológico es amplio (ver Figura 5.I.).

Los clones de *R. padi* con este tipo de ciclo presentan tres periodos migratorios separados (Wiktelius et al., 1990): el primero, en la primavera, cuando los áfidos abandonan el huésped primario en busca de los cereales que están empezando su crecimiento; un segundo periodo, en verano, en el que con la senescencia de los cereales, los sustituyen por otras gramíneas espontáneas; finalmente el tercer periodo migratorio se produce en otoño cuando se produce la recolonización del hospedador primario (*P. padius*).

Bajo ciertas circunstancias tales como inviernos suaves y/o escasez del hospedador primario, *R. padi* puede desarrollar un ciclo vital incompleto (anholociclia) pasando también el invierno como generaciones partenogénicas sobre rebrotes de cereal o cereales de invierno (Dedryver, 1987) o sobre hierbas espontáneas (Henry, 1988) cuyo papel como reservorios del BYDV puede ser importante (Fargette et al., 1982). La Figura 6.I. esquematiza los dos tipos básicos de ciclo de vida que se pueden observar en esta especie. Además de estos dos ciclos, en *R. padi*, al igual que en *Myzus persicae* (Blackman, 1971; 1972), se pueden encontrar también clones de tipo androcíclico (los únicos individuos sexuados que se producen son machos) y otros de respuesta intermedia (junto con hembras partenogénicas se producen unos pocos machos y unas pocas ovíparas) (Tatchell y Parker, 1990; Simon et al., 1991). En el laboratorio se puede inducir de forma experimental, mediante la simulación de condiciones de invierno, la aparición de formas sexuales y determinar, por tanto, el tipo de ciclo vital que presenta un determinado clon (Dixon and Glen, 1971; Simon et al., 1991).

En una misma zona geográfica pueden coexistir clones holocíclicos y anholocíclicos al mismo tiempo, como sucede en Gran Bretaña y Francia (Dedryver y Gellé, 1982; Tatchell et al., 1988; Simon et al., 1991). Este hecho puede ser importante en la demografía anual de la especie y puede tener una especial incidencia en la expansión del BYDV en otoño en esas zonas dado que no todas las formas son igualmente infectivas. En los clones holocíclicos es altamente improbable que aquellos individuos destinados a regresar al hospedador primario (ginóparas y machos) infecten gramíneas. Además, los individuos que abandonan el huésped primario en la primavera están libres de virus y no contribuyen a la infección de los cultivos primaverales que colonizan. Por el contrario, los clones anholocíclicos o parcialmente anholocíclicos han de considerarse como reservorios potencialmente permanentes del virus ya que no pasan por ninguna fase de "purificación". En este contexto es importante señalar que

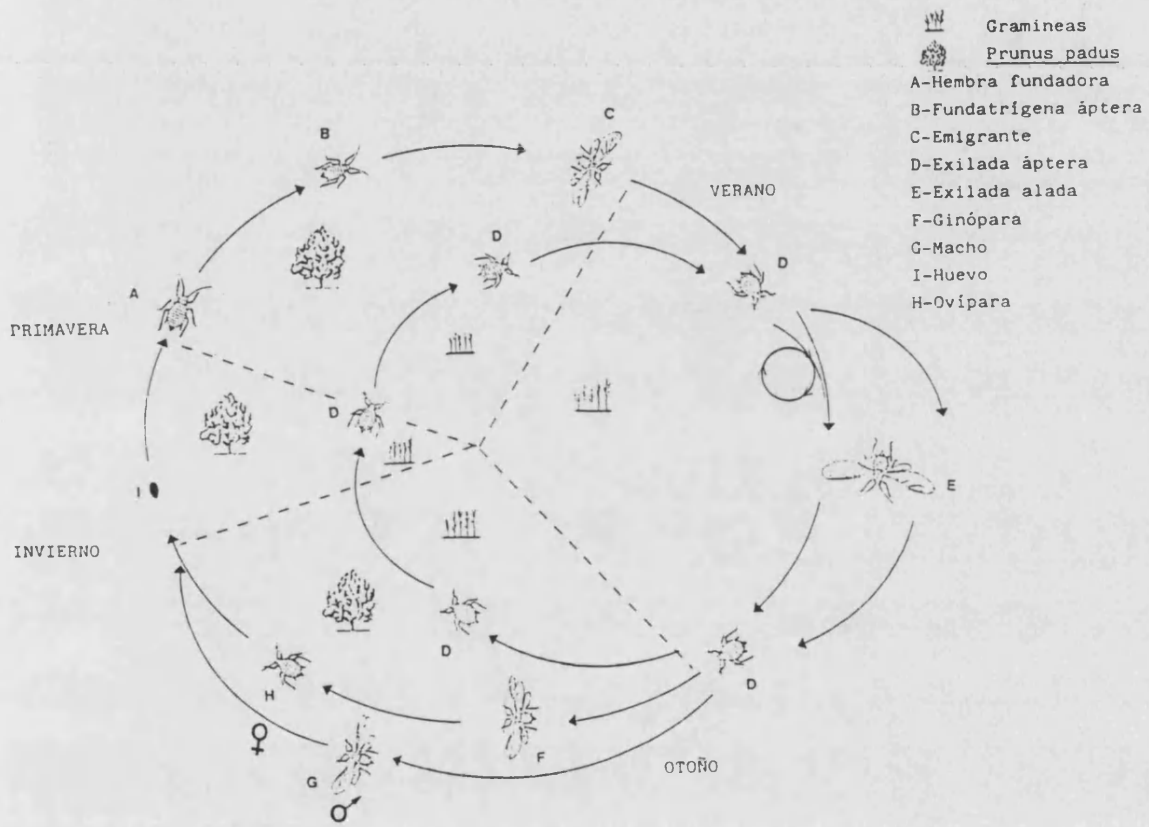


Figura 6.I. Esquema que representa los dos tipos de ciclo de vida que puede desarrollar el áfido *R. padi*.

las poblaciones españolas más estudiadas (provincias de Lérida y Madrid) parecen comportarse exclusivamente de forma anholocíclica (Pons, 1986; Fereres et al., 1990).

Desde el punto de vista de la epidemiología del BYDV es importante conocer el nivel de migración entre poblaciones del áfido, así como la proporción de clones en cada población con uno u otro tipo de ciclo vital (Simon et al., 1991).

Movimientos migratorios a través de distancias largas producirían explosiones víricas en un área determinada aún no existiendo reservorios locales del virus conocidos, y por tanto sería inútil erradicar dichos reservorios allí donde existan. Sobre este aspecto existen puntos de vista divergentes en la literatura: mientras que Tatchell et al. (1988) sugieren una dispersión local del virus en Inglaterra, Paliwal (1982) propone que los reservorios locales tienen poca incidencia como fuentes de inóculo del virus en el Este de Canadá. En este mismo sentido, Loxdale (1988) basándose en la distribución espacial y temporal de las frecuencias alélicas de dos sistemas alozímicos concluye que los niveles de flujo genético en *R. padi* son elevados.

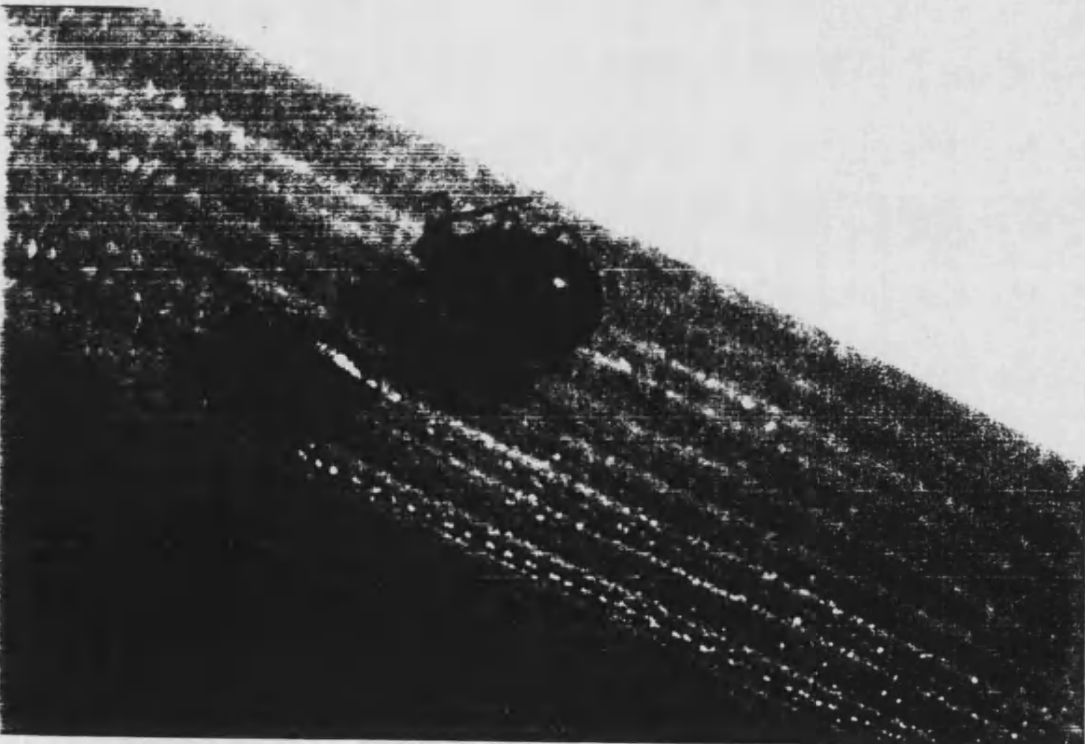
Por otro lado, sería deseable, por las razones mencionadas anteriormente, poder caracterizar las poblaciones en cuanto a su composición en clones holocíclicos y anholocíclicos así como estimar los niveles de migración de ambos tipos de clones.

El calificativo de "modelo" aplicado a *R. padi* con que se encabeza el presente apartado ha de ser contemplado desde la perspectiva del conjunto de características que presenta esta especie y que son comunes total o parcialmente a otras muchas especies de áfidos. Cabe destacar entre estas características su amplio polifenismo, la variabilidad existente en el tipo de ciclo de vida desarrollado por diferentes clones y su status de insecto plaga tanto por los daños directos que produce en los cultivos de cereales en muchas áreas, como por su importancia como transmisor de virosis en otras.

a)



b)



c)



d)

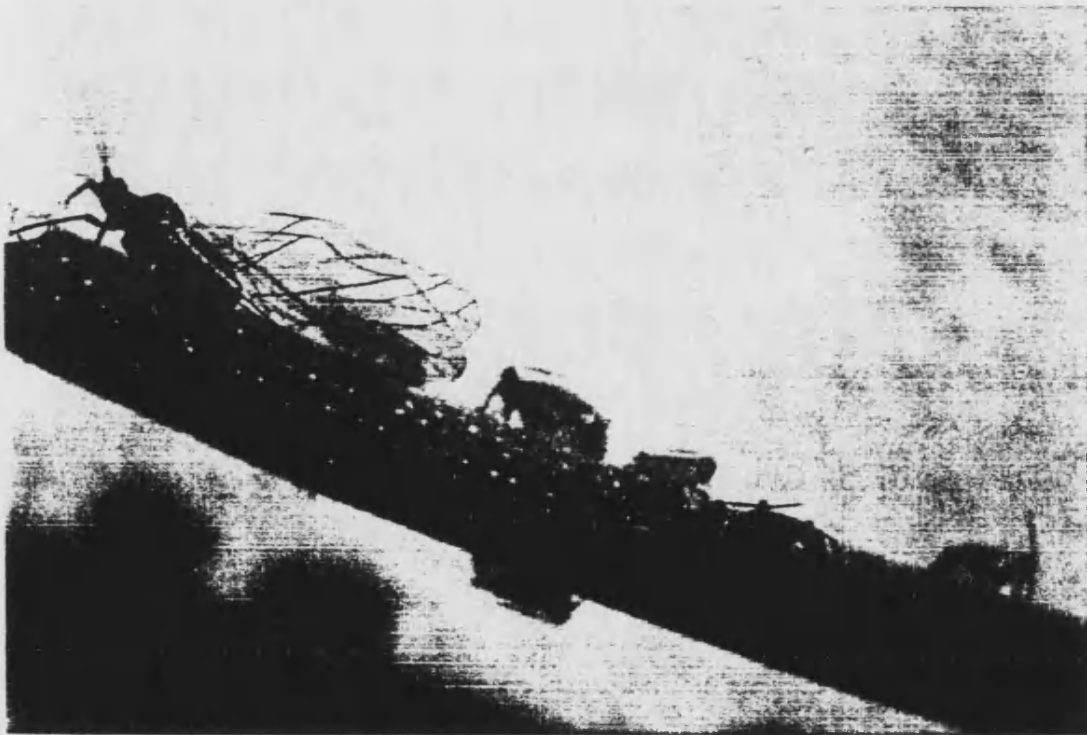


Figura 5.I. Polifenismo asociado a algunas fases del ciclo biológico de *R. padi*. a) Exilada áptera y alada. b) Exilada áptera y hembra sexuada. c) Ginópara y macho. e) Colonia formada por una exilada alada.

I.4. EL DNA MITOCONDRIAL COMO MARCADOR GENETICO.

En la última década, el análisis del DNA mitocondrial (mtDNA) se ha consolidado como una herramienta muy útil en estudios evolutivos de animales. Estos estudios han permitido profundizar en el conocimiento de la estructura poblacional y flujo génico, hibridación, biogeografía, y relaciones filogenéticas de gran número de especies animales. Existe un gran sinergismo entre los dos grandes campos de investigación del mtDNA: los estudios evolutivos proporcionan datos sobre organización y función, y las investigaciones moleculares contribuyen a aumentar el nivel de sofisticación de los estudios evolutivos basados en el mtDNA.

I.4.1. Características básicas del mtDNA.

Dado que una parte fundamental de la presente tesis se basa en el análisis de la variabilidad del mtDNA, describiremos con cierto detalle algunas de las características más relevantes de su organización y función así como los principales mecanismos generadores de variabilidad.

I.4.2. Organización y función.

El mtDNA de animales presenta una serie de características que se pueden considerar generales. Con una sola excepción documentada en *Hydra* (Warrior and Gall, 1985), es una molécula de DNA de doble cadena, circular y covalentemente cerrada que se hereda por vía materna, aunque se han descrito unos pocos casos de herencia biparental (Kondo et al, 1990; Hoech et al., 1991). Su tipo de herencia tiene implicaciones importantes en los estudios poblacionales ya que hace que el tamaño efectivo de las poblaciones sea menor para el mtDNA que para genes nucleares y esto es de especial relevancia al considerar los procesos estocásticos que afectan a las poblaciones.

Junto a la herencia materna, la otra característica fundamental del mtDNA es la ausencia de recombinación que hace que la molécula entera represente un único marcador genético. Ello proporciona una alta resolución en el establecimiento de genealogías maternas y permite discriminar entre identidad por descendencia y convergencia.

El tamaño de la molécula en animales es relativamente pequeño oscilando entre 14 kb en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Okimoto et al., 1992) y 42 kb en el bivalvo *Placoepecten magellanicus* (LaRoche et al., 1990) aunque el tamaño más comúnmente encontrado está próximo a las 16 kb.

Actualmente se han secuenciado completamente los genomas mitocondriales de varios representantes de siete *phyla* animales que incluyen cinco mamíferos (Anderson et al., 1981 y 1982; Bibb et al., 1981; Gadaleta et al., 1989; Arnason et al., 1991), un ave (Desjardins and Morais, 1990), un anfibio (Roe et al., 1985), tres equinodermos (Jacobs et al., 1988; Cantatore

et al., 1989), tres artrópodos (Clary y Wolstenholme, 1985; Valverde, 1992;...), tres nemátodos (Wolstenholme et al., 1987; Okimoto et al., 1991 y 1992), y un cnidario (Pont et al., 1992; Beagley et al., 1992). Existen además innumerables datos sobre secuencias parciales de genomas mitocondriales de otros muchos representantes de estos y de otros grupos de animales. De estos datos emergen cuatro características básicas de la estructura del mtDNA de metazoos:

- a) Disposición muy compacta, incluso solapada, de los genes, con pocas o ninguna secuencias intergénicas que, de existir, se limitan a unos pocos nucleótidos.
- b) Ausencia de intrones en los genes estructurales con una única excepción descrita (Beagley et al., 1992).
- c) Distribución dispersa de los genes de tRNA entre los restantes genes.
- d) Existencia de una región control no codificante que contiene secuencias esenciales para el inicio de la replicación y la transcripción.

Con algunas excepciones el contenido génico en todos los grupos animales es el mismo aunque existe gran variación en cuanto a la disposición relativa de algunos genes o grupos de genes en los distintos grupos. El genoma mitocondrial contiene genes para dos RNA ribosómicos, 22 tRNAs (excepto en el cnidario *Metridium senile* que solo contiene dos) y 13 proteínas. Los dos RNAs ribosómicos son homólogos a los RNAs ribosómicos 16s y 23s de *E. coli* aunque más pequeños: el pequeño (srRNA) de 12s y el grande (lrRNA) de 16s. Las 13 proteínas son enzimas o componentes de enzimas implicados en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y en la fosforilación oxidativa: Cytb, apoenzima del complejo ubiquinol-citocromo *c* reductasa; COI, COII y COIII, subunidades de la citocromo *c* oxidasa; ATPasa6 y ATPasa8, esta última ausente en el mtDNA de nemátodos (Wolstenholme et al., 1987; Okimoto et al., 1991; 1992a, c), corresponden a las subunidades 6 y 8 de la fracción F_0 de la ATP sintetasa; ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6, todas ellas subunidades del complejo de la NADH deshidrogenasa de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Cada filum parece tener una ordenación particular de todos estos genes (Figura 4.I.), existiendo diferencias incluso dentro de los fila. Así, peces, anfibios y mamíferos tienen el mismo orden, pero en aves sería ligeramente diferente (Desjardins and Morais, 1990; 1991). Comparando con los vertebrados, el mitocondrial de insectos y equinodermos presenta reordenaciones de los genes de proteínas y rRNAs que se explican por un número limitado de transposiciones, mientras que la disposición de estos genes en el resto de grupos de invertebrados parece mucho menos relacionada. La disposición de los genes de los tRNAs en invertebrados presenta una gran variación incluso dentro de un mismo filum.

Por otra parte, la región control posee características diferentes en distintos grupos. Así, en vertebrados y equinodermos contiene un "loop" con una topología característica, razón por la cual a esta región se la denomina "D-loop". En insectos y nemátodos esta estructura no existe, caracterizándose la región control por un elevadísimo contenido en adenina y timina, y

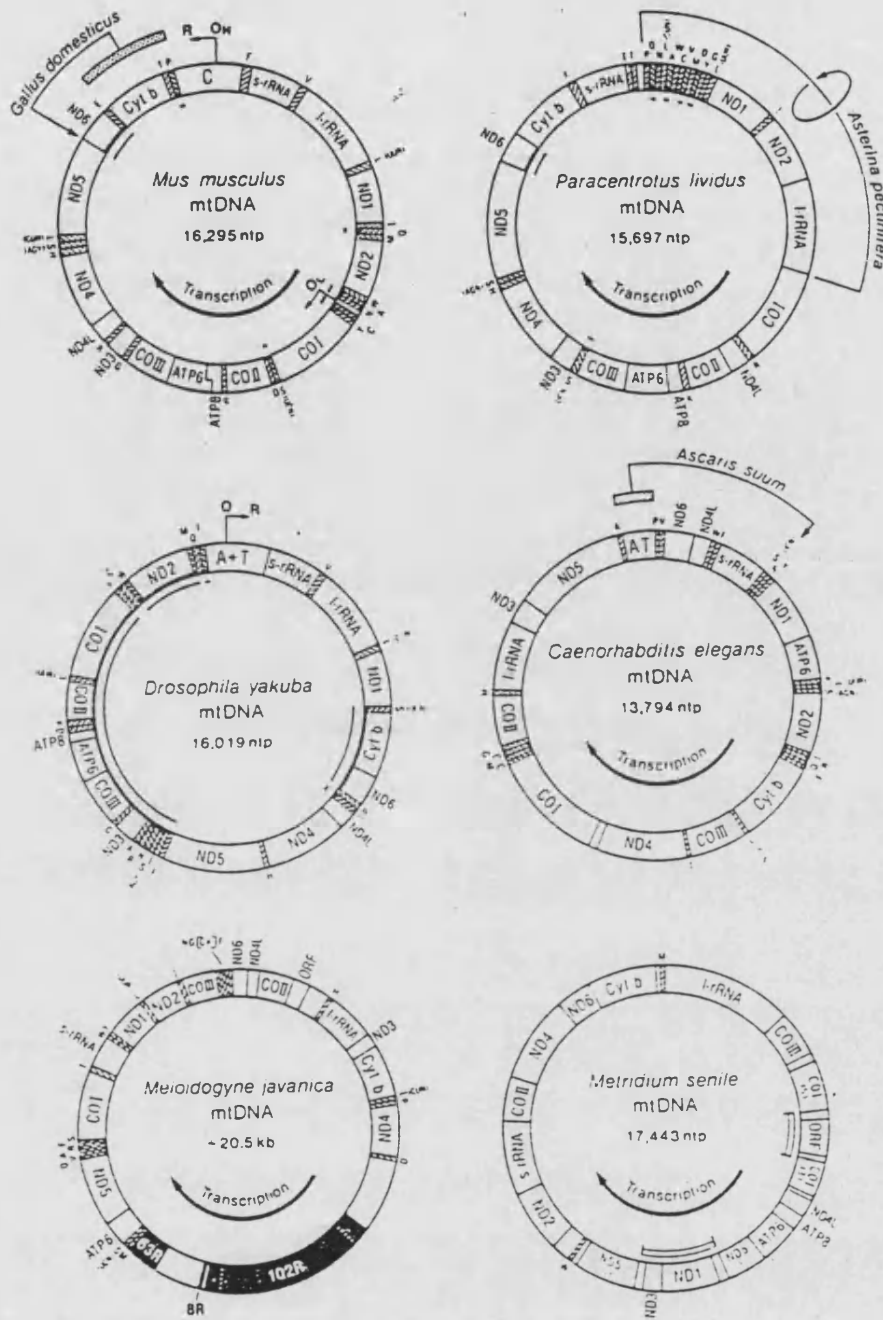


Figura 4.I. Mapas g3nicos de las mol3culas de mtDNA de un mam3fero (*Mus musculus*; Bibb et al., 1981), un insecto (*Drosophila yakuba*; Clary y Wolstenholme, 1985), un equinodermo (*Paracentrotus lividus*; Cantatore et al., 1989), dos nematodos (*Caenorhabditis elegans* y *Meiodogyne javanica*; Okimoto et al., 1991, 1992a, c), y un cnidario (*Metridium senile*; Beagley et al., 1992). El nombre de los genes es el mismo que el utilizado en el texto con excepci3n de los tRNAs, que en la figura se identifican con el c3digo de una letra correspondiente a su amino3cido. Otras ordenaciones encontradas en organismos pr3ximos a los aqu3 representados as3 como los cambios acontecidos se indican sobre el mapa correspondiente. (Tomado de Wolstenhome, 1992).

de ahí el nombre de región rica en A+T en estos grupos. La forma en que esta región participa en la replicación y transcripción del mtDNA sólo se conoce con cierto detalle en vertebrados (Clayton, 1991), aunque algunos aspectos son generales a todos los grupos. El mtDNA se replica autónomamente a lo largo del ciclo celular de un modo regulado y coordinado con la expresión nuclear (Kruse et al., 1989). La replicación del mtDNA es unidireccional a partir de un origen de replicación localizado en la región control, y altamente asimétrica, siendo el grado de asimetría variable entre y dentro de grupos (Wolstenholme et al., 1974; Goddard and Wolstenholme, 1978; 1980). Por otra parte, la transcripción (al menos en mamíferos) también se inicia en esta región, dando lugar a transcritos primarios de las dos cadenas que habrán de ser procesados para dar lugar a los transcritos mono o bicistrónicos maduros. Se ha sugerido que la distribución compacta de los genes está relacionada con este proceso, y que los tRNAs actuarían como señales en el procesado de los transcritos policistrónicos (Battey and Clayton, 1980; Ojala et al., 1980).

Es también destacable el hecho de que el código genético mitocondrial es diferente del universal y que este código mitocondrial no es único, sino que presenta ciertas variaciones en los distintos grupos estudiados (Wolstenholme, 1992). Los 22 tRNAs presentes en el mtDNA de la mayoría de los grupos animales son suficientes para la decodificación de los 12 o 13 genes mitocondriales que codifican para proteínas. Ello es debido a que cada tRNA es capaz de "leer" todos los codones de una misma familia de cuatro codones (Barrell et al., 1980; Anderson et al., 1981).

Otra característica relevante del mtDNA es el sesgo en la utilización de los cuatro nucleótidos. Así, en los genes que codifican proteínas en vertebrados, hay una baja proporción de guanina, y en insectos y otros invertebrados el contenido global en A+T es muy alto (70%-80%) llegando a valores extremos en la tercera posición de los codones (94% en *Drosophila yakuba*) (ver tabla VIII de Wolstenholme, 1992).

I.4.3. Variabilidad del DNA mitocondrial.

Además de las reordenaciones producidas en la disposición de los genes en el mtDNA de los diferentes grupos, las dos principales fuentes de variación en el mtDNA de metazoos son las sustituciones nucleotídicas y las variaciones en la longitud de la molécula.

Con respecto al primer tipo de variación cabe destacar las diferentes tasas de sustitución nucleotídica que se pueden encontrar en diferentes organismos. Así, frente a un rango de 5 a 10 veces mayor tasa evolutiva del mtDNA respecto a los genes nucleares de copia única en vertebrados (Brown, 1985; Wilson et al., 1985; Cantatore y Saccone, 1987), en *Drosophila* y equinodermos parece que ambos tipos de moléculas evolucionan con tasas similares (Powell et al., 1986; Solignac et al., 1986; Vawter y Brown, 1986). Las especies hawaianas de *Drosophila* son una excepción dentro de los invertebrados, ya que su mtDNA evoluciona con una tasa unas cuatro veces superior a la de sus genes nucleares de copia única

(DeSalle y Templeton, 1987). Algunos autores han propuesto, sin embargo, que es la tasa evolutiva de los genes nucleares de copia única la que variaría de unos organismos a otros (Vawter y Brown, 1986).

Estudios comparativos entre grupos altamente relacionados han puesto de manifiesto que un tipo de sustitución nucleotídica es más frecuente que otro: las transiciones (cambio de purina a purina o de pirimidina a pirimidina) superan con mucho a las transversiones (cambios de purina a pirimidina o viceversa), aunque este sesgo se hace menos patente, hasta desaparecer, a medida que aumenta la divergencia entre las secuencias comparadas. La razón entre transiciones y transversiones observada en especies próximas de mamíferos es 9:1 (Brown, 1982), llegando en *Drosophila* a una relación de 11:1 (DeSalle et al., 1987), cuando la relación teórica esperada es de 1:2.

Las tasas de sustitución nucleotídica son, además, diferentes en los distintos elementos funcionales de la molécula disminuyendo según el siguiente orden : región control, genes que codifican para proteínas, y genes para rRNAs y tRNAs.

Otra característica importante es que una alta proporción (más del 90% en vertebrados) de las sustituciones son silenciosas aunque ello no quiere decir que sean necesariamente neutras (Moritz et al., 1987). Desde la óptica neutralista, la frecuencia de uso de codones alternativos debería ser la misma, dadas iguales tasas de mutación (Li et al., 1985; Kimura, 1983), pero sin embargo el patrón de uso de codones es marcadamente no aleatorio, con una deficiencia general de codones acabados en G (Pepe et al., 1983), y un fuerte sesgo hacia codones acabados en A o en T en *Drosophila* (Clary y Wolstenholme, 1985). En este contexto es de destacar el alto contenido en A+T del genoma mitocondrial de *Drosophila* (74%-80%) y probablemente de insectos en general, y que puede reflejar algún tipo de adaptación hacia un uso más eficaz de estas bases por las polimerasas (Clary y Wolstenholme, 1985; Wolstenholme y Clary, 1985; Jukes y Bhushnan, 1986).

Por lo que respecta a la variación en longitud del mtDNA, cada vez parece más claro que este tipo de variación es frecuente en los genomas mitocondriales animales (Buroker et al., 1990; Arnason y Rand, 1992; Moritz and Brown, 1987; Mignotte et al., 1990; Edwards and Wilson, 1990; Gjetvaj et al., 1992; Cornuet et al., 1991; Harrison et al., 1985; Hale and Singh, 1986; Solignac et al., 1986; Matsuura et al., 1991). Moritz et al. (1987) proponen tres tipos generales de variación en tamaño del mtDNA:

- a) Pequeños cambios en el número de nucleótidos en secuencias homopolímeras.
- b) Diferencias en el número de copias de secuencias relativamente cortas repetidas en tandem.
- c) Deleciones o duplicaciones de fragmentos relativamente grandes.

Aunque se han descrito casos en los que ciertos genes estructurales están implicados en estos sucesos (Moritz and Brown, 1987; Boursot et al., 1987;), la mayor parte del polimorfismo de tamaño descrito en el mtDNA de animales reside o implica de una u otra

forma a la región control de la molécula (D-loop en vertebrados y región rica en A+T en insectos).

De los estudios basados en la comparación de especies próximas (Hoelzel et al., 1991; Solignac et al., 1986; Monforte et al., 1993) y de aquellos que centran su atención en la variación intraespecífica (Rand and Harrison, 1989; Brown et al., 1992; Arnason and Rand, 1992) se deduce que no existe una correlación entre los patrones de polimorfismo de longitud observados y relación taxonómica entre especies. Este hecho sugiere que el mecanismo generador de este tipo de polimorfismo ha de estar basado en algún suceso de tipo aleatorio.

Una característica del polimorfismo de longitud del mtDNA, que lo hace ciertamente distinto del polimorfismo originado por sustituciones nucleotídicas, es su frecuente asociación con fenómenos de heteroplasmia (coexistencia de más de una variante de mtDNA en un mismo individuo). Se han propuesto diferentes mecanismos moleculares que tratan de explicar satisfactoriamente y de forma conjunta este fenómeno y la ya mencionada distribución errática en los grupos taxonómicos del polimorfismo de tamaño del mtDNA (Levinson and Gutman, 1987; Rand and Harrison, 1989; Buroker et al., 1990;...)

I.4.4. Aplicaciones del análisis del mtDNA a la biología de poblaciones.

La transmisión por vía materna, evolución relativamente rápida y ausencia de recombinación del mtDNA proporciona varios tipos de información única que han contribuido a su amplia utilización como marcador genético en estudios de estructura poblacional y filogenéticos.

La teoría genético-poblacional (Birky et al., 1983; Birley and Croft, 1986; Takahata and Palumbi, 1985; Maynard Smith, 1989) sugiere que el mtDNA es un marcador particularmente apropiado para el estudio de diversos acontecimientos poblacionales: estructuración biogeográfica, flujo genético mediado por hembras, colonizaciones e introducciones recientes, cuellos de botella, historia evolutiva reciente de especies (incluidos los taxones híbridos) y dinámica de las zonas de hibridación entre especies. Dadas sus peculiares características, es esperable que los marcadores mitocondriales muestren mayor grado de variación entre demes que los nucleares, especialmente en aquellos casos en que las hembras sean más sedentarias que los machos.

Aunque mediante la secuenciación, hoy facilitada por las técnicas de amplificación del DNA (PCR), se puede llegar a una completa caracterización de las bases moleculares de la variabilidad del mtDNA, la mayor parte de los estudios de polimorfismo del mtDNA en poblaciones naturales se han basado en la utilización de enzimas de restricción que fragmentan el mtDNA en un conjunto discreto de fragmentos. Así, las diferencias en el patrón de fragmentos producido por un determinado enzima o, generalmente, por un conjunto de ellos pueden ser utilizadas como marcadores genéticos. La comparación de tales patrones o de los mapas de sitios de restricción deducidos de ellos permite una estimación de la distancia

genética entre los mtDNA comparados o la realización de los apropiados análisis filogenéticos (Nei, 1987).

Son abundantes los casos descritos de elevado polimorfismo intraespecífico del mtDNA asociado a una importante diferenciación geográfica (ver revisiones de Avise, 1986 y Avise and Lansman, 1983). Sin embargo en algunas especies (Avise et al., 1986; Brown, 1980; Cann et al., 1987; Dowling and Brown, 1987; Graves et al., 1984), la diversidad del mtDNA es reducida, sugiriendo que en estas especies es frecuente la dispersión mediada por las hembras o que han sufrido cuellos de botella recientes.

El análisis del mtDNA también se ha usado para datar acontecimientos de la historia evolutiva de distintas especies considerando que la diversidad del mtDNA en una especie está correlacionada con el tiempo transcurrido desde un ancestro materno común. En este contexto es interesante señalar la controversia surgida tras la afirmación por Cann et al. (1987) de que todos los DNAs mitocondriales humanos actuales proceden de un ancestro común que vivió hace unos 200.000 años. Esta hipótesis conocida como "hipótesis de la madre Eva" se ha de entender bajo la óptica de que aunque en el tiempo en que vivió este ancestro común vivieran varios miles de hembras más, hay una alta probabilidad de que solo uno de sus mtDNAs perviviese hasta la actualidad (Avise et al., 1984; Latorre et al., 1986; Avise, 1986).

Los estudios de variabilidad del mtDNA han proporcionado así mismo un nuevo tipo de evidencia para inferir la historia de taxones con reproducción partenogenética y para revelar fenómenos de introgresión (transmisión de un linaje mitocondrial de una especie a otra a través de híbridos fértiles). El primer estudio de este tipo fue el de Brown and Wright (1979) en el que consiguieron identificar el ancestro materno de una especie partenogenética de lagartija (*Cnemidophorus*) y estimar el tiempo de divergencia respecto a sus antecesores de reproducción sexual.

En especies partenogenéticas, niveles bajos de diversidad del mtDNA pueden ser explicados de forma distinta que en especies con reproducción sexual, contemplándose la idea de una evolución reciente a partir de una única hembra. Los individuos partenogenéticos proceden de un único progenitor, por lo que la extinción estocástica de un linaje mitocondrial se corresponde exactamente (y aquí radica la diferencia con respecto a las especies de reproducción sexual) con la extinción de un clon unisexual con su correspondiente sustrato genético nuclear (Moritz et al., 1987).

Las excelencias de la utilización del mtDNA en estudios poblacionales no han de ser consideradas, sin embargo, como absolutas. Los estudios basados en marcadores genéticos mitocondriales asumen que estos son neutrales y que la frecuencia de retromutación es despreciable. Sin embargo estas asunciones no han de ser necesariamente correctas. Otra fuente potencial de error es la extinción aleatoria de linajes mitocondriales que puede generar clusters geográficos de mtDNAs relacionados, o marcadas diferencias entre mtDNAs de demes

próximos. En estos casos se observaría una falta total de concordancia con las conclusiones inferidas a partir de marcadores nucleares.

II. OBJETIVOS.

El objetivo inicial del presente trabajo era determinar el grado de estructuración y la dinámica poblacional de diferentes poblaciones españolas del áfido *Rhopalosiphum padi* mediante la utilización de marcadores genéticos que, como el DNA mitocondrial pudiesen revelar niveles de polimorfismo que las técnicas más clásicas habían sido, en general, incapaces de detectar en diferentes especies de áfidos. El desarrollo de este objetivo nos condujo a plantear la cuestión desde una perspectiva más general que considerase aquellos aspectos que pudiesen ser determinantes de la estructura genética global de la especie. Paralelamente, y en el contexto de la evolución del DNA mitocondrial en insectos, nos propusimos caracterizar molecularmente la región control de esta molécula en *R. padi* con el fin último de contribuir al todavía escaso conocimiento sobre pautas generales de organización y funcionamiento de esta región en dichos organismos.

Estos dos planteamientos iniciales se pueden desglosar en los siguientes objetivos:

1. Caracterizar molecularmente la región control del DNA mitocondrial de *R. padi* realizando un estudio comparativo con los insectos en que esta región ha sido mejor descrita tratando de indagar en la existencia de elementos comunes que pudieran servir de base al establecimiento de algún tipo de generalización sobre la organización de esta región en insectos.
2. Determinar los niveles de polimorfismo existentes en diferentes poblaciones de *R. padi* mediante el empleo de marcadores moleculares, centrándonos principalmente en el análisis del DNA mitocondrial.
3. Tratar de establecer según la distribución de los polimorfismos detectados cómo se estructuran las poblaciones del áfido o al menos explicar los patrones de variación observados para la especie en su conjunto en el área estudiada.
4. Discutir a la luz de los resultados obtenidos la conveniencia de profundizar en el empleo de este tipo de marcadores para la realización de estudios poblacionales puntuales que puedan tener un interés aplicado.

III MATERIAL Y MÉTODOS.

Dado que la mayoría de técnicas utilizadas en la presente tesis son de uso rutinario en cualquier laboratorio de Genética Molecular únicamente describiremos con cierto detalle aquellos aspectos que puedan ser novedosos o presenten alguna peculiaridad, limitándonos por lo demás a citar el proveedor o la reseña bibliográfica correspondiente.

III.1 Clones y stocks de *R. padi*

En la presente tesis se han analizado un total de 148 clones de *Rhopalosiphum padi* pertenecientes a 11 zonas geográficas diferentes (Figura 1.III). Todos los clones excepto los franceses e ingleses fueron establecidos a partir de muestreos en campo realizados en cuatro regiones españolas durante primavera y otoño los años 1989, 1990, 1991, 1992 y 1993. En cada zona de muestreo se capturaron pulgones con ayuda de un pincel sobre plantas alejadas en un área de 5 a 10 km para minimizar la probabilidad de capturar la progenie de un mismo pulgón.

Los clones franceses e ingleses proceden de stocks existentes en el centro de Rennes del INRA (Francia) y fueron amablemente cedidos por el Dr. J. C. Simon, quién previamente había caracterizado su ciclo de vida de acuerdo con su respuesta a condiciones de invierno reproducidas en el laboratorio (Dixon and Glen, 1971). En principio, estos clones no pueden considerarse como un muestreo aleatorio de las zonas en que fueron capturados originalmente ya que fueron elegidos atendiendo a su ciclo biológico, de forma que tuviésemos un número suficiente de clones caracterizados como holocíclicos y como anholocíclicos.

En todos los casos se fundaron clones ("clonación") a partir de una única hembra partenogenética y se multiplicaron separadamente sobre trigo (variedad Talento). Para evitar contaminaciones, una vez colocados los pulgones sobre el tiesto de trigo, este se sellaba con un cilindro de plástico transparente que poseía seis ventanas y su base superior cubiertas con tela de gasa para impedir la condensación de agua debida a la transpiración de las plantas de trigo (Figura 2.II.). Los clones fueron mantenidos en el laboratorio junto a una ventana en condiciones de fotoperiodo variable según la época del año y a una temperatura constante, en la medida de lo posible, de 21°C.

En la Tabla 1.III quedan resumidos todos los datos referentes a los muestreos así como otros datos de relevancia, tales como la planta sobre la que se realizó el muestreo y tipo de ciclo de vida, en los clones en que este dato era conocido *a priori*.



Figura 1.II. Localización geográfica de los puntos de muestreo del áfido *Rhopalosiphum padi* y número de clones analizados de cada localidad. El asterisco indica que sólo se pudieron caracterizar parcialmente estos clones.

Tabla 1.II. Datos referentes al origen geográfico, periodo de captura, y planta-huésped sobre la que se muestrearon los 148 clones de *R. Padi* analizados en el presente trabajo. En el caso de los clones cedidos por el Dr. J.C. Simon se indica el ciclo biológico determinado por él para estos clones. Para el resto de clones, el símbolo “?” indica que *a priori* se desconocía su ciclo vital, aunque para los españoles se asumió que eran anholocíclicos. G.E., gramíneas espontáneas; R.C., rebrotes de cereales; (E), España; (F), Francia; (Y), Inglaterra; (CA), California; (OK), Oklahoma; (KY), Kentucky; (Ar), Argentina.

| Localidad | Nº clones | Denominación | Captura | Ciclo | Huésped |
|-------------------|-----------|--------------|-----------|---------------|-------------------------|
| Zaragoza (E) | 6 | Z1-Z6 | nov-89 | ? | R.C./G.E |
| | 8 | Z7-Z14 | may-90 | ? | Cebada/Trigo |
| | 10 | Z15-Z24 | nov-90 | ? | R.C./G.E |
| | 9 | Z25-Z33 | jun-91 | ? | Cebada |
| | 9 | Z34-Z42 | nov-91 | ? | R.C./G.E |
| | 3 | Z43-Z45 | may-93 | ? | Trigo |
| Total 45 | | | | | |
| Córdoba (E) | 3 | C1-C3 | abr-90 | ? | Trigo |
| | 4 | C4-C7 | mar-90 | ? | Trigo/ <i>H. murium</i> |
| | 8 | C8-C15 | nov-90 | ? | Rebrotes Trigo |
| | 10 | C16-C25 | mar-91 | ? | Trigo |
| Total 25 | | | | | |
| Madrid (E) | 1 | M1 | 1985 | ? | Stock INIA |
| | 10 | M2-M11 | ene-90 | ? | R.C. |
| | 9 | M12-M20 | may-91 | ? | Cebada/Trigo |
| | 10 | M21-M30 | nov-91 | ? | R.C. |
| Total 30 | | | | | |
| Tarragona (E) | 3 | T1-T3 | nov-89 | ? | Cebada |
| | 2 | T4-T5 | dic-92 | ? | G.E |
| Total 5 | | | | | |
| Colmar (F) | 5 | Co1-Co5 | abr-92 | Holocíclico | <i>P. padus</i> |
| Rennes (F) | 12 | R1-R12 | feb-90 | Anholocíclico | R.C./Cebada |
| | 10 | R13-R22 | feb-90 | Holocíclico | <i>P. padus</i> |
| | 2 | R23-R24 | jun-91 | Anholocíclico | <i>P. padus</i> |
| | 5 | R26-R30 | abr-92 | Holocíclico | <i>P. padus</i> |
| Total 29 | | | | | |
| Bristol (I) | 2 | B1-B2 | jun-91,92 | Holocíclico | <i>P. padus</i> |
| S. Francisco (CA) | 4 | SF1-SF4 | Dic-91 | ? | <i>Poa sp.</i> |
| Stillwater (OK) | 1 | ST1 | may-92 | ? | ? |
| Lexington (KY) | 1 | L1 | may-93 | ? | Trigo |
| La Plata (Ar) | 1 | Ar1 | may-93 | ? | ? |

III.2 Extracción del DNA mitocondrial.

Para la extracción del mtDNA de áfidos se combinaron y adaptaron los protocolos desarrollados para *Drosophila* por Latorre et al. (1986) y Afonso et al. (1988). El protocolo optimizado se describe a continuación:

1.- En un tubo Eppendorf de 1.5 ml preenfriado se colocan de 20 a 30 áfidos manteniéndose el tubo en hielo.

2.- Se añaden 320 μ l de solución I fría: Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, sacarosa 5%, EDTA 10 mM, pH 7.8 y se homogeneizan los áfidos en esta solución.

3.- Se añaden después 400 μ l de solución II: SDS 1.25%, Tris-HCl 300 mM, sacarosa 5%, EDTA 10 mM, pH 9. Se mezcla suavemente mediante unas pocas inversiones del tubo y se incuba la mezcla en un baño termostático a 65°C durante 30 minutos.

4.- Se saca el tubo del baño y se le añaden 120 μ l de acetato potásico 5 M, pH 4.8. Se mezcla suavemente y se incuba la mezcla a -20°C durante un tiempo mínimo de 10-15 minutos.

5.- Se centrifuga durante 15 minutos a velocidad máxima en una centrífuga de mesa tipo Eppendorf y se recoge el sobrenadante (aproximadamente 780 μ l).

6.- Tras añadir el mismo volumen de alcohol isopropílico, e incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga 5 minutos a velocidad máxima para precipitar los ácidos nucleicos.

7.- Se descarta el alcohol y el "pellet" se lava con etanol al 70% (se centrifuga de 3 a 5 minutos). Tras descartar de nuevo el alcohol, el "pellet" se seca ligeramente al vacío y se resuspende en 150 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM), pH 8.

8.- Una vez resuspendido el "pellet" completamente se añaden 300 μ l de solución álcali, se mezcla muy suavemente y se incuba a 65°C de 5 a 8 minutos. Es importante tener ciertas precauciones al preparar la solución álcali: a una solución de SDS al 0.1% se le añade NaOH 2 N hasta conseguir un pH lo más ajustado posible a 12.5.

9.- Tras la incubación se añaden 225 μ l de acetato sódico 3 M, pH 5.2, se mezcla suavemente y se incuba a -20°C durante 15 minutos.

10.- Se centrifuga a la máxima velocidad en una centrífuga de mesa y se recoge el sobrenadante (aproximadamente 680 μ l).

11.- Se precipitan los ácidos nucleicos y se lava el "pellet" como se indicó en los pasos 6 y 7.

12.- Se resuspende el DNA en 40 μ l de TE, pH 8.

Mediante este protocolo se obtiene una cantidad de ácidos nucleicos suficientemente enriquecida en mtDNA (200 ng aproximadamente) que permite realizar 4 digestiones con enzimas de restricción de tal forma que el patrón de fragmentos sea directamente visible en los geles.

III.3 Digestión del mtDNA con enzimas de restricción.

De cada clon de *R. padi* se extrajo suficiente cantidad de DNA enriquecido en mtDNA para realizar un mínimo de 20 digestiones (aproximadamente unos 3-4 mg).

Una vez comprobado qué enzimas de restricción reconocían al menos un sitio de corte en la molécula de mtDNA de *R. padi*, se seleccionaron un total de 16 endonucleasas con dianas de reconocimiento de longitud variable. Se seleccionaron los siguientes enzimas que reconocen dianas de 4 pares de bases : *Dde*I, *Hae*III, *Hin*fI, *Hpa*II, *Rsa*I, *Sau*3A y *Taq*I, mientras que de aquellos que reconocen 6 pares de bases fueron seleccionados los siguientes: *Acc*I, *Bcl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hpa*I, *Pst*I, *Sfu*I y *Xba*I. Otros enzimas probados en un primer análisis no reconocieron sitio alguno de corte en la molécula de mtDNA de *R. padi* y por lo tanto no fueron utilizados en el análisis de variabilidad del mtDNA de *R. padi*. Estos enzimas fueron: *Bam*HI, *Cfo*I, *Kpn*I, *Ksp*I, *Pvu*II, *Sal*II, *Sca*I y *Xho*I.

Las digestiones del mtDNA se realizaron generalmente en un volumen de 15 ml y en presencia de RNasa A (5 ng/ml) siguiendo básicamente las recomendaciones de los proveedores.

Los fragmentos obtenidos tras la digestión se separaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa en tampón TBE 0.5X (Sambrook et al., 1989). Los porcentajes de agarosa más utilizados fueron 0.8%, 1.0% y 1.2%. Dependiendo de los tamaños esperados de los fragmentos de mtDNA, en los geles se incluía un marcador de tamaños adecuado. Los dos marcadores de tamaños utilizados de forma rutinaria fueron, por un lado, los fragmentos de restricción del DNA del fago lambda obtenidos tras la digestión con *Hind*III, y por otro una mezcla de los fragmentos obtenidos en digestiones separadas del plásmido pBR328 con *Bgl*II y *Hin*fI (este último corresponde al marcador comercializado como marcador VI por Boehringer Mannheim). Tanto los geles de agarosa como el tampón de electroforesis contenían 0.1 mg/ml de bromuro de etidio por lo que no era necesario una tinción de los geles tras la electroforesis para poder visualizar los fragmentos. Generalmente, estos se visualizaban directamente en los geles mediante exposición en un transiluminador de luz ultravioleta, y se obtenía una fotografía con una cámara Polaroid utilizando una película Agfapan 400 (Figura 3.II). En muchos casos, el revelado de la película ponía de manifiesto la presencia de algunas bandas que no eran claramente visibles en el gel.

III.4 Hibridación con sondas no radiactivas.

La transferencia de los geles de agarosa a filtros de nylon Hybond-N (Amersham) se realizó mediante el método de Southern (1975) siguiendo el protocolo descrito por Ausubel et al., 1987, que reduce considerablemente los tiempos de desnaturalización y neutralización. Además del fácil manejo y de su gran resistencia (se pueden rehibridar varias veces tras los oportunos lavados), los filtros de nylon tienen la ventaja añadida de que la fijación del DNA al filtro se puede hacer mediante exposición a luz ultravioleta durante 5 minutos.

El marcaje de las distintas sondas empleadas se efectuó mediante una técnica no radiactiva, comercializada por Boehringer Mannheim, que utiliza digoxigenina-dUTP como análogo de la timina. El método de marcaje fue el conocido en inglés como "random primed", que aprovecha la capacidad de polimerización del fragmento "klenow" de la Polimerasa I de *E. coli* a partir de cebadores ("primers") pequeños, utilizando como molde DNA de hebra sencilla. El marcaje de la sonda, la hibridación y la posterior detección de los híbridos se llevaron a cabo siguiendo básicamente las recomendaciones del proveedor, modificando, cuando era necesario, las condiciones de hibridación y lavados de acuerdo con la homología esperada. En algunos casos fue necesario rehibridar un mismo filtro con diferentes sondas, lo cual se llevó a cabo también siguiendo el protocolo descrito por el proveedor de la técnica de marcaje.

Excepto en algún caso concreto, en que los fragmentos de DNA que iban a ser utilizados como sonda se obtuvieron mediante electrolución de un gel de agarosa preparativo (Maniatis et al., 1989), en la mayoría de los casos se obvió la necesidad de electroluir dichos fragmentos gracias a la utilización de agarosa de bajo punto de fusión en la elaboración de los geles preparativos. Una vez separados los fragmentos mediante electroforesis en la mencionada agarosa, se cortaba con un bisturí estéril el fragmento de agarosa que contenía la banda de DNA deseada. Este fragmento colocado en un tubo Eppendorf se fundía a 65°C, se desnaturalizaba en un baño de agua hirviendo durante 10 min e inmediatamente después se pasaba a un baño de 37°C, temperatura a la cual este tipo de agarosa permanece líquida. A partir de aquí se siguieron siempre las recomendaciones del proveedor. No obstante queremos resaltar que, dado que en ningún momento se elimina la agarosa, antes de tomar un alícuota del producto marcado para ser añadido a la solución de prehibridación es necesario fundirlo previamente incubándolo a 65°C durante 10 min.

Únicamente se utilizó un método distinto en el marcaje del gen de la subunidad 6 de la ATPasa de *D. subobscura*, que se realizó para localizar este gen en el mtDNA de *R. padi*. En este caso se amplificó el gen en cuestión mediante la técnica de PCR a partir de DNA total de esta especie de *Drosophila* utilizando primers adecuados. En la reacción de amplificación se incluyó el análogo de la timina dig-UTP para obtener el producto amplificado marcado. La reacción de amplificación se efectuó en un volumen de 50 µl conteniendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 100 mM de cada uno de los deoxinucleótidos dATP, dGTP y dCTP, 65mM del deoxinucleótido dTTP y 35mM del análogo Dig-dUTP, 4mM de cada uno de los dos primers, xx ng/ml de DNA de *D. subobscura* y 0.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador IHB (Durviz) programado para 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 45°C y 1 minuto a 72°C, más un ciclo adicional de extensión de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 45°C y 8 minutos a 72°C.

Tras la amplificación se efectuó una precipitación del producto amplificado marcado con LiCl₂ para eliminar nucleótidos no incorporados, de igual modo que con el resto de

sondas marcadas mediante "random primed" siguiendo las recomendaciones del proveedor del método de la digoxigenina (Boehringer M.).

III.5 Clonación de fragmentos del mtDNA de *R. padi*.

El mtDNA obtenido mediante el protocolo de extracción descrito anteriormente era suficientemente puro como para permitir su clonación. El método seguido consistía básicamente en digerir el mtDNA con los enzimas de restricción que liberaban los fragmentos de interés, tras lo cual se separaban en un gel de agarosa de bajo punto de fusión del 0.8-1.0% de agarosa, y se cortaban aquellos trozos de agarosa que contenían dichos fragmentos. Hecho esto, se fundían los trozos de agarosa a 65°C y el mtDNA contenido en la agarosa fundida se añadía a una premezcla de ligación que contenía el vector de clonación, el tampón de ligación y la ligasa del fago T4. Los vectores de clonación utilizados fueron los plásmidos pUC18 y pUC19 digeridos con los mismos enzimas utilizados en la digestión del mtDNA, o con enzimas compatibles adecuados, y defosforilados (Sambrook et al., 1989) cuando era necesario (clonaciones no dirigidas). La mezcla de ligación se incubaba a 19°C durante toda la noche.

Con la mezcla de ligación se procedía a la transformación de células competentes de la cepa DH5a de *Escherichia coli*, obtenidas por el método del CaCl₂ (Ausubel et al, 1987) que poseían una frecuencia de transformación de 10⁶-10⁸ transformantes por mg de plásmido. Los transformantes se seleccionaban en placas de LB con ampicilina, y las colonias blancas que eran portadoras de plásmido unido a inserto se amplificaban en LB líquido para proceder a la extracción de los plásmidos recombinantes. La extracción de los plásmidos recombinantes se llevó a cabo mediante el método de miniprep basado en la técnica de lisis alcalina de Birnboim y Doly (Ausubel, 1987). Para determinar si los insertos correspondían a los fragmentos de mtDNA deseados, se procedió a caracterizarlos mediante restricción y posterior hibridación con sondas de mtDNA.

III.6 Secuenciación de fragmentos del mtDNA de *R. padi*.

Se secuenciaron total o parcialmente algunos fragmentos del mtDNA de *R. padi* clonados previamente de la forma descrita.

El método de secuenciación fue el de terminación por dideoxinucleótidos de Sanger modificado para la secuenciación de DNA plasmídico desnaturalizado (Mierendorf y Pfeffer, 1987). Para ello se utilizó la DNA polimerasa T7, y para el marcaje radiactivo (α -³⁵S)dATP (Amersham).

Como cebadores ("primers") se utilizaron dos oligonucleótidos sintéticos:

a) el oligonucleótido universal d5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' ("universal primer" de Pharmacia).

b) el oligonucleótido reverso d5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' ("M13/pUC reverse primer" de Boehringer Mannheim).

En algunos casos fue necesario realizar delecciones seriadas (Henikoff, 1982) de los fragmentos clonados para conseguir subclones solapantes que permitieran obtener la secuencia completa de los fragmentos de mtDNA.

Una vez completadas las reacciones de secuenciación mediante el método citado, las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 8% de 0.2 mm de espesor, en presencia de urea 8M como agente desnaturalizante y en tampón TBE 1X. Los geles se corrieron indistintamente en cubetas MacroPhor (Pharmacia LKB) o Sequi-Gen (Biorad) durante 2.5 h a 2500 V, para carreras cortas, y 7.5 h a 2500 V o 16 h a 1500 V, para carreras largas.

La manipulación, y determinación de homologías de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con distintos programas del paquete de análisis GCG (Genetics Computer Group).

III.7 Digestión con la nucleasa S1.

Es conocido que aquellas secuencias de una molécula de DNA que son hipersensibles a la digestión con nucleasas específicas de DNA de cadena sencilla se corresponden con regiones que poseen la menor energía libre para sufrir desenrollamientos (Kowalski et al., 1988). Estas regiones están asociadas a orígenes de replicación y a secuencias reguladoras de la transcripción del DNA de procariontes y eucariontes.

Con el fin de identificar este tipo de secuencias en la molécula de mtDNA de *R. padi* realizamos una serie de digestiones con la nucleasa S1 de fragmentos de mtDNA clonados en el plásmido pUC18. Los plásmidos recombinantes que contenían los fragmentos de mtDNA fueron extraídos en gradiente de CsCl (Ausubel et al., 1987) para obtener la mayor proporción de DNA circular superenrollado puro.

Las digestiones con la nucleasa S1 se efectuaron de acuerdo con el protocolo descrito por Sambrook et al., (1989) a dos temperaturas distintas (37°C y 20°C) y a diferentes tiempos de incubación.

Tras la digestión el producto era fenolizado y sometido a digestión con enzimas de restricción que permitiesen posicionar en el mapa de la molécula de mtDNA los sitios sensibles a la nucleasa S1.

Finalmente, para identificar de forma precisa las secuencias sensibles a la nucleasa S1, los productos de digestión fueron recircularizados de forma que el sitio donde la nucleasa S1 había dejado de digerir era religado con el sitio *Sma*I del vector, tras la oportuna digestión del mismo con esta enzima de restricción. Tras la transformación y selección de aquellas colonias que poseían este tipo de plásmidos recombinantes era inmediato, en un gel de secuencias, leer el punto en que la S1 había dejado de digerir, ya que este punto se leería inmediatamente después del sitio *Sma*I del vector. Para la secuenciación de estos puntos se utilizaron dos cebadores diferentes:

a) el cebador R-60: d5'-ACACTTTATGCTTCCGGC-3'.

b) el cebador D-60: d5'-CGAAAGGGGGATGTGCTGCAA-3'.

IV. RESULTADOS

IV.1. IDENTIFICACION DE LOS FRAGMENTOS PERTENECIENTES A LA MOLECULA DE MTDNA DE *R. PADI*.

Mediante el protocolo de extracción de mtDNA descrito en el apartado de material y métodos se obtenía una fracción de ácidos nucleicos que, tras ser digerida con enzimas de restricción, revelaba la presencia de una serie de bandas que destacaban sobre un ruido de fondo o "smear" de DNA cromosómico nuclear y posiblemente también bacteriano (conviene recordar que los áfidos presentan una íntima asociación con endosimbiontes bacterianos). Todas estas bandas, independientemente del enzima utilizado, sumaban aproximadamente 24 kb, superando así el tamaño más frecuentemente encontrado en el mtDNA de diferentes especies animales que es bastante homogéneo en torno a las 15-20 kb (Boyce et al., 1989). Existen sin embargo especies que poseen un mtDNA de tamaño excepcionalmente mayor al rango mencionado. Tal es el caso del bivalvo *Placopecten magellanicus* (Snyder et al., 1987; LaRoche et al., 1990), de varias especies de gorgojos del género *Pissodes* (Boyce et al., 1989) o del nematodo *Romanormis culicivora* (Powers et al., 1986) que poseen moléculas de mtDNA de 42 kb, 36 kb y 26 kb respectivamente. Sin embargo estos tamaños tan alejados del mencionado rango no son habituales y no han sido descritos en insectos. Por ello, antes de iniciar un análisis sistemático de variabilidad del mtDNA basado en los posibles polimorfismos que pudiesen detectarse considerando todas las bandas visibles en los geles, encontramos oportuno comprobar que efectivamente todas las bandas correspondían a fragmentos de mtDNA.

Esta comprobación era sencilla dado el alto grado de conservación del contenido génico en todos los mtDNAs estudiados (Harrison, 1989; Wolstenholme, 1992). De las distintas alternativas entre las que podíamos optar nos decidimos por hibridar nuestros geles, que contenían las bandas de DNA presuntamente mitocondrial de *R. padi*, con una sonda que contuviese la molécula completa de mtDNA de *Drosophila subobscura*. Esta molécula fue obtenida mediante el protocolo de extracción de mtDNA descrito aplicado a una cepa de *D. subobscura* que era patrón C para el enzima de restricción *HaeIII* (Latorre et al., 1992). Este patrón se caracteriza por poseer un único sitio de reconocimiento con este enzima y por tanto aparece en un gel de agarosa como una única banda de 15.8 kb. Este fragmento fue electroluido de un gel de agarosa preparativo (Sambrook et al., 1989) y se marcó de forma no radiactiva. Con esta sonda se hibridaron geles en los que se corrieron muestras de DNA de *R. padi* digeridas con los enzimas de restricción que reconocían dianas de 6 pb (ver Material y métodos). En todas las hibridaciones efectuadas se observó que algunas de las bandas que eran directamente visibles en los geles no hibridaban con la sonda (Figura 1.IV) y por tanto no

podían ser consideradas como mtDNA de pulgón. En conjunto, las bandas que no hibridaban con la sonda de mtDNA utilizada sumaban en todos los casos alrededor de 8.0 kb, por lo que el tamaño de la molécula de mtDNA de *R. padi* (deducido a partir de la suma de los fragmentos que hibridaban con esta sonda) fue estimado alrededor de 16.5 kb, y pasaba a estar ya de acuerdo con los tamaños más habituales descritos en la literatura.

La naturaleza de tales bandas "extra" no es objetivo de esta tesis, pero si se piensa que el método de extracción con el cual se obtienen está basado en el método de lisis alcalina que se emplea para la extracción de plásmidos pequeños, cabe la posibilidad de que se trate de una molécula circular covalentemente cerrada que se coextrae con el mtDNA.

De esta forma se consiguieron identificar las bandas correspondientes a mtDNA haciendo innecesario hibridar cada vez que se utilizase en adelante cualquiera de estas enzimas de restricción, dado que los patrones de restricción que generaban eran directamente reconocibles en los geles. Además se identificaron algunas enzimas de restricción que producían un único corte en la molécula de mtDNA de *R. padi*. Una vez identificados estos enzimas, se seleccionó uno de ellos (concretamente *XbaI*) para obtener mtDNA linealizado de esta especie. El objetivo era conseguir una sonda de mtDNA completo específica que permitiese la identificación de todos los fragmentos de mtDNA de *R. padi* que se obtenían en las digestiones con aquellos enzimas de restricción que producían un elevado número de cortes (enzimas que reconocen 4 pb o "four-cutters"). El patrón de restricción producido por estas enzimas era más difícil de identificar directamente en los geles debido tanto a la presencia de fragmentos de DNA no mitocondrial (también muy fragmentado) como a la aparición de fragmentos de tamaño pequeño difícilmente visibles en los geles.

A esta sonda se la denominó *XbaIRp* y ha sido utilizada de forma rutinaria tanto en la detección de polimorfismo de restricción del mtDNA generado por "four cutters", como en el análisis de las diferentes combinaciones de dobles digestiones que se efectuaron para la elaboración del mapa de restricción de la molécula.

IV.2. ELABORACION DE UN PRIMER MAPA DE RESTRICCIÓN DE LA MOLECULA.

Dado que en la literatura no existía descrito ningún mapa de restricción de la molécula de mtDNA de ninguna especie de áfido, el primer paso previo a cualquier análisis de variabilidad basado en el polimorfismo de sitios de restricción del mtDNA debía ser la elaboración de un mapa de referencia de posiciones relativas de sitios de restricción. Una vez elaborado este mapa fue mucho más sencillo interpretar y ubicar las variaciones que se detectaron en el futuro. Este primer mapa fue realizado mediante diferentes combinaciones de simples y dobles digestiones de mtDNA de un clon de *R. padi* que se tomó como referencia (clon Z1) con algunos de los enzimas de restricción que producían un número bajo de cortes

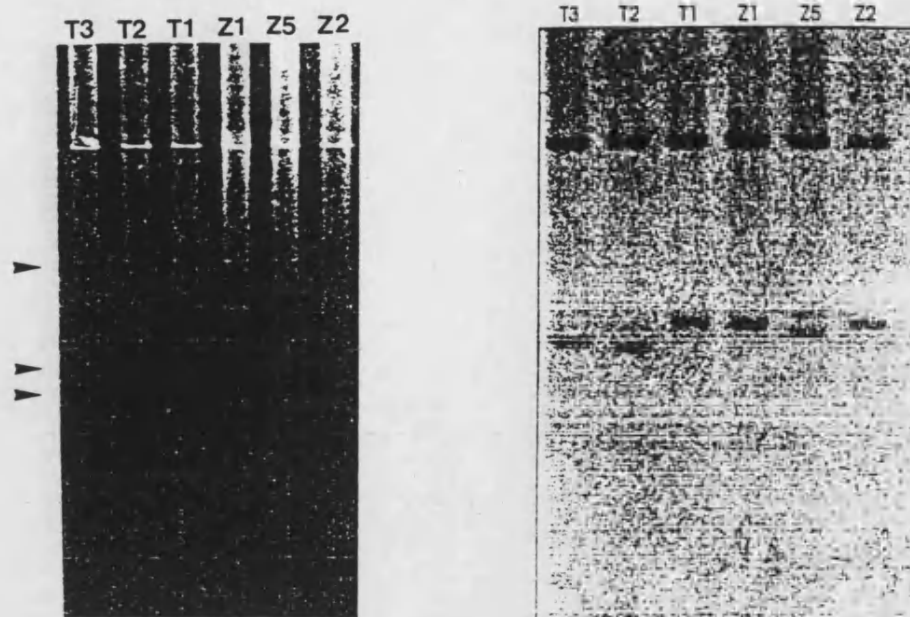


Figura 1.IV. a) Digestiones con *Hind*III de los clones de *R. padi* que se indican. b) Hibridación del mismo gel con la molécula completa de mtDNA de *D. subobscura*. Las flechas señalan los fragmentos que no hibridan con la mencionada sonda.

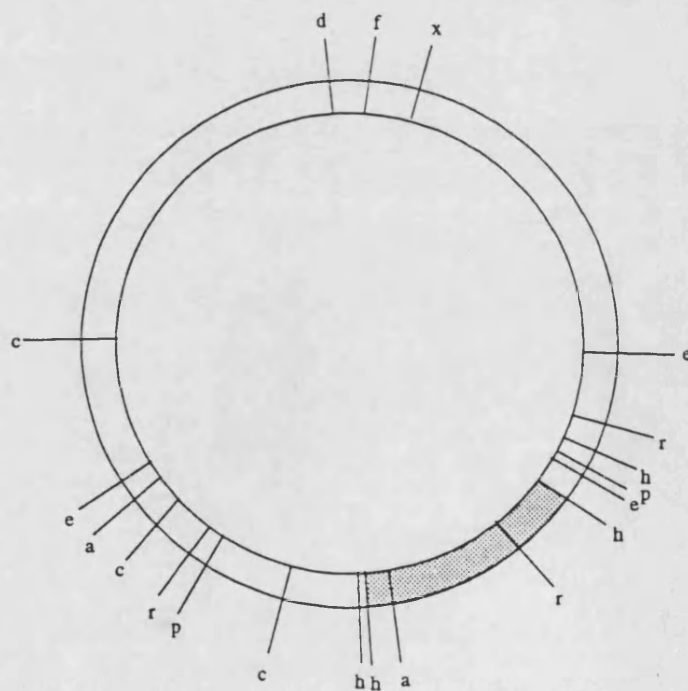


Figura 2.IV. Mapa de posiciones relativas de los sitios de restricción *Acc*I (a), *Eco*RI (e), *Eco*RV (c), *Hae*III (d), *Hind*III (h), *Hpa*I (f), *Rsa*I (r), *Pst*I (p) y *Xba*I (x) en el mtDNA de *R. padi*. El fragmento sombreado corresponde al fragmento variable en tamaño *Hind*III-*Hind*III.

en la molécula. Estas enzimas fueron: *AccI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HindIII*, *PstI*, *RsaI* y *XbaI*. Con el fin de poder detectar fragmentos pequeños que podían quedar ocultos bajo el ruido de fondo ("smear") de DNA nuclear los geles destinados a mapeo fueron hibridados con la sonda *XbaIRP*. Este primer mapa no se pudo hacer corresponder con el mapa génico al no tener un mapa de referencia previo. Los mapas génicos de mtDNA que mejor podían servir de base para la elaboración del mapa génico del mtDNA del áfido eran los publicados para otros insectos. En aquel momento el único mapa génico del mtDNA completo de un insecto era el perteneciente a *Drosophila yakuba* (Diptera) (Clary and Wolstenholme, 1985) y ya más recientemente se ha publicado el de *Apis mellifera* (Hymenoptera) (Crozier and Crozier, 1993). Pero para la elaboración de un mapa génico a partir de los publicados para estos insectos, era necesario disponer del mapa de posiciones relativas de sitios de restricción. El mapa obtenido para los enzimas citados se presenta en la Figura 2.IV.

Disponiendo de este primer mapa de restricción procedimos al análisis sistemático de la variabilidad en el mtDNA de *R. padi*, ampliando posteriormente el análisis a otros enzimas no incluidos en este primer mapa y que permitieron la elaboración de un mapa de restricción mucho más completo

En los apartados siguientes se presentan los resultados de dicho análisis agrupados en dos tipos bien distintos de polimorfismo para el mtDNA de este áfido: por un lado, un elevado polimorfismo de tamaño de la molécula, ampliamente distribuido en las poblaciones, y por otro, un polimorfismo de sitios de restricción ciertamente limitado si se compara con el anterior.

IV.3. POLIMORFISMO DE TAMAÑO DEL MTDNA DE *R. PADI*.

En este apartado describiremos y analizaremos el amplio polimorfismo de tamaño encontrado para la molécula de mtDNA en las poblaciones naturales de *R. padi* y que se localiza en dos zonas distintas de la molécula.

IV.3.1. Variación en tamaño de la región control.

Uno de los primeros resultados obtenidos en el análisis de restricción del mtDNA de distintos clones de *R. padi* fue la detección de polimorfismo de tamaño para la molécula de mtDNA.

La primera vez que se detectó este tipo de polimorfismo fue en digestiones con *HindIII* (Figura 1.IV). Este enzima reconocía cuatro sitios de corte en el mtDNA de *R. padi* (Figura 2.IV) originando por tanto cuatro fragmentos. De estos fragmentos tres presentaban un tamaño aparentemente constante de 13.4, 0.4 y 0.15 kb respectivamente. Un cuarto fragmento era claramente variable en tamaño oscilando generalmente entre 2.1 y 2.8 kb, con un longitud

aproximada del intervalo de variación de 100 pb. Así, aunque este polimorfismo también era detectado con otros enzimas que producían fragmentos conteniendo esta zona, la longitud de este fragmento *HindIII* sería utilizada como marcador para asignar cada clon de *R. padi* a una clase de tamaño determinada. La principal razón para la elección de este enzima como marcador de tamaño de la zona variable fue que al ser el que originaba un fragmento variable relativamente pequeño, su tamaño podía ser estimado de forma más precisa. De hecho, con la mayor parte de los enzimas utilizados no se apreciaba este polimorfismo debido a que la zona variable quedaba contenida en fragmentos de tamaño relativamente grande que no permitían la detección de estas pequeñas diferencias.

Mediante dobles digestiones con los enzimas de restricción previamente mapeados que producían cortes dentro de este fragmento *HindIII*, se pudo acotar mejor la zona variable entre un sitio *AccI* y un sitio *RsaI* (Figura 2.IV). El rango de tamaño del fragmento variable delimitado por estos enzimas oscilaba entre 1.1-1.7 kb con un intervalo de variación de nuevo estimado en aproximadamente 100 pb.

IV.3.1.1. Identificación de la zona variable.

En numerosas especies animales se ha descrito polimorfismo para el tamaño del mtDNA (Buroker et al., 1990; Arnason and Rand, 1992; Moritz and Brown, 1987; Mignotte et al., 1990; Edwards and Wilson, 1990; Gjetvaj et al., 1992; Cornuet et al., 1991; Harrison et al., 1985; Hale and Singh, 1986; Solignac et al., 1986; Matsuura et al., 1991). En la mayoría de casos, la variación en tamaño del mtDNA se localiza en la región reguladora de la molécula, es decir en las secuencias asociadas al D-loop en vertebrados y en las regiones ricas en A+T en insectos, y es generalmente debida a la variación en el número de copias de una unidad repetida en tandem.

Dado que no disponíamos del mapa génico del mtDNA de áfidos, para comprobar si el polimorfismo detectado se debía efectivamente a variación en el tamaño de la región A+T, se efectuaron las correspondientes hibridaciones utilizando como sonda un fragmento *HindIII*-*HindIII* de 2.3 kb del mtDNA de *Drosophila ambigua* que contenía la región A+T de este díptero (Figura 3.IV). Únicamente hibridaron los fragmentos variables obtenidos en digestiones simples con el enzima *HindIII* y los subfragmentos internos a estos obtenidos mediante doble digestión con los enzimas *AccI* y *RsaI* (Figura 4.IV). Con estos resultados y teniendo en cuenta los datos disponibles sobre el tema en la literatura, interpretamos que el polimorfismo de tamaño encontrado era debido a variación en el número de copias de una secuencia de aproximadamente 100 pb repetida en tandem que se localizaba en la región A+T de la molécula. Más tarde, tras una caracterización molecular completa de la zona variable, comprobamos que el resultado positivo en las hibridaciones con la sonda de *D. ambigua* era debido no tanto a la homología con la región A+T de la sonda, cuanto a que tanto la sonda como nuestros fragmentos variables contenían el gen del srRNA que es contiguo a esta zona y

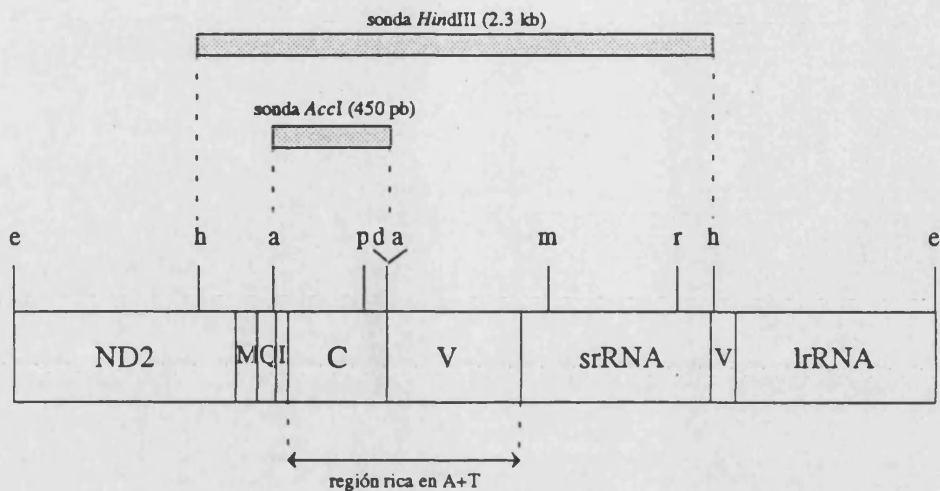


Figura 3.IV. Mapa de restricción y mapa génico del mtDNA del fragmento *EcoRI* de 3.7 kb de *Drosophila ambigua* clonado en el plásmido pamAT3.7. El fragmento *HindIII* de 2.3kb y el fragmento *AccI* de 450pb usados como sondas se indican en cajas sombreadas. También se indican la region variable (V) y conservada (C) dentro de la región rica en A+T. El mapa génico coincide con el de *Drosophila yakuba* descrito por Clary y Wolstenholme (1985). Los enzimas de restricción son: a, *AccI*; d, *DdeI*; e, *EcoRI*; h, *HindIII*; p, *HpaI* y r, *RsaI*.



Figura 4.IV. Dobles digestiones con los enzimas de restricción *AccI* y *RsaI* de los clones de *R. padi* indicados y posterior hibridación con el fragmento *HindIII-HindIII* que contiene la región A+T de *D. ambigua*. Se puede observar que únicamente hibrida el fragmento variable en tamaño.

que está altamente conservado. De hecho, antes de la caracterización definitiva de la zona variable ya sospechábamos que esto era así tras no obtener hibridación positiva en las hibridaciones que se efectuaron con la sonda *AccI* de 450 pb de *D. ambigua* (ver Figura 3.IV) que contiene una secuencia de la región A+T conservada en varias especies de *Drosophila* (Clary and Wolstenholme, 1985; 1987; Monnerot et al., 1990;) y que contiene el origen de replicación de la molécula propuesto por Goddard y Wolstenholme (1980).

IV.3.1.2 Caracterización molecular del polimorfismo de longitud asociado al fragmento variable *HindIII*.

Con el fin de caracterizar molecularmente la zona variable así como para disponer de una sonda específica de esta zona que permitiese la detección en los geles de posibles casos de heteroplasmia (presencia en un mismo individuo de moléculas de mtDNA de tamaño diferente) se procedió a la clonación del fragmento variable *HindIII* en el vector pUC18.

Se clonaron tres fragmentos *HindIII* correspondientes a la zona variable de tres tamaños diferentes. Estos fragmentos se obtuvieron de tres clones de *R. padi* diferentes con una longitud para el fragmento variable de 2.1, 2.3 y 2.4 kb respectivamente. El fragmento de 2.1 kb se obtuvo a partir de un clon de Tarragona (T2) y los otros dos a partir de dos clones de Zaragoza (Z5 y Z15) (ver Tabla 1.II para la identificación de los clones). Los plásmidos recombinantes que contenían estos tres fragmentos *HindIII* se denominaron pRPAT2.1, pRPAT2.3 y pRPAT2.4 respectivamente, de acuerdo con el tamaño de los insertos. La clonación de estos tres fragmentos no se hizo directamente sino que se clonaron como parte de fragmentos *PstI* de alrededor de 4.5 kb dentro de los cuales estaban contenidos (ver mapa de restricción). A partir de los tres fragmentos *PstI* correspondientes se subclonaron en las dos orientaciones los tres fragmentos *HindIII* que contenían la zona variable. En el proceso de subclonación del fragmento *HindIII* de 2.4 kb a partir del correspondiente fragmento *PstI*, además del plásmido recombinante pRPAT2.4, que contenía un inserto del tamaño esperado, se obtuvieron inesperadamente otros dos plásmidos recombinantes con tamaños del inserto de 1.9 y 2.0 kb respectivamente. Estos insertos necesariamente se generaron en la replicación del plásmido recombinante que contenía el inserto *PstI* durante el proceso de amplificación de la bacteria. A estos plásmidos recombinantes se les denominó pRPATg1.9 y pRPATg2.0 (es para resaltar su peculiar origen que en el nombre de estos plásmidos recombinantes se incluyó la inicial "g" correspondiente a "generado").

Mediante delecciones seriadas (Henikoff, 1982) se obtuvieron una serie de subclones solapantes de los insertos de los plásmidos pRPAT2.1, pRPAT2.3, y pRPATg1.9. A partir de estos clones solapantes se secuenció completamente una cadena del inserto del primero de estos tres plásmidos y parcialmente la misma cadena de los otros dos. Del inserto del plásmido recombinante pRPAT2.1 fue secuenciada además la otra cadena. En la Figura 5.IV aparece la

estructura de los insertos de estos tres plásmidos recombinantes así como la secuencia obtenida para cada uno de ellos.

Al comparar las secuencias obtenidas con la secuencia del mtDNA de *Drosophila yakuba* (Clary and Wolstenholme, 1985) se observó que, como habíamos deducido por las hibridaciones con la sonda de *D. ambigua*, la variación en tamaño se localizaba dentro de la región control (región rica en A+T). Esta región pudo ser identificada gracias a que las similitudes que proporcionaba el programa de alineamientos de secuencias BESTFIT (paquete GCG) de las secuencias inmediatamente adyacentes que la flanqueaban por ambos extremos con la secuencia de *D. yakuba* eran relativamente altas y permitían la identificación inequívoca de dichas secuencias.

Así se pudo determinar que las primeras 159 pb de esta secuencia correspondían a un fragmento del gen del tRNA^{met} (posiciones 1-33), al gen del tRNA^{gln} (posiciones 33-98) y al gen del tRNA^{ile} (posiciones 96-159). Los porcentajes de identidad de estos dos últimos genes con los correspondientes de *D. yakuba* fueron del 79% y 84% respectivamente. Los límites de estos genes fueron determinados a partir de su estructura secundaria, la cual se determinó mediante el plegamiento de estas secuencias con el programa MFOLD (Figura 6.IV).

A partir de las posiciones 1131, 907 o 677 (dependiendo de cual de las tres secuencias se utilizase en la comparación) y hasta el final del inserto, se encontraron unas identidades con la secuencia de *D. yakuba* del 80%, 56% y 68% respectivamente con los genes del RNA ribosómico 12S, del tRNA^{val} y de parte del gen del RNA ribosómico 16S (posiciones 14138-13659 en la secuencia de *D. yakuba*). Aunque se identificó el anticodón del gen del tRNA^{val} y se obtuvieron algunas estructuras secundarias posibles para el tRNA, ninguna de ellas era plenamente satisfactoria y por lo tanto no se pudieron determinar los límites exactos para este gen. Sin embargo, se establecieron los límites aproximados en base al tamaño y a las posiciones conservadas del mismo gen en *D. yakuba*.

La parte de la secuencia comprendida entre los genes del tRNA^{ile} y srRNA no presentaba ninguna similitud con ninguna otra secuencia del mtDNA de *D. yakuba* que no fuese la región A+T, aunque la similitud entre estas regiones de ambos insectos no era clara, obteniendo distintos alineamientos posibles que eran probablemente consecuencia de la gran riqueza en A+T de estas secuencias.

Como se puede observar en la Figura 5.IV, las tres secuencias obtenidas para los tres fragmentos *Hind*III son casi idénticas difiriendo básicamente en el número de repeticiones en tandem (de 0 a 4) de una unidad elemental de 113 pb que se localiza en la zona de la región control próxima al gen del srRNA. Las unidades de repetición presentan una mayor riqueza en A+T (93%) que el resto de la región (85%) de tal forma que el contenido global en A+T de la región aumenta con el número de repeticiones desde un 85% de A+T para una región control sin ninguna de las unidades de 113 pb (AT0rep en la Figura 5.IV), hasta el 89% para una región con cuatro unidades de repetición (AT4rep en la Figura).

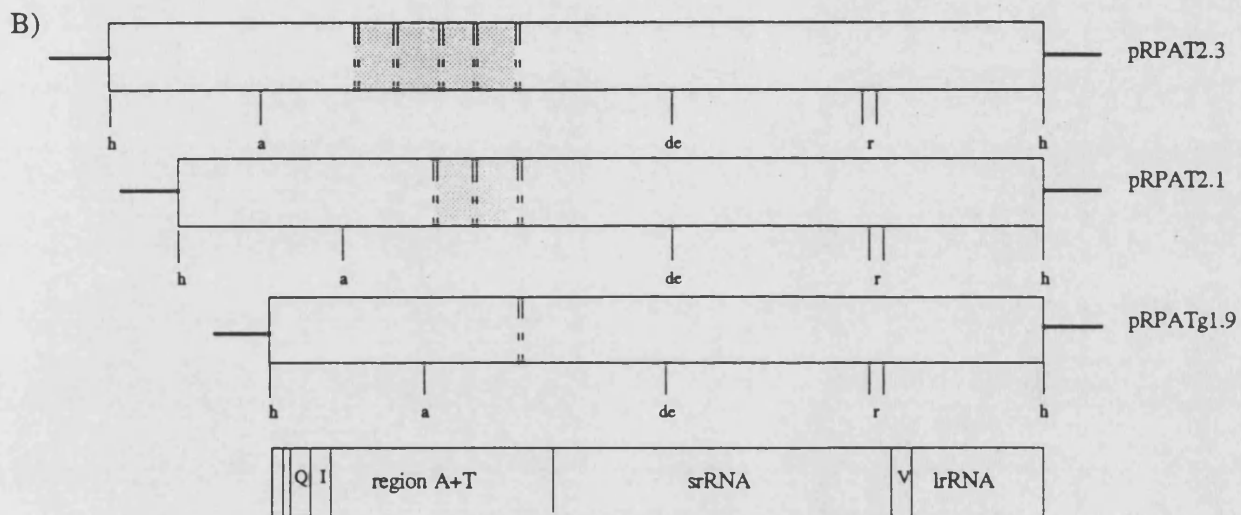


Figura 5.IV. A) Secuencias alineadas correspondientes a los plásmidos recombinantes pRPAT2.3 (a), pRPAT2.1 (b) y pRPATg1.9 (c). La numeración sobre el alineamiento pertenece a la secuencia de (a). Se ha indicado con flechas de trazo fino la secuencia que corresponde parcialmente al gen tRNA-metionina, al gen tRNA-isoleucina, al gen tRNA-glutámico y al gen tRNA-valina. Los anticodones aparecen en negrita. El inicio de la región A+T, del gen RNA ribosómico pequeño (srRNA) y del gen RNA ribosómico grande (lrRNA) se indican con flechas de trazo grueso. Los puntos unen secuencias contiguas e indican delección o inserción de secuencia. Se ha incluido en cajas las repeticiones alineadas. Las bases subrayadas muestran un motivo idéntico de 11 pares de bases con el que se inicia cada repetición y el fragmento, contiguo a las repeticiones, que precede al srRNA. B) Representación esquemática de los plásmidos pRPAT2.3, pRPAT2.1 y pRPATg1.9 y mapa génico de cada plásmido. El sombreado sitúa las repeticiones sobre al esquema. Los trazos discontinuos flanquean el motivo idéntico de 11 pares de bases. Los enzimas de restricción abreviados son: a, *AccI*; de, *DdeI*; h, *HindIII*; r, *RsaI*.

Todas las repeticiones son idénticas y se inician con un motivo de 11pb (TTAAAATAATT) que también está presente al final de cada serie de repeticiones. En el caso del plásmido pRPATg1.9, de la secuencia correspondiente a esta misma zona, lo único que queda es precisamente este motivo de 11 pb y no existe ninguna de las unidades de 113 pb. Este hecho sugería que el motivo de 11 pb debería de jugar un papel importante en el mecanismo generador de las adiciones o deleciones de unidades de repetición.

Así pues, la región control o región A+T del mtDNA de *R. padi* está comprendida entre los mismos bloques de genes que en *Drosophila*, y contiene un número variable de repeticiones en tandem de una secuencia de 113 pb que da cuenta del polimorfismo de tamaño asociado al fragmento *Hind*III. El tamaño menor detectado *in vivo* corresponde a una región control contenida en un fragmento *Hind*III de 2.1 kb y, como muestran los datos de las secuencias, contiene dos copias de la unidad de repetición de 113 pb y consiguientemente un tamaño total para la región A+T de 747 pb (posiciones 160-906 en la secuencia correspondiente de la Figura 5.IV). En realidad, como se explicará cuando presentemos el análisis poblacional de esta variabilidad, se detectaron dos clones de *R. padi* heteroplásmicos en los que uno de los tamaños presentes en condición heteroplásmica fué de 2.0 kb, y por tanto contendrían una fracción de moléculas de mtDNA con una única copia de este elemento.

No se encontró ningún motivo palindrómico como los descritos por Rand and Harrison (1989) en el interior de las repeticiones, y que estos autores proponen que pudiese estar implicado en el mecanismo que genera este tipo de variación en *Gryllus*. Sin embargo, sí se encontró un motivo similar (GGGGGGCTATGCCCTCC) bastante alejado en la dirección 5' (posiciones 280-298).

Además de la variación descrita, al comparar las tres secuencias se encontraron pequeñas adiciones o deleciones de dímeros TA en una serie de TAs que se inicia en la posición 427. Este tipo de adiciones/deleciones sería así el responsable de un polimorfismo de tamaño a pequeña escala similar al primero de los tres tipos de variación en tamaño propuestos por Moritz et al. (1987). Estas pequeñas variaciones de tamaño solo pueden ser detectadas mediante secuenciación y por tanto es difícil tenerlas en cuenta en estudios poblaciones basados en el análisis de restricción del mtDNA.

IV.3.1.3. Estructura de la region control.

El conocimiento actual sobre el funcionamiento y evolución de la región control del mtDNA está ciertamente limitado por la falta de datos comparativos, haciendose necesario tanto un aporte de datos de secuencias de regiones control del mtDNA de diferentes taxones con distintos niveles de separación filogenética (Taylor et al., 1993), como una contrastación experimental de las hipótesis que se plantean. Las regiones control más estudiadas pertenecen a vertebrados y sobre todo a mamíferos. Entre estas, a pesar de una considerable divergencia de sus secuencias y de los reordenamientos que se han producido, se han podido identificar

bloques conservados de secuencias (CSBs I, II y III) (Walberg and Clayton, 1981) dentro del D-loop reconocibles entre diferentes especies, desde primates (Foran et al., 1988; Hayashi et al., 1991) hasta peces (Buroker et al., 1990). Estos bloques conservados actuarían en *cis* en el proceso de replicación de la cadena pesada (cadena H) del mtDNA de estas especies. Próximos a estos bloques se sitúan los promotores de la transcripción de ambas cadenas. También parece general en vertebrados que la replicación de la cadena ligera (cadena L) se inicie en otro lugar (O_L) de la molécula bastante alejado (ver Figura 4.I). Se trata de una corta secuencia no codificante, generalmente rodeada de genes para diferentes tRNAs, cuya única característica conservada entre los diferentes vertebrados estudiados (excepto en gallinas) es su capacidad de formar una estructura de "stem-loop" estable (Clayton, 1991).

En invertebrados, y concretamente en insectos, se dispone de una información mucho más limitada. En insectos las únicas regiones control cuya secuencia completa ha sido publicada son las de *Drosophila yakuba* y *Drosophila virilis* (Clary and Wolstenholme, 1985, 1987), *Drosophila teissieri* (Monnerot et al., 1990), *Apis mellifera* (Crozier and Crozier, 1993) y cuatro especies de lepidópteros (Taylor et al., 1993). En ninguna de estas especies existe ninguno de los CSBs presentes en vertebrados aunque, al menos en las especies de *Drosophila* mencionadas, y en otras dos cuya región A+T ha sido parcialmente publicada (Monforte et al., 1993), y en el caso de los lepidópteros, sí existe en esta región una secuencia capaz de formar una estructura estable de "stem-loop" similar a la descrita como origen de replicación de la cadena ligera o cadena L en vertebrados. Conviene destacar además que en las diferentes especies de *Drosophila* estudiadas, esta zona capaz de autoapareamiento estable se sitúa dentro de una zona de la región A+T de 470 pb altamente conservada entre las especies estudiadas. Se han descrito variaciones en el número de repeticiones en tándem (de una a seis) de esta zona que originan un amplio polimorfismo de tamaño del mtDNA inter e intraespecífico (Salignac et al., 1986; Monforte et al., 1993).

Es en este contexto en el que cabe situar los intentos de caracterización de las posibles estructuras o zonas funcionales de la región control de *R. padi* que presentamos en el presente apartado.

Estudio de la secuencia primaria de la región control.

En primer lugar procedimos a la comparación de la secuencia de la región control de *R. padi* con las regiones control de las pocas especies de insectos cuya secuencia era conocida, con el fin de comprobar si existía algún segmento de secuencia primaria conservado en estas regiones (Tabla 1.IV). Las comparaciones se realizaron con el programa BESTFIT que es considerado de entre los programas de comparación de secuencias del paquete GCG como el más potente para identificar regiones de alta similaridad. Dado el alto contenido en A+T de las secuencias comparadas no nos fijamos tanto en los porcentajes de identidad entre secuencias como en la calidad (Q) de los alineamientos. Esta calidad se define como:

160 TTTAAAATAT TATTTAATAA AAAAATGTTT ATTGGTTTAT AAATGTATTA 209
 210 GAAAAAATAT CAGAAAATTT TTTAAAAAAA AATATTTTAA TGAGGCATGA 259
 260 CGTTTCTATT TATCTGAAA GGGGGGGCTA TGCCCCTCCA AAAAAAAAAA 309
 310 GAAGGAAGAA GAGTATATAG AGGATTTATA AATATGTATA GTAGTATACA 359
 360 TATATAGACT TCATATGTAT ATAGTATATA TATATAATAT AAATATACAT 409
 410 CTATATAGCT TATATAATTA TATATATATA TATATATATA TATATAAATC 459
 460 CTTATATGAT GTTAATAATC TATACATTTA AATATATAT ATATATATTA 509
 510 ATATATAAAT CCTTATATGA ATATATATAG ATATTTATTG TATATATATA 559
 560 TATAAGAGGT AAAGAAGAAA AGTATTAGTT ATTTTATATT AATAATATTA 609
 610 ATTTGA TTAA AATAAT AAT TTAAGTAATT ATATTTAAAA AACAGAAATT 659
 660 AATAAATTGT ATTAAAATTT AGATTTAAAA TTTAAATAGT ATTATAATTA 709
 710 AAAAATATTA GAATTAAAG TAAAATAATT AATTTAAGTA ATTATATTTA 759
 760 AAAACAGAA ATTAATAAAT TGTATTAAAA TTTAGATTTA AAATTTAAAT 809
 810 AGTATTATAA TTAAAAATA TTAGAATTAA AG TTAAAATA ATT TAGTTAA 859
 860 TTATTTAAAT TTTGATTTAA TTTATTTATT TAAAATTTAT AATATTA 906

Figura 6.IV. Región control de *R.padi* con dos repeticiones del elemento de 113 pares de bases. Las tres regiones en que se ha dividido arbitrariamente aparecen con distintos sombreados de fondo. En cajas con fondo blanco se señalan las series de TAs de longitud significativamente larga. Otras series de TAs cortas o imperfectas se señalan en recuadros de trazo discontinuo. Asimismo se indica un cuasipalindrome como oligo-G/oligo-C.

$Q = (\text{n}^\circ \text{ de emparejamientos}) - 0.9(\text{n}^\circ \text{ de desemparejamientos}) - (\text{peso otorgado al "gap"})(\text{n}^\circ \text{ de "gaps"}) - (\text{peso otorgado a la longitud de los "gaps"}) (\text{longitud total de todos los "gaps"})$.

Los pesos otorgados al "gap" y a la longitud del "gap" fueron en la mayoría de los casos los que el programa asume por defecto (5 y 0.3 respectivamente), aunque en algunos casos estos valores se redujeron para permitir inserciones o deleciones largas.

Para tener una idea del nivel de significación de estos alineamientos se realizó un test de aleatorización (Manly, 1985). El programa se ejecutó 999 veces adicionales sobre cada par de secuencias pero aleatorizando cada vez la secuencia de una de ellas. De esta forma se obtenían en total 1000 valores de Q entre los que se incluía el valor de Q obtenido en la comparación inicial de las secuencias sin aleatorizar. El nivel de significación venía determinado por el la fracción de valores de Q que igualaban o superaban el valor de Q obtenido en la comparación de las secuencias inalteradas.

Las comparaciones se realizaron en las dos orientaciones para detectar posibles inversiones. En el caso de las dos especies de *Drosophila* cuya secuencia de la región A+T estaba en banco de datos GenBank realizamos también comparaciones en las que se restringía el rango de comparación a las regiones descritas como conservadas (Clary y Wolstenholme, 1987). Por otro lado y con el fin de comprobar si la significatividad obtenida en los alineamientos de la región control completa de *R. padi* era motivada por la conservación de algún tramo concreto, así como para poner de manifiesto posibles alineamientos significativos no revelados en las comparaciones en que se utilizaba la región completa, se realizaron de nuevo los alineamientos descomponiendo la región control del mtDNA de *R. padi* en tres regiones (Figura 6.IV):

Región 1.- Posiciones 160-322, zona anterior a las series de TAs.

Región 2.- Posiciones 323-513, zona de abundantes series de TAs.

Región 3.- Posiciones 513-793, zona posterior a las series de TAs y que incluye la secuencia de 113 pb descrita como responsable de la variación en tamaño de la molécula.

Los resultados de todos estos alineamientos se muestran en la Tabla 1.IV.

Con todos los insectos comparados se obtuvieron algunos alineamientos aparentemente significativos según el criterio expuesto excepto con *Gryllus firmus* (Orthoptera).

Como se observa en la tabla, la comparación entre regiones control completas produjo en algunos casos alineamientos significativos en los que quedaba englobada la práctica totalidad de la región A+T de *R. padi* (alineamientos con las regiones A+T de *D. yakuba*, *A. mellifera* y *H. punctigera*). Sin embargo, al restringir los alineamientos a regiones limitadas, solo la región 2 en el caso de *R. padi* y la región conservada de 276 pb en *Drosophila* mostraron alineamientos significativos. Esto sugiere que es en estas zonas donde cabe buscar secuencias o motivos conservados en la región control del mtDNA de estos insectos. Los únicos motivos encontrados en las diferentes especies analizadas (excepto en *Gryllus*) fueron

Tabla 1.IV. Secuencias con las que se comparó la región control de *R. padi* (Homoptera) completa (TOT), y las tres regiones (R1, R2 y R3) en las que arbitrariamente fue dividida. Los alineamientos se consideraron significativos cuando la probabilidad de encontrar un alineamiento de la misma o superior calidad (Q) en 1000 alineamientos realizados aleatorizando una de las secuencias comparadas, era inferior a 0.05.

| Organismo | Orden | Descripción de la secuencia | TOT | R1 | R2 | R3 |
|-------------------------------|-------------|-------------------------------|-----|----|----|----|
| <i>Drosophila yakuba</i> | Diptera | (CR), 1078 pb, GenBank X03240 | * | NS | *? | NS |
| | | Zona conservada 1, 49 pb | NS | NS | NS | NS |
| | | Zona conservada 2, 276pb | ** | NS | ** | NS |
| <i>Drosophila virilis</i> | Diptera | (CR), 1029 pb, Genbank X05914 | NS | NS | ** | NS |
| | | Zona conservada 1, 50 pb | NS | NS | NS | NS |
| | | Zona conservada 2, 282 pb | ** | NS | ** | NS |
| <i>Apis mellifera</i> | Hymenoptera | (CR), 827 pb, GenBank L06178 | ** | NS | ** | NS |
| <i>Strymon melinus</i> | Lepidoptera | (CR), 196 pb, GenBank L16850 | * | NS | ** | NS |
| <i>Helicoverpa punctigera</i> | Lepidoptera | (CR), 328 pb, GenBank L17343 | ** | NS | ** | NS |
| <i>Gryllus firmus</i> | Ortoptera | (CR?), 892 pb, GenBank X15152 | NS | NS | NS | NS |

(CR): región control

(NS): alineamiento no significativo.

(*?): alineamiento significativo restringiendo el rango de comparación.

(*): alineamiento significativo, P<0.05

(**):alineamiento significativo, P<0.01

series más o menos largas de TAs. Estas series son abundantes y bastante largas en la región 2 de *R. padi* (Figura 6.IV). Llama especialmente la atención una de estas series excepcionalmente larga que comienza en la posición 428. Esta serie presenta además, como ya se indicó, inserciones o deleciones de elementos TA en las tres regiones control secuenciadas, de forma que el número de TAs en esta serie es variable entre 12 y 14. También se pueden encontrar series similares, algunas igualmente largas en *A. mellifera*, y en los dos lepidópteros incluidos en las comparaciones. En *D. yakuba* y en *D. virilis*, este tipo de secuencias, aunque de menor longitud, solo se encuentran en la región conservada de 276 pb a ambos lados de la secuencia que se ha postulado que pueda adoptar una estructura secundaria de "stem-loop" (Clary y Wolstenholme, 1987; Monforte et al., 1993). También encontramos series del mismo tipo y con la misma localización en otras especies de *Drosophila* cuya región A+T ha sido secuenciada (Monforte et al., 1993). En la Figura 7.IV se muestran las series de TAs encontradas en las regiones control de distintas especies de insectos.

Ciñéndonos al caso concreto de *R. padi* tratamos de comprobar si estas series de TAs eran lo suficientemente largas como para rechazar la hipótesis nula de que pudiesen haber sido generadas al azar dado el alto contenido en A+T de esta región. Para ello estimamos la probabilidad de que en una región con unas proporciones de adenina y timina como las observadas para la región control de *R. padi*, existan por puro azar series compuestas exclusivamente de adeninas y timinas alternadas de las longitudes observadas. Esta probabilidad es asintótica, estando limitada entre las funciones de distribución (Karlin et al., 1990):

$$P_- = 1 - \exp[-ab(2-a-b)l^z] \text{ y } P_+ = 1 - \exp[-(a+b-2ab)l^z/ab]$$

Donde a, b son en este caso las frecuencias de A y T respectivamente, $l = ab$, y z es la longitud en que la serie en cuestión excede el valor $\log N/(-\log l)$, siendo N la longitud total de la región.

Esta probabilidad se estimó para dos series ininterrumpidas de TAs (series 1 y 3 de las Figura 6.IV). La probabilidad calculada para la serie 1 compuesta por 14 dímeros de TA consecutivos, se situó entre los límites 2×10^{-8} y 5×10^{-8} . Para la serie de TAs con siete dímeros consecutivos (serie 3) se estimó una probabilidad situada entre 2.6×10^{-3} y 6.0×10^{-3} . Así pues, las longitudes estimadas para estas dos series resultaron altamente significativas, por lo que cabe rechazar la hipótesis nula de un origen exclusivamente aleatorio. La longitud mínima para que una serie de este tipo fuese significativamente larga (al nivel 0.005) se estimó en 14 nucleótidos, o dicho de otra forma, 7 dinucleótidos TA o AT seguidos. Según este criterio, en la región control de *R. padi* habría 3 series de TAs de longitud significativamente superior a la esperada como consecuencia únicamente de la composición de la región. Estas tres series aparecen señaladas en la Figura 6.IV. En la misma región y contiguas a estas series, existen otras series más o menos largas y más o menos interrumpidas del mismo tipo que no existen en las otras dos regiones en que se dividió la región control de *R. padi*.

Algunas de las series de TAs presentes en los insectos estudiados también resultaron significativamente largas. Cabe destacar dos series con 14 y 10 dímeros respectivamente encontradas en *A. mellifera* y una serie de 7 dímeros y otra de 9 presentes en los lepidópteros *S. melinus* y *H. punctigera* respectivamente. En cuatro especies de *Drosophila* (*D. yakuba*, *D. virilis*, *D. ambigua* y *D. obscura*) encontramos como mínimo una serie significativamente larga (seis dímeros TA) circundada por series más o menos imperfectas.

No se encontraron otros motivos comunes a las diferentes regiones control que los ya descritos. Nos llamó la atención, sin embargo, la presencia de un motivo casi palindrómico del tipo oligo-G/oligo-C en la región control de *R. padi* (posiciones 280-298 en la Figura 6.IV). Una secuencia muy similar se encontró en la parte de la región control de *G. firmus* que ha sido secuenciada (Rand y Harrison, 1989). Estos autores también llaman la atención sobre este motivo y llegan a asignarle un hipotético papel en el proceso molecular que conduce a la variación de tamaño del mtDNA en esa especie. Sin embargo, en el resto de especies de insectos aquí analizadas no se pudo encontrar ningún motivo similar.

Por último, en lo que a secuencia primaria de la región se refiere, queremos hacer notar que además de las repeticiones que han sido descritas como generadoras de variación del tamaño global de la región, existe una repetición imperfecta en la región de los dímeros de TA (posiciones 486-529) que incluye a la segunda serie de TAs y que podría haber surgido como duplicación de la primera serie.

Estudio de las posibles estructuras secundarias presentes en la región control.

Dado que cuando se comparan dos secuencias puede detectarse una falta de conservación a nivel de secuencia primaria aún conservándose las posibles estructuras secundarias, investigamos la posibilidad de que tal tipo de estructuras estuviesen presentes en la región control de *R. padi* y por tanto su posible conservación con respecto a otros insectos. En concreto, como ya se ha mencionado anteriormente, se han descrito estructuras del tipo "stem-loop" o estructuras cruciformes en la zona conservada de la región A+T de varias especies de *Drosophila*, sugiriéndose así una función relacionada con el origen de replicación de la molécula (Clary y Wolstenholme, 1987; Monforte et al., 1993). También se han postulado estas estructuras en las regiones control de varios lepidópteros (Taylor et al., 1993).

Con el fin de detectar posibles estructuras similares a las descritas para *Drosophila*, se realizaron una serie de plegamientos de la secuencia de la región control de *R. padi* utilizando para ello el programa MFOLD perteneciente al paquete de programas del GCG. Se eligió para ello una región control conteniendo dos unidades del elemento repetido de 113 pb, para detectar posibles estructuras secundarias que se pudiesen formar dentro de o entre las repeticiones y que pudiesen estar así implicadas en la generación de variabilidad de tamaño.

Se realizaron tres series de plegamientos en los que se recorrió toda la región utilizando tamaños de ventana de 80, 100 y 120 nucleótidos respectivamente, que se iban desplazando a

lo largo de la secuencia a intervalos de 20 nucleótidos. El programa proporcionaba aquella estructura secundaria con menor energía libre. Se obtuvieron así 35, 34 y 33 estructuras secundarias posibles con unos tamaños de 80, 100 y 120 nucleótidos para la primera, segunda y tercera series respectivamente. Para contrastar el nivel de desviación de estos plegamientos respecto a otros que se pudiesen generar por puro azar, comparamos los valores de energía libre asociados a los mismos con los obtenidos para 25 muestras de 80, 100 y 120 nucleótidos en cada caso, obtenidas sin reemplazamiento a partir de un conjunto de 200 aleatorizaciones de la región control de *R. padi*.

En la Tabla 2.IV se muestran los valores mínimos de energía asociados a cada una de las estructuras secundarias calculadas por el programa, así como el rango de valores de energía libre obtenido para las aleatorizaciones en cada una de las tres series. Como puede observarse, las secuencias que intervienen en plegamientos con energía libre inferior al rango observado en las aleatorizaciones, son prácticamente las mismas en las tres series. En un análisis más detallado de estas secuencias, se observó que existían dos bloques claros de secuencias que podrían formar estructuras secundarias estables. En un primer bloque estarían todas las secuencias que incluyen el motivo oligo-G/oligo-C que se sitúa entre las posiciones 280-298 y que es el responsable de que en las ventanas analizadas en las que queda incluido se obtenga un valor de energía libre significativo debido a su estructura casi palindrómica. En un segundo bloque estarían implicadas las secuencias que incluyen al menos dos de las series de dímeros de TA descritas en el apartado anterior, y que se extienden desde la posición 333 hasta la posición 563. En las representaciones gráficas de las estructuras óptimas y subóptimas correspondientes al primer bloque de secuencias, aparecía una única estructura estable independientemente del tamaño de la ventana. Sin embargo, en las representaciones de las estructuras secundarias en las que participaban secuencias del segundo bloque, se observaron varios tipos de estructuras posibles dependiendo del tamaño de la ventana, de las secuencias presentes en una ventana determinada y aún de si la representación correspondía a la energía óptima o a valores subóptimos de energía. Esto era básicamente debido a la existencia de varios grupos de series de TAs próximos y a las distintas combinaciones que podían darse de apareamientos entre grupos contiguos.

Solo en tres casos resultaron también significativas estructuras secundarias en las que participaba alguna secuencia incluida en el interior de la repetición de 113 pb.

Con el fin de comprobar si alguna de las estructuras secundarias predichas existía realmente en la región control, realizamos una serie de experiencias de mapeo de la región control con la nucleasa S1 (ver Material y Métodos). Esta endonucleasa digiere el DNA de hebra sencilla, de forma que si en un DNA superenrollado existe alguna región con estructura secundaria del tipo "stem-loop", o simplemente una zona de desapareamiento estable del DNA, esta es reconocida por la nucleasa S1 que degradaría la zona desapareada ("loop").

Tabla 2.IV. Valores de energía libre obtenidos en los plegamientos de la región A+T de *R. padi*. Los plegamientos se efectuaron con el programa MFOLD recorriendo la región completa con tres tamaños de ventana diferentes a intervalos de 20 pb. Así mismo se indica el rango de energía libre obtenido en cada ventana para 25 plegamientos realizados sobre otras tantas secuencias aleatorizadas.

| ventana 80 pb | | ventana 100 pb | | ventana 120 pb | |
|-----------------------|------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| posiciones (pb) | ΔG | posiciones (pb) | ΔG | posiciones (pb) | ΔG |
| 160-240 | -4.6 | 160-260 | -6.2 | 160-280 | -9.7 |
| 180-260 | -4.5 | 180-280 | -8.9 | 180-300 | -24.1* |
| 200-280 | -6.7 | 200-300 | -21.9* | 200-320 | -21.9* |
| 220-300 | -20.6* | 220-320 | -20.6* | 220-340 | -21.4* |
| 240-320 | -18.7* | 240-340 | -19.5* | 240-360 | -23.1* |
| 260-340 | -16.5* | 260-360 | -20.1* | 260-380 | -27.9* |
| 280-360 | -19.4* | 280-380 | -27.4* | 280-400 | -29.7* |
| 300-380 | -12.4* | 300-400 | -14.7 | 300-420 | -17.1 |
| 320-400 | -14.7* | 320-420 | -17.1* | 320-440 | -21.5* |
| 340-420 | -12.4* | 340-440 | -16.0* | 340-460 | -25.2* |
| 360-440 | -11.7* | 360-460 | -18.9* | 360-480 | -19.4* |
| 380-460 | -14.3* | 380-480 | -16.4* | 380-500 | -17.5* |
| 400-480 | -12.5* | 400-500 | -12.5 | 400-520 | -19.4* |
| 420-500 | -11.3* | 420-520 | -19.2* | 420-540 | -20.7* |
| 440-520 | -10.6* | 440-540 | -12.7 | 440-560 | -16.9 |
| 460-540 | -9.5* | 460-560 | -11.3 | 460-580 | -16.2 |
| 480-560 | -10.6* | 480-580 | -15.5 | 480-600 | -16.5 |
| 500-580 | -11.7* | 500-600 | -12.7 | 500-620 | -13.3 |
| 520-600 | -10.8* | 520-620 | -11.4 | 520-640 | -15.8 |
| 540-620 | -4.0 | 540-640 | -8.4 | 540-660 | -9.7 |
| 560-640 | -6.0 | 560-660 | -7.3 | 560-680 | -9.4 |
| 580-660 | -7.3 | 580-680 | -9.4 | 580-700 | -12.2 |
| 600-680 | -5.6 | 600-700 | -8.6 | 600-720 | -8.6 |
| 620-700 | -7.5 | 620-720 | -7.5 | 620-740 | -7.5 |
| 640-720 | -4.9 | 640-740 | -4.9 | 640-760 | -8.3 |
| 660-740 | -4.0 | 660-760 | -7.4 | 660-780 | -7.4 |
| 680-760 | -4.7 | 680-780 | -4.8 | 680-800 | -6.9 |
| 700-780 | -3.4 | 700-800 | -5.5 | 700-820 | -8.3 |
| 720-800 | -5.5 | 720-820 | -8.3 | 720-840 | -8.3 |
| 740-820 | -7.4 | 740-840 | -7.4 | 740-860 | -8.5 |
| 760-840 | -4.9 | 760-860 | -6.0 | 760-880 | -13.7 |
| 780-860 | -4.2 | 780-880 | -11.9 | 780-900 | -12.4 |
| 800-880 | -9.2* | 800-900 | -9.3 | 800-920 | -15.8 |
| 820-900 | -9.0* | 820-920 | -10.5 | | |
| 840-920 | -4.9 | | | | |
| Aleatorización | 0.1, -8.3 | | -3.8, -15.7 | | -5.3, -17.3 |

(*) valores de ΔG inferiores al rango observado para las secuencias aleatorizadas.

Estas experiencias se realizaron sobre los plásmidos recombinantes pRPAT2.1 y pRPAT2.3 que contienen regiones A+T con dos y cuatro unidades respectivamente del elemento de 113 pb. Se pudo comprobar que, efectivamente, la nucleasa S1 linearizaba los plásmidos superenrollados que contenían la región A+T (Figura 8.IV). Para la obtención del mapa del o de los posibles sitios de corte, el DNA sometido a digestión con la nucleasa S1 se digirió después con los enzimas *EcoRI*, *AccI*, *DdeI* y *RsaI*, y doblemente con cada uno de los dos últimos y *HindIII* (Figura 8.IV). En las dobles digestiones en las que intervenía la nucleasa S1 aparecían bandas que no estaban presentes en las digestiones control sin S1. De los tamaños e intensidades de estas bandas se pudo concluir que la nucleasa S1 producía tres cortes muy próximos entre sí en la región A+T y que aparentemente uno de ellos era mayoritario con respecto a los otros dos. Para asegurarnos de que no había habido una sobredigestión, se realizaron las digestiones a diferentes tiempos, desde 5 hasta 50 minutos y a dos temperaturas diferentes (20°C y 37°C) observándose en todos los casos el mismo patrón, aunque a tiempos largos y a 37°C se observó cierta degradación de algunos fragmentos. Así, estos puntos de corte de la S1 se pudieron localizar en el mapa de restricción de la región. El punto presuntamente mayoritario se localizaría a unas 400 pb desde el extremo *HindIII* del inserto que está incluido en el tRNA^{met}, y los otros dos a unas 440 y 460 pb respectivamente desde el mismo extremo. Estas tres posiciones se localizan justamente en la zona donde están situados los bloques de series de TAs, que es donde se había predicho que pudiesen existir diferentes estructuras secundarias dependiendo de los diferentes apareamientos intracatenarios que se produjesen entre dichos bloques.

Los resultados fueron idénticos para los dos plásmidos con los que se realizaron estas experiencias, no existiendo evidencias de que la nucleasa S1 cortase en otros posibles sitios candidatos diferentes a los mencionados, como podían ser el oligo-G/oligo-C o la zona de las repeticiones.

Por último, decidimos tratar de establecer de forma más precisa la posición de los puntos de corte y de esta forma determinar definitivamente cuales de las estructuras secundarias predichas por los plegamientos era más probable que se formasen *in vivo*. Para ello procedimos a secuenciar los extremos de los fragmentos resultantes de la digestión con la nucleasa S1 que nos proporcionarían las secuencias flanqueantes de las zonas de desapareamiento estable (límites del "loop").

En la recircularización de los plásmidos digeridos con la S1 se siguió el esquema que se muestra en la Figura 9.IV y se transformó con ellos la cepa correspondiente de *E. coli*. Con este esquema obtuvimos dos tipos de plásmidos: aquellos en los que a partir del sitio *SmaI* de inserción del inserto se leía inmediatamente la secuencia flanqueante del extremo 5' del "loop", y aquellos en los que a partir de ese mismo sitio leíamos la correspondiente al extremo 3'. Dado que la S1 reconocía más de un punto de corte, todos los plásmidos recombinantes de un mismo tipo no serían necesariamente idénticos, sino que diferirían (precisamente) en la

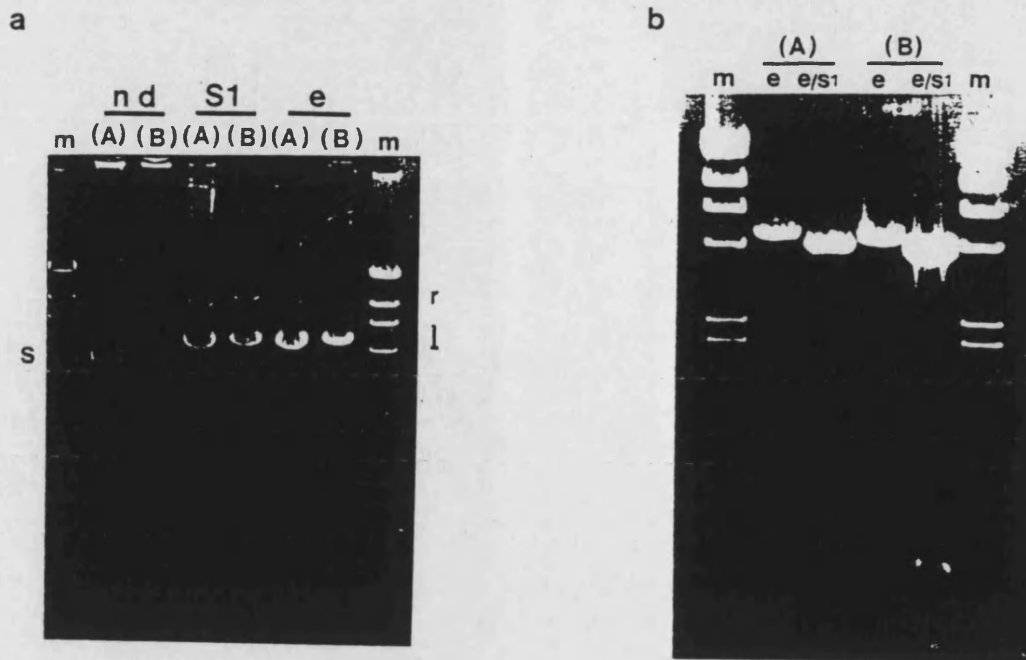


Figura 8.IV. Experiencias de mapeo realizadas con la nucleasa S1 sobre los plásmidos recombinantes pRPAT2.1 (A) y pRPAT2.3 (B). a) Evidencia de la existencia de alguna zona sensible a la acción de la nucleasa. nd, DNA no digerido; S1, DNA digerido con 10 unidades de nucleasa S1 30 minutos a 37°C; e, DNA linearizado en el sitio *EcoRI* del sitio de clonación múltiple del vector; s, forma superenrollada; l, forma lineal; r, formas relajadas; m, marcador de tamaño (DNA del fago lambda digerido con *HindIII*). El porcentaje de agarosa del gel fue del 0.8%. b) Mapeo del sitio S1 respecto al sitio *EcoRI* del vector. e/S1, digestión con *EcoRI* del DNA previamente digerido con 10 unidades de nucleasa S1 durante 30 minutos a 37°C. El porcentaje del gel de agarosa fue del 0.8%. c) Digestiones con *EcoRI* del DNA previamente digerido con la nucleasa S1 durante 30 minutos a 20°C (carreras 1 y 3) y a 37°C (carreras 2 y 4). Dobles digestiones *RsaI-HindIII* del DNA previamente tratado con la nucleasa S1 30 minutos a 20°C (carreras 5 y 8) y a 37°C (carreras 6 y 9).

Las carreras 7 y 0 corresponden a dobles digestiones *RsaI-HindIII* del DNA de los plásmidos recombinantes sin tratamiento con la nucleasa S1. El porcentaje de agarosa del gel fue del 1.2%. Se puede apreciar en los tratamientos a 20°C la presencia de tres bandas nítidas generadas por acción de la nucleasa S1, una de ellas de mayor intensidad (). VI corresponde al marcador de tamaños comercializado por Boehringer Mannheim con este nombre.

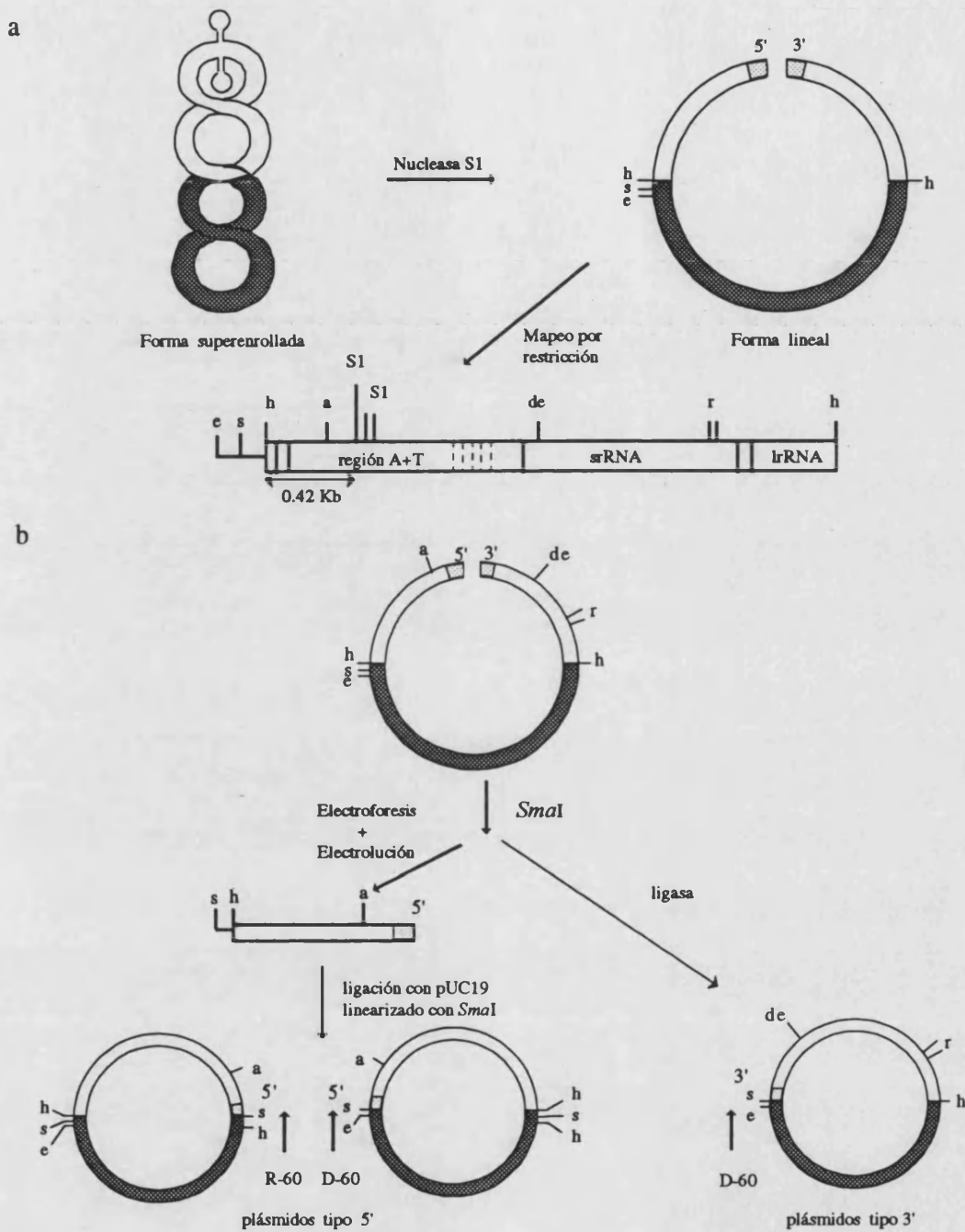


Figura 9.IV. Representación esquemática de las experiencias de mapeo efectuadas con la nucleasa S1. a) Esquema seguido para la detección y mapeo por restricción de las zonas de desapareamiento estable presentes en la región control del mtDNA de *R. padi* y que se señalan como S1. b) Procedimiento seguido para la secuenciación de las zonas adyacentes a las zonas de desapareamiento estable. Los sitios de restricción son los mismos que en la figura 5.IV. Además se señalan los sitios de restricción *EcoRI* (e) y *SmaI* (s) del sitio de clonación múltiple del vector. Las regiones adyacentes a la zona de desapareamiento estable se señalan como 5' y 3' indicando así su posición relativa en la secuencia de la cadena mostrada en las figuras 5.IV y 6.IV. ■, vector; □, inserto. R-60 y D-60 son los cebadores utilizados para la obtención de las secuencias.

secuencia de unión al punto *Sma*I. No bastaba por tanto con secuenciar los extremos de un plásmido de cada tipo para tener la secuencia correspondiente a las dos zonas flanqueantes de un "loop", sino que creímos interesante secuenciar varios plásmidos de cada tipo para conseguir tener representados los tres sitios de corte de la nucleasa S1, y por tanto las secuencias flanqueantes de los tres posibles "loops". Además, si realmente uno de los sitios de corte era mayoritario, esto también debería de quedar puesto de manifiesto por una mayor proporción de secuencias obtenidas correspondientes a sus extremos dado que el muestreo de las colonias de *E. coli* transformadas con estos plásmidos era claramente aleatorio.

Se obtuvieron en total 10 secuencias flanqueantes de extremos 5' de "loops" y 15 secuencias flanqueantes de extremos 3'. En la Tabla 3.IV se presentan únicamente las posiciones de inicio de estas secuencias referidas a la secuencia del fragmento *Hind*III que contiene la región control (Figura 6.IV). Cabe hacer hincapié en que la zona o las zonas de desapareamiento estable se han de situar entre un extremo 5' y un extremo 3' flanqueantes. Se pueden distinguir claramente tres grupos de extremos generados por la acción de la nucleasa S1. El grupo más abundante correspondería al de un "loop" flanqueado por las series de TAs numeradas en la Figura 6.IV como 0 y 1. El segundo grupo, dada la corta distancia que separa ambos extremos, correspondería a un corte puntual (probablemente oscilante) en el interior de la serie 1 de TAs. En el tercer grupo las series de TAs 1 y 2 flanquearían el "loop". De aquí podemos deducir que de las posibles estructuras secundarias predichas por los plegamientos de la secuencia, los datos experimentales sólo avalan la existencia de tres de ellas (una mayoritaria respecto a las otras dos) en la región control del mtDNA de *R. padi*, cuando la molécula se encuentra en forma superenrollada (Figura 10.IV). Aunque en esta figura se ha hecho participar a las secuencias flanqueantes en la formación de tallos o "stems" del tipo propuesto para *Drosophila* y para el origen de replicación de la cadena L del mtDNA de vertebrados, la formación de tales "stems" necesita ser confirmada de forma experimental. Lo que sí parece evidente con nuestros datos es la participación de las series de TAs en una desestabilización de los apareamientos entre las dos cadenas del DNA promoviendo un desapareamiento estable en las zonas que flanquean.

Tabla 3.IV. Posiciones nucleotídicas en que la nucleasa S1 ha dejado de digerir y que se pueden considerar como inmediatamente adyacentes a las zonas de desapareamiento estable. Dada la estrategia utilizada para la determinación de estas secuencias, se presentan las posiciones correspondientes a las zonas adyacentes 5' y 3' de la cadena que se representa en las Figuras 5.IV y 6.IV. Se secuenciaron parcialmente un total de 10 plásmidos recombinantes del tipo 5' y 15 plásmidos del tipo 3' (Figura 9.IV) que fueron clasificados en tres grupos diferentes (uno de ellos claramente mayoritario).

| Grupo I | | Grupo II | | Grupo III | |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| posiciones 5' | posiciones 3' | posiciones 5' | posiciones 3' | posiciones 5' | posiciones 3' |
| 406 | 422 | 441 | 444 | 454 | 471 |
| 410 | 427 | 444 | 444 | | 481 |
| 406 | 426 | | | | |
| 402 | 427 | | | | |
| 402 | 418 | | | | |
| 410 | 416 | | | | |
| 413 | 422 | | | | |
| | 425 | | | | |
| | 426 | | | | |
| | 421 | | | | |
| | 425 | | | | |

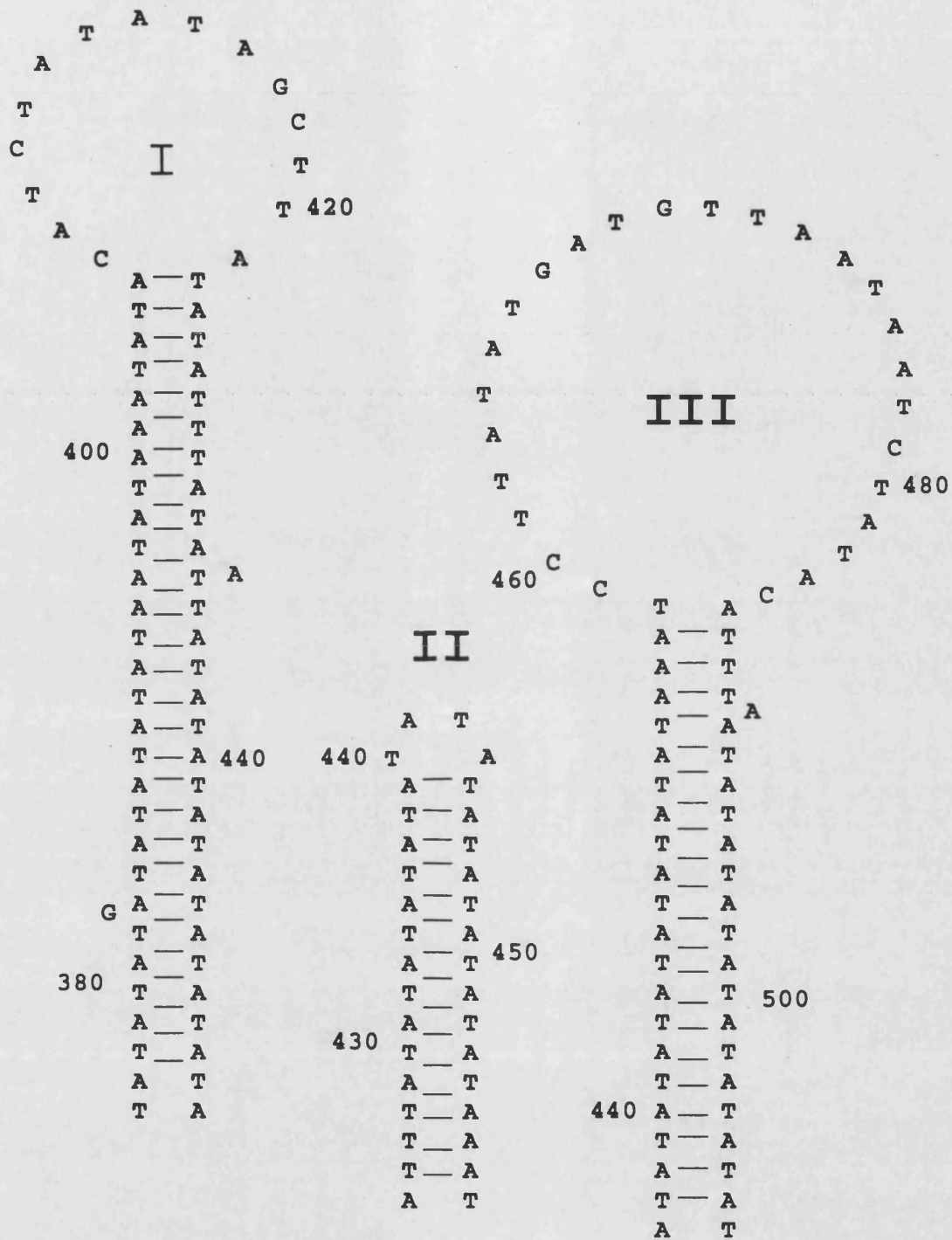


Figura 10. Estructuras secundarias predichas por el programa MFOLD para la region A+T. Únicamente se han representado tres que pueden estar avaladas por las experiencias de digestión y mapeo con la nucleasa S1. La estructura I sería la mayoritaria según los datos de mapeo y secuenciación. Las posiciones indicadas corresponden a las de las secuencias representadas en las figuras 5 y 6.

IV.3.1.4. Variación en tamaño de la región control en poblaciones naturales de *R. padi*.

Una vez caracterizadas las bases moleculares de este tipo de polimorfismo en *R. padi* y cuando menos intuidos los posibles mecanismos que lo generan, el estudio de los patrones de variación de tamaño en la región control del mtDNA en las poblaciones naturales de esta especie es interesante no solo por su posible utilidad en el análisis de la estructura y dinámica de estas poblaciones sino también porque los resultados de este análisis pueden contribuir a un conocimiento más general sobre cómo se integran los procesos de deriva, mutación y selección en el mantenimiento de este tipo de polimorfismo en el mtDNA.

Cada uno de los 148 clones de *R. padi* analizados en este trabajo fue caracterizado con respecto al número de repeticiones en tandem presentes en su mtDNA. Para ello utilizamos como diagnóstico el tamaño estimado para el fragmento *HindIII* que contiene la región control y que oscila dependiendo del clon analizado entre 2.0 y 2.8 kb (Figura 11.IV). De esta forma cada clon de *R. padi* se asignó a la correspondiente clase de tamaño de acuerdo con el número de repeticiones deducido para el mencionado fragmento. Aquellos clones con un tamaño para este fragmento de 2.0 kb contienen una única unidad del elemento de 113 pb, aquellos con un tamaño de 2.1 kb contienen dos unidades repetidas en tándem de dicho elemento, aquellos con un tamaño de 2.2 kb contienen tres unidades, y así sucesivamente. En algunos clones era manifiesta la presencia de más de un tipo de tamaño para el fragmento *HindIII* en cuestión (Figura 12.IV). De aquí se deduce que estos clones poseen un mtDNA heterogéneo en tamaño y por tanto se han de considerar como clones heteroplásmicos. Con el objeto de detectar posibles casos de heteroplasmia en los que alguna de las clases de tamaño estuviese presente en muy baja proporción, y por lo tanto no fuese detectada directamente en los geles, se realizaron hibridaciones con el subfragmento *AccI-RsaI* del plásmido recombinante pRPAT2.1 (Figura 5.IV). En aquellos clones que resultaron heteroplásmicos se determinó la proporción de cada una de las clases de tamaño presentes mediante densitometrado de las películas correspondientes a las hibridaciones con la sonda mencionada.

En la Tabla 4.IV se muestra la distribución en clases de tamaño para esta región de los 148 clones analizados agrupados por localidades de muestreo. En aquellas localidades en las que se había realizado más de un muestreo (ver Tabla 1.II) se comprobó previamente que no existían diferencias significativas en la distribución de los clones en clases de tamaño entre diferentes periodos de muestreo, mediante la realización de un test de ji cuadrado (X^2) especialmente adecuado para la comparación de muestras pequeñas (Roff y Bentzen, 1989) basado en la aleatorización de los datos de una matriz bidimensional manteniendo constantes las frecuencias marginales.

Treinta y siete de los 148 clones (el 25%) resultaron heteroplásmicos y salvo dos en que se detectaron tres tamaños diferentes estos clones solo presentaban dos clases de tamaño distintas. Se encontraron clones heteroplásmicos en todas las poblaciones en que se analizaron



Figura 11.IV. Digestiones con el enzima de restricción *Hind*III de clones de *R. padi* que muestran el rango de tamaños observado para el fragmento variable. La hibridación se efectuó con la sonda *AccI-RsaI* que contiene la zona variable en tamaño.

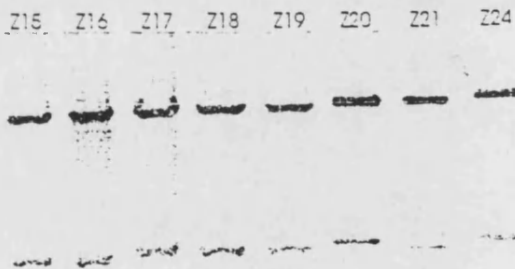


Figura 12.IV. Digestiones con el enzima de restricción *Hind*III de ocho clones de *R. padi* donde se puede apreciar un claro ejemplo de heteroplasma de tamaño (clon Z21). La hibridación se efectuó con la sonda *XbaI*Rp.

más de cinco clones. De los 37 sólo dos presentaron una de sus clases de tamaño menor a dos repeticiones, correspondiéndose este tamaño (2.0 kb) con una región control con un única copia del elemento de 113 pb. Entre los clones homoplásmicos, sin embargo, no se encontró ninguno que contuviese menos de dos repeticiones (2.1 kb para el fragmento *HindIII* variable).

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de clones heteroplásmicos frente a homoplásmicos entre las diferentes poblaciones analizadas ($X^2=11.79$, g.l.=7, $P=0.11$) ni entre los diferentes periodos de muestreo realizados en las localidades de Córdoba y Zaragoza ($X^2=1.75$, g.l.=2, $P=0.451$ y $X^2=7.34$, g.l.=5, $P=0.186$ respectivamente). En las otras tres poblaciones en las que se había realizado más de un muestreo (Madrid, Tarragona y Rennes) la proporción de clones heteroplásmicos fué significativamente diferente entre muestreos ($X^2=7.45$, g.l.=2, $P=0.03$; $X^2=1.88$, g.l.=1, $P=0.0000$ y $X^2=2.94$, g.l.=1, $P=0.038$ respectivamente), aunque en el caso de Tarragona el número de clones capturados en los dos periodos en que se muestreó fué pequeño (3 y 2 clones respectivamente) detectándose un único clon heteroplásmico en el segundo muestreo.

La clase de tamaño más frecuentemente encontrada en los diferentes clones analizados fué la correspondiente a un tamaño para el fragmento *HindIII* variable de 2.4 kb y que contiene, por tanto, cinco repeticiones. La frecuencia global de esta clase considerando la contribución de los clones heteroplásmicos fué del 64%. Comparando entre poblaciones, únicamente no se detectó en Bristol, y Lexington, pero el número de clones muestreados de estas poblaciones fué también muy pequeño (2 y 1 respectivamente). Contrariamente, tanto el único clon procedente de La Plata como el clon procedente de Stillwater poseen este tamaño. En el resto de poblaciones la clase de tamaño correspondiente a cinco repeticiones fué la más frecuente (con excepción hecha de Colmar) tanto entre los clones homoplásmicos como entre los heteroplásmicos (Figura 13.IV)

En cuanto a la distribución en clases de tamaño de los clones muestreados analizamos por separado los clones homoplásmicos y heteroplásmicos excluyendo aquellas poblaciones en las que sólo se había muestreado un único clon (Lexington, Stillwater y La Plata). Considerando el resto de poblaciones se encontraron diferencias significativas en la distribución de los clones homoplásmicos ($X^2=73.5$, g.l.=108, $P=0.039$), aunque si se excluían del análisis las poblaciones francesas (Rennes y Colmar) y la población de Bristol (con solo dos clones muestreados) no se encontraron diferencias significativas entre las restantes poblaciones (Madrid, Córdoba, Zaragoza, Tarragona y San Francisco), ($X^2=28.63$, g.l.=16, $P=0.086$). La representación gráfica de la distribución de los clones heteroplásmicos muestra que salvo en la población francesa de Rennes, su distribución es similar en las tres poblaciones en que se han detectado un número suficiente de clones heteroplásmicos, y similar a su vez a la distribución de los clones homoplásmicos aunque más amplia (Figura 15.IV). Esta distribución se caracteriza por ser unimodal con una clase de tamaño central (la correspondiente a 5 repeticiones o a un tamaño para el fragmento *HindIII* variable de 2.4 Kb) altamente frecuente

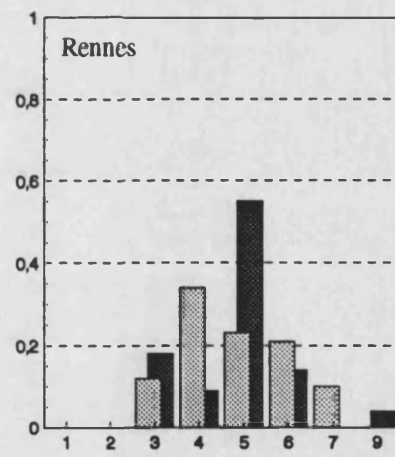
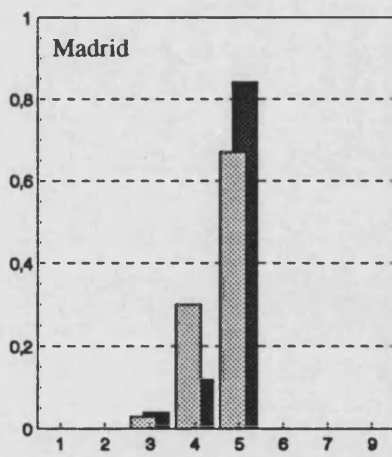
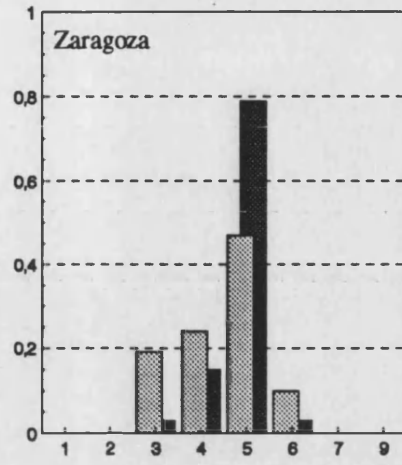
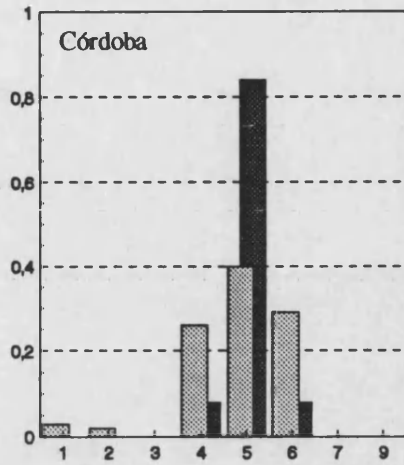


Figura 13.IV. Distribuciones de los clones homoplásmicos y heteroplásmicos de *R.padi* para el fragmento variable *Hind*III. No se incluyen localidades con un número reducido de individuos. ■ Clones homoplásmicos ▨ Clones heteroplásmicos.

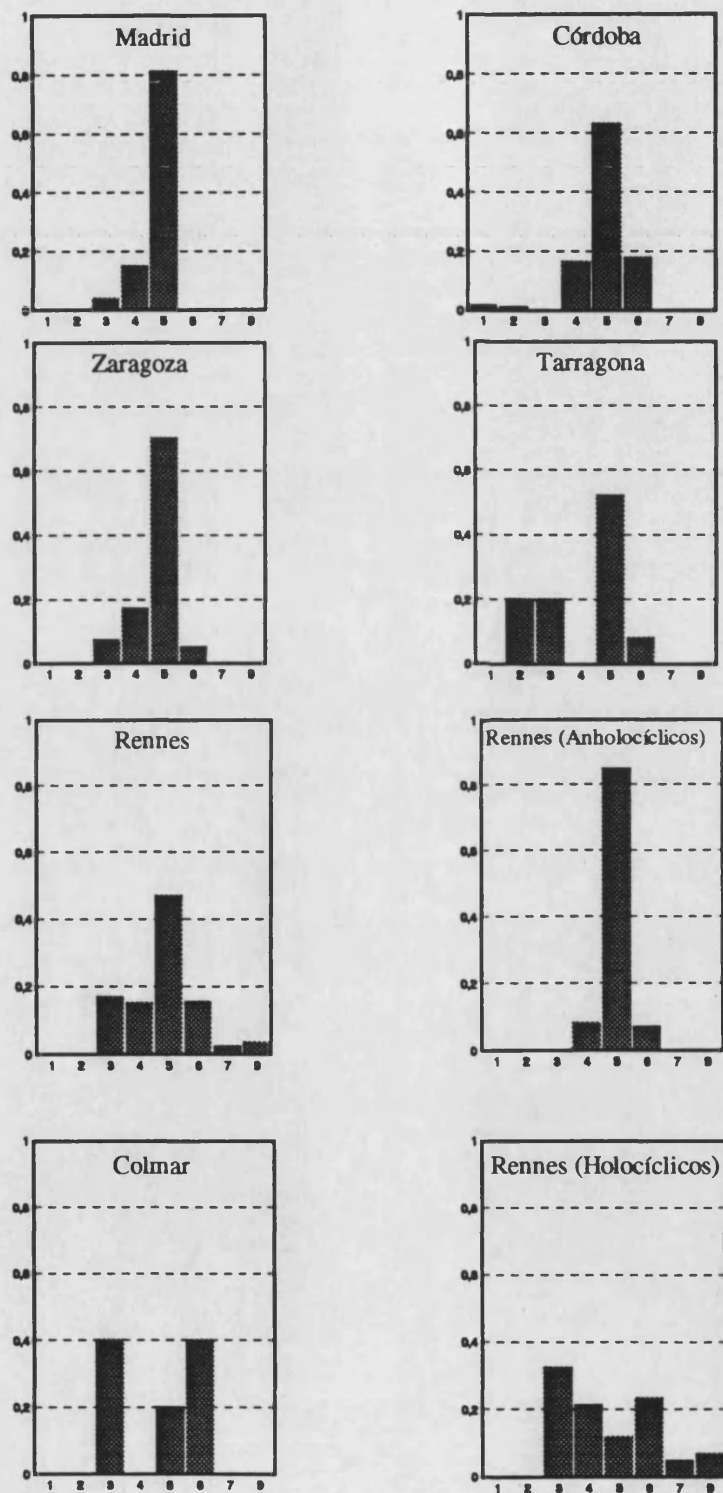


Figura 14.IV. Distribución de los clones de *R. padi* en clases de tamaño para el fragmento variable *Hind*III considerando conjuntamente los clones homoplásmicos y heteroplásmicos. Las poblaciones con un solo individuo no han sido incluidas.

en todas ellas. En la población de Rennes los clones homoplásmicos presentan básicamente esta misma distribución aunque algo más amplia, pero los clones heteroplásmicos parecen estar distribuidos de forma más uniforme.

Los clones heteroplásmicos fueron redistribuidos en sus clases de tamaño componentes de forma que su contribución a una clase de tamaño dada es determinada por la fracción de moléculas de mtDNA que pertenecen a esa clase (Tabla 5.IV). Los datos se muestran en la Tabla 6.IV, en la que para cada clase de tamaño se considera la contribución de todos los clones. No se encontraron diferencias significativas entre poblaciones en la distribución de los clones así reasignados ($X^2 = 74.93$, g.l.=42, $P=0.0630$). En la Figura 14.IV se muestra gráficamente la distribución conjunta de los clones homoplásmicos y heteroplásmicos para las distintas poblaciones con más de un clon muestreado. La forma de la distribución es en general muy similar en todas las poblaciones a excepción de Colmar y Bristol. De nuevo, la clase correspondiente a 5 repeticiones aparece como la clase más frecuente constituyendo la moda de la distribución. En la población de Rennes la distribución es más amplia y más aplanada, reflejando una mayor diversidad. A pesar de no haber detectado diferencias significativas en la distribución global considerando conjuntamente los clones homoplásmicos y heteroplásmicos, el hecho de haber detectado diferencias significativas en la distribución de los clones homoplásmicos aparentemente motivadas por la diferente distribución de los clones franceses e ingleses, y el hecho de que aquellos mostraran una distribución diferente para los clones heteroplásmicos (población de Rennes), decidimos analizar con más detalle estas poblaciones.

Como ya se explicó en el apartado de material y métodos, estos clones fueron proporcionados por el Dr. J. C. Simon (INRA, Francia) y el factor determinante para su elección fué el conocimiento de un rasgo biológico importante como es su ciclo de vida (Tabla 1.II). Los cinco clones de Colmar y los dos de Bristol eran holocíclicos, mientras que de los 29 clones pertenecientes a la población de Rennes 15 eran holocíclicos y 14 anholocíclicos. Se comprobó que entre los dos tipos de clones de la población de Rennes existían diferencias significativas en cuanto a su distribución en clases de tamaño para la región estudiada ($X^2=16.3$, g.l.=5, $P=0.002$). Representando gráficamente por separado la distribución en clases de tamaño de ambos tipos de clones de esta población se pudo comprobar (Figura 16.IV) cómo la distribución de los clones holocíclicos era similar a la de los clones de las poblaciones de Colmar y Bristol (de hecho no se encontraron diferencias significativas en su distribución), mientras que la distribución de los clones anholocíclicos seguía el mismo patrón que el de las poblaciones españolas con una clase de tamaño central muy frecuente.

Como se discutirá más adelante, dada la aparente estabilidad de la heteroplasma durante al menos unas pocas generaciones (Solignac et al., 1984, Rand y Harrison, 1986), asumimos que la heteroplasma intraclonal era equivalente a heteroplasma intraindividual. Esta asunción se basaba además en el hecho de que cada clon había sido fundado a partir de una única hembra partenogénica. Aunque se hubiese producido alguna segregación de las

variantes de tamaño desde la fundación del clon heteroplásmico hasta el momento preciso de la extracción del mtDNA, la frecuencia observada para cada variante de tamaño presente en el clon debía reflejar las frecuencias iniciales en la hembra fundadora del mismo.

Considerando conjuntamente los datos de distribución de los clones homoplásmicos y heteroplásmicos (Tabla 6.IV), procedimos a un análisis de componentes jerárquicos de la diversidad (Tabla 7.IV) en el que en base a lo expuesto, la diversidad intraclonal es considerada como intraindividual. La descomposición de la variación en tamaño en sus componentes jerárquicos se realizó siguiendo la formulación propuesta por Rand y Harrison (1989). Para cada nivel de variación se calculó la diversidad genética como $K = 1 - \sum x_i^2$ donde x_i es la frecuencia de la clase de tamaño "i" dentro de individuos (clones), dentro de localidades o demes, o dentro de la muestra total. Así, se estimaron las diversidades dentro de clones (K_b), dentro de localidades (K_c), y dentro del total de la muestra (K_t). De acuerdo con Lewontin (1972), la descomposición de la diversidad en sus componentes jerárquicas se realizó de la siguiente manera:

$$C_i = K_b/K_t$$

$$C_{ip} = (K_c - K_b)/K_t$$

$$C_{pt} = (K_t - K_c)/K_t$$

donde C_i , C_{ip} y C_{pt} corresponden respectivamente a los componentes intraindividual (intraclonal), intrademes (interclonal) e interdemes de la diversidad total, de forma que $C_i + C_{ip} + C_{pt} = 1.0$. K_b , y K_c son las diversidades medias estimadas sobre todos los clones o sobre todos los demes respectivamente. Las varianzas de estos parámetros se estimaron mediante el método de "jackknife".

Para establecer comparaciones se calculó un estadístico de heterogeneidad siguiendo el método de Desalle y col. (1987). Las frecuencias de cada clase de tamaño en las diferentes poblaciones se transformaron mediante el arcoseno de su raíz cuadrada y se contrastó la presencia de heterogeneidad significativa entre poblaciones mediante el siguiente estadístico:

$$V = 4 \sum_{i=1}^r (a_i - A)^2$$

donde a_i es la frecuencia transformada de la muestra i , $A = (\sum_{i=1}^r a_i)/N$ y $N = \sum_{i=1}^r n_i$. V se calculó sumando para todas las r muestras y tiene una distribución X^2 con $r-1$ grados de libertad.

En estos análisis únicamente se incluyeron los datos de aquellas poblaciones en las que se habían muestreado más de un clon.

El estadístico V (Tabla 6.IV) puso de manifiesto que dos clases de tamaño, las clases correspondientes a cinco y seis repeticiones, mostraban heterogeneidad significativa entre poblaciones. Dado que, como se ha mencionado, los clones holocíclicos parecían tener una distribución diferente a la de los clones anholocíclicos, se recalcularon los valores del estadístico excluyendo todos los clones que a priori habían sido caracterizados como holocíclicos, es decir, los 5 clones de Colmar, los 2 clones de Bristol y los 15 clones

holocíclicos de Rennes. Excluyendo estos clones no se observó heterogeneidad significativa para ninguna de las clases de tamaño entre las diferentes poblaciones (Tabla 6.IV).

En general, la diversidad intraindividual (intraclonal) media (K_b) en las poblaciones mejor muestreadas alcanza valores cercanos a 0.1 debido a la incidencia de los clones heteroplásmicos cuya frecuencia resultó ser similar en dichas poblaciones en torno al 25% con excepción de Córdoba. La población de Córdoba presenta el valor más alto de diversidad intraindividual (0.16) como consecuencia del elevado número de clones heteroplásmicos detectados en esta población (48%).

De las cuatro poblaciones de las que se disponía mayor número de clones (Madrid, Córdoba, Zaragoza y Rennes) esta última es la que presenta una diversidad intrapoblacional debida a diferencias entre individuos (clones) más alta ($K_c=0.70$). Como ya se indicó esta población no parecía homogénea en cuanto a su distribución en clases de tamaño (Figura 16.IV) encontrándose diferencias significativas entre las distribuciones de los 15 clones holocíclicos y los 14 anholocíclicos pertenecientes a esta población. Desglosando esta población en los dos grupos mencionados se encontró que la diversidad dentro de cada uno de ellos era muy diferente. Los valores de K_c obtenidos para los clones holocíclicos y anholocíclicos fueron respectivamente 0.7753 y 0.2717 reflejando por tanto una mayor diversidad entre los clones holocíclicos.

La estructura jerárquica de esta variabilidad deducida de los estadísticos para tres niveles C_i , C_{ip} y C_{pt} , demuestra que el 69% de la diversidad total se debe a diferencias entre individuos (clones) dentro de localidades o demes y alrededor del 18% a diferencias dentro de los clones como consecuencia de la heteroplasma. En conjunto un 87% de la diversidad total detectada reside dentro de las poblaciones estudiadas. Solamente una fracción relativamente pequeña de la diversidad total es debida a diferencias entre localidades (13%) indicando cierta diferenciación poblacional. El análisis por "jackknife" generó estimas muy pequeñas para las varianzas de estos estadísticos indicando que las conclusiones derivadas de estos datos no se verían muy afectadas si los tamaños poblacionales fueran superiores.

El hecho de que el tipo de ciclo de vida aparezca como un posible factor determinante de cierta heterogeneidad entre poblaciones justificaría su inclusión como un cuarto nivel de variación que jerárquicamente quedaría situado debajo del nivel global. Sin embargo dado que solamente disponíamos de una población en la que se hubieran muestreado tanto individuos holocíclicos como anholocíclicos (población de Rennes), este análisis fué inviable. A pesar de ello, y de lo reducido de la muestra, analizamos cómo se distribuía la diversidad dentro de esta población descomponiéndola en dos linajes, uno correspondiente a los clones holocíclicos y otro a los clones anholocíclicos. El significado de los estadísticos C es similar al definido anteriormente solo que en este caso el nivel "población" es sustituido por el nivel "linaje" (L) (Tabla 7.IV). En este análisis, una considerable fracción (25.6%) de la diversidad total es explicada por diferencias entre los dos linajes dentro de la misma población de Rennes.



Tabla 4.IV. Distribución de los clones de *R. padi* de acuerdo con el tamaño del fragmento variable *HindIII*. Para cada población se indica el número de clones homoplásmicos/heteroplásmicos que contribuyen a cada clase de tamaño.

| Población | Tamaño del fragmento variable <i>HindIII</i> | | | | | | | | hom/het | Total | |
|-------------------|--|------------|------------|--------------|--------------|-------------|------------|------------|---------|---------------|------------|
| | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | 2.6 | 2.8 | | | |
| España | | | | | | | | | | | |
| Madrid | | | 1/1 | 3/4 | 21/5 | | | | | 25/5 | 30 |
| Córdoba | 0/2 | 0/2 | | 1/4 | 11/12 | 1/5 | | | | 13/12 | 25 |
| Zaragoza | | | 1/5 | 5/6 | 26/10 | 1/4 | | | | 33/12 | 45 |
| Tarragona | | 1/0 | 1/0 | | 2/1 | 0/1 | | | | 4/1 | 5 |
| Francia | | | | | | | | | | | |
| Rennes | | | 4/1 | 2/5 | 12/4 | 3/4 | 0/1 | 1/0 | | 22/7 | 29 |
| Colmar | | | 2/0 | | 1/0 | 2/0 | | | | 5/0 | 5 |
| Inglaterra | | | | | | | | | | | |
| Bristol | | | | 1/0 | | 1/0 | | | | 2/0 | 2 |
| U.S.A. | | | | | | | | | | | |
| S. Francisco | | | | | 4/0 | | | | | 4/0 | 4 |
| Stillwater | | | | | 1/0 | | | | | 1/0 | 1 |
| Lexington | | 1/0 | | | | | | | | 1/0 | 1 |
| Argentina | | | | | | | | | | | |
| La Plata | | | | | 1/0 | | | | | 1/0 | 1 |
| Total | 0/2 | 2/2 | 9/7 | 12/19 | 79/32 | 8/14 | 0/1 | 1/0 | | 111/37 | 148 |

Tabla 5.IV. Contribución de los clones heteroplásmicos a cada clase de tamaño. Para cada clon se indica la proporción deducida mediante densitometría en que están presentes las clases de tamaño componentes.

| | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | 2.6 | 2.8 |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Población/clon | | | | | | | | |
| Madrid | | | | | | | | |
| /M10 | | | | 0.25 | 0.75 | | | |
| /M16 | | | | 0.50 | 0.50 | | | |
| /M18 | | | 0.15 | | 0.85 | | | |
| /M19 | | | | 0.15 | 0.85 | | | |
| /M20 | | | | 0.60 | 0.40 | | | |
| Córdoba | | | | | | | | |
| /C2 | | | | | 0.10 | 0.90 | | |
| /C4 | | 0.10 | | 0.45 | 0.45 | | | |
| /C8 | | 0.15 | | | 0.85 | | | |
| /C10 | 0.20 | | | | 0.80 | | | |
| /C11 | | | | | 0.45 | 0.55 | | |
| /C12 | | | | | 0.30 | 0.70 | | |
| /C13 | 0.20 | | | | 0.80 | | | |
| /C16 | | | | 0.90 | 0.10 | | | |
| /C19 | | | | 0.85 | 0.15 | | | |
| /C23 | | | | | 0.25 | 0.75 | | |
| /C24 | | | | 0.90 | 0.10 | | | |
| /C25 | | | | | 0.45 | 0.55 | | |
| Zaragoza | | | | | | | | |
| /Z8 | | | | | 0.45 | 0.55 | | |
| /Z21 | | | | 0.55 | | 0.45 | | |
| /Z22 | | | 0.15 | | 0.85 | | | |
| /Z25 | | | 0.50 | | 0.50 | | | |
| /Z28 | | | | 0.40 | 0.60 | | | |
| /Z33 | | | | 0.45 | 0.55 | | | |
| /Z35 | | | 0.10 | | 0.90 | | | |
| /Z38 | | | 0.70 | | 0.30 | | | |
| /Z39 | | | | | 0.85 | 0.15 | | |
| /Z40 | | | | 0.80 | 0.10 | 0.10 | | |
| /Z43 | | | | 0.55 | 0.45 | | | |
| /Z45 | | | 0.85 | 0.15 | | | | |
| Tarragona | | | | | | | | |
| /T4 | | | | | 0.60 | 0.40 | | |
| Rennes | | | | | | | | |
| /R11 | | | | 0.60 | 0.40 | | | |
| /R12 | | | | 0.55 | 0.45 | | | |
| /R14 | | | | 0.45 | 0.55 | | | |
| /R19 | | | | 0.55 | | 0.45 | | |
| /R20 | | | 0.85 | | | 0.15 | | |
| /R21 | | | | 0.20 | | 0.10 | 0.70 | |
| /R22 | | | | | 0.20 | 0.80 | | |

Tabla 6.IV. Distribución de los clones de *R. padi* en clases de tamaño considerando la suma de las contribuciones a cada clase de tamaño de los clones homoplásimicos y la fracción correspondiente de los clones heteroplásimicos de acuerdo con la Tabla 5.IV. Los datos se dan en porcentajes. También se indica el valor del estadístico V de heterogeneidad (DeSalle et al., 1987).

| Población | Tamaño del fragmento variable <i>Hind</i> III | | | | | | | | n |
|-------------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | 2.6 | 2.8 | |
| España | | | | | | | | | |
| Madrid | | | 0.04 | 0.15 | 0.81 | | | | 30 |
| Córdoba | 0.02 | 0.01 | | 0.16 | 0.63 | 0.18 | | | 25 |
| Zaragoza | | | 0.07 | 0.18 | 0.70 | 0.05 | | | 45 |
| Tarragona | | 0.20 | 0.20 | | 0.52 | 0.08 | | | 5 |
| Francia | | | | | | | | | |
| Rennes | | | 0.17 | 0.15 | 0.47 | 0.16 | 0.02 | 0.03 | 29 |
| Colmar | | | 0.04 | | 0.02 | 0.04 | | | 5 |
| Inglaterra | | | | | | | | | |
| Bristol | | | | 0.50 | | 0.50 | | | 2 |
| U.S.A. | | | | | | | | | |
| S. Francisco | | | | | 1.00 | | | | 4 |
| Stillwater | | | | | 1.00 | | | | 1 |
| Lexington | | 1.00 | | | | | | | 1 |
| Argentina | | | | | | | | | |
| La Plata | | | | | 1.00 | | | | 1 |
| Total | 0.002 | 0.015 | 0.083 | 0.148 | 0.641 | 0.099 | 0.005 | 0.006 | 148 |
| Valor V (1) | 1.729 | 4.543 | 11.001 | 3.465 | 17.522* | 14.983* | 2.019 | 2.516 | 7.222 |
| Valor V (2) | 1.201 | 4.006 | 4.597 | 1.844 | 5.634 | 7.635 | - | - | 4.153 |

(1) Calculado considerando todas las poblaciones con más de un clon. g.l.=7.

(2) Calculado eliminando además todos los clones caracterizados previamente como holocíclicos (Tabla I1) por lo que dos clases de tamaño (2.6 y 2.8) desaparecen. g.l.=5.

(*) Valores de V significativos ($P < 0.05$).

Tabla 7.IV. Índices de diversidad (Kb, Kc y Kt) y componentes jerárquicos de la diversidad (C_i , C_{ip} y C_{pt}) del fragmento variable *HindIII* para los 145 clones de *R. padi* pertenecientes a las localidades en que se había muestreado más de un clon.

| | Kb | kc | Kt |
|------------------|-------------------|-------------------|--------|
| Población | | | |
| Madrid | 0.0622 | 0.3172 | |
| Córdoba | 0.1624 | 0.5416 | |
| Zaragoza | 0.1037 | 0.4697 | |
| Tarragona | 0.0960 | 0.6432 | |
| Rennes | 0.1034 | 0.7037 | |
| Colmar | 0.0000 | 0.6400 | |
| Bristol | 0.0000 | 0.5000 | |
| S. Francisco | 0.0000 | 0.0000 | |
| Valor medio | 0.0970 | 0.4769 | 0.5493 |
| | $C_i = 0.1766$ | Varianza = 0.0007 | |
| | $C_{ip} = 0.6916$ | Varianza = 0,0038 | |
| | $C_{pt} = 0.1318$ | Varianza = 0.0038 | |

IV.3.2. Variación en tamaño detectada para un fragmento *TaqI*.

Además de la variación en tamaño de la región control descrita en el apartado anterior, se encontró una segunda región de tamaño variable que contribuía junto a la primera al amplio polimorfismo de tamaño detectado para el mtDNA de *R. padi*.

Esta segunda región variable fué detectada al profundizar en el análisis del polimorfismo de restricción en el mtDNA de esta especie, al incluir en dicho análisis el enzima de restricción *TaqI*. Este enzima revelaba la existencia de un fragmento cuya movilidad variable no se podía explicar como consecuencia de ganancias o pérdidas de sitios de restricción (Figura 15.IV). El tamaño de este fragmento variable oscila entre 1.9 y 2.4 kb con un intervalo de variación de nuevo próximo a las 100 pb. Como en el caso del polimorfismo de tamaño asociado a la región control, en este también se encontraron clones heteroplásmicos.

Al elaborar el mapa de restricción completo del mtDNA de *R. padi* que presentaremos más adelante (Figura 17.IV) conseguimos delimitar esta nueva zona variable en tamaño que resultó estar ubicada entre los genes ND5 y ND4 asumiendo que el tamaño y posición de estos genes sean aproximadamente los mismos que en *Drosophila* y que la zona variable no interrumpe ninguno de ellos.

Los varios intentos realizados para clonar esta zona con el fin de caracterizarla molecularmente resultaron infructuosos. A pesar de ello parece razonable pensar que la variación sea debida a diferencias en el número de copias de una unidad de aproximadamente 100 pb que se encontraría repetida en tandem. En cualquier caso, a falta de la necesaria caracterización molecular, no podemos convertir los tamaños observados para el fragmento en cuestión en un número correspondiente de repeticiones como se hizo para el fragmento variable incluido en la región control.

El análisis de este nuevo polimorfismo de tamaño se realizó básicamente de la misma forma que el llevado a cabo para el fragmento variable *HindIII* salvo que en este caso no se realizaron densitometrados de los geles sino que, en aquellos casos en que la heteroplasma era manifiesta, se estimaron de forma visual las proporciones de cada uno de los tamaños presentes. En algunos clones o bien no se pudo estimar con fiabilidad el tamaño preciso del fragmento en cuestión o bien no quedaba clara la existencia de heteroplasma por lo que fueron excluidos del análisis.

La Tabla 8.IV muestra la distribución de los 133 clones de *R. padi* analizados agrupados por localidades en las seis clases de tamaño observadas para este fragmento. Como en el caso anterior, en aquellas localidades en que se había efectuado más de un muestreo previamente se realizó un test de homogeneidad entre muestreos que en ningún caso resultó ser significativo.

Un total de 16 clones (12%) resultaron heteroplásmicos indicándose en la Tabla 9.IV las proporciones deducidas para cada una de las clases de tamaño presentes. Dado el reducido

número de clones heteroplásmicos detectado no se hizo ningún análisis por separado de los clones homoplásmicos y heteroplásmicos, y la contribución de estos últimos a las diferentes clases de tamaño se sumó a la de los clones homoplásmicos (Tabla 10.IV) tratándose ambos tipos de clones de manera conjunta.

Se encontraron diferencias significativas en la distribución en clases de tamaño entre las poblaciones analizadas ($X^2=107.71$, g.l.=50, $P=xxxx$) que se mantenían al excluir los clones de las poblaciones de Stillwater, Lexington y La Plata en las que solo se había muestreado un único clon. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones españolas ($X^2=7.64$, g.l.=9, $P=0.464$). Si, como se justificó en el apartado anterior, la población de Rennes se descomponía en dos grupos, sus distribuciones no resultaban significativamente diferentes ($X^2=7.56$, g.l.=4, $P=0.095$) pero al ser incluidos por separado en el test de homogeneidad con las poblaciones españolas los resultados eran diferentes según se tratase del grupo de clones holocíclicos o del grupo de clones anholocíclicos. Cuando se incluyeron los clones holocíclicos se observaron diferencias altamente significativas ($X^2=40.57$, g.l.=16, $P=0.008$), mientras que al incluir los anholocíclicos no se encontraron evidencias para rechazar la hipótesis nula de homogeneidad ($X^2=14.35$, g.l.=12, $P=0.228$). Así mismo no se encontraron diferencias ($X^2=5.07$, g.l.=4, $P=0.274$) entre las distribuciones de los clones holocíclicos de Rennes y los 5 clones de Colmar (todos ellos clasificados como holocíclicos) mientras que si existían diferencias significativas entre la distribución de estos últimos y la de los 13 clones anholocíclicos de Rennes incluidos en el análisis ($X^2=12.02$, g.l.=3, $P=0.001$). Así pues, la diferente distribución de los clones franceses motivada por la presencia de numerosos clones holocíclicos se apunta como posible causa de las diferencias encontradas. Esta idea queda ilustrada de forma gráfica en la Figura 16.IV. Se puede observar que, aun existiendo en todas las poblaciones representadas cierta variabilidad en cuanto al tamaño del fragmento *TaqI* en cuestión, las poblaciones españolas (tres de ellas con tamaños muestrales importantes) muestran una clase de tamaño (la de 2.2 Kb) exageradamente frecuente y que este patrón es plenamente coincidente con el de los clones anholocíclicos de Rennes. Contrariamente, tanto la distribución de los clones holocíclicos de Rennes como la de los 5 clones de Colmar parece más amplia tal y como ocurrió al analizar la variación en tamaño del fragmento variable *HindIII*. El diferente patrón de distribución exhibido por los clones holocíclicos y anholocíclicos de Rennes provoca que en la representación conjunta de estos dos tipos de clones, aún detectándose la misma clase modal que en las poblaciones españolas, la distribución sea más amplia.

El estadístico V (Tabla 10.IV) calculado para todas las poblaciones con más de un clon muestreado reveló la existencia de dos clases de tamaño (las clases de 2.2 y 2.4 Kb) cuya frecuencia era heterogénea entre las poblaciones analizadas. Dado que el tamaño del fragmento *TaqI* era el mismo (2.4 Kb) para los cuatro clones de S. Francisco analizados, se recalcularon los valores del estadístico V excluyendo estos clones, comprobándose entonces que solo la

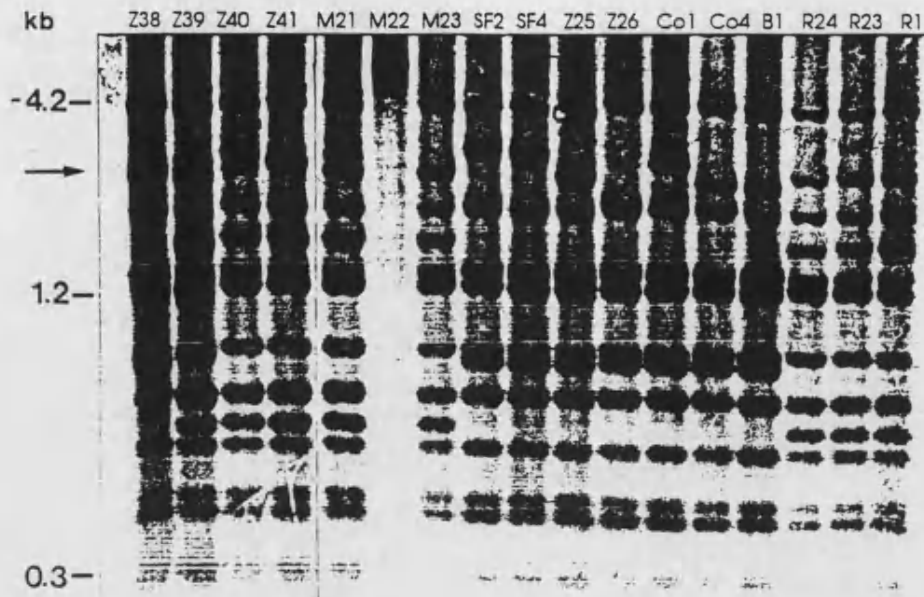


Figura 15.IV. Digestiones con el enzima de restricción *TaqI* de varios los clones de *R. padi* indicados y que muestran polimorfismo de tamaño para el fragmento señalado por la flecha. A la izquierda se señalan los tamaños en kilobases de algunos de los fragmentos obtenidos. La hibridación se efectuó con la sonda *XbaIRp*.

Tabla 8.IV. Distribución de los clones de *R. padi* de acuerdo con el tamaño del fragmento variable *TaqI*. Para cada población se indica el número de clones homoplásmicos/heteroplásmicos que contribuyen a cada clase de tamaño.

| Población | Tamaño del fragmento variable <i>TaqI</i> | | | | | | hom/het | Total |
|-------------------|---|------------|------------|--------------|------------|-------------|---------------|------------|
| | 1.9 | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | | |
| España | | | | | | | | |
| Madrid | | | 0/4 | 16/7 | 0/2 | 2/1 | 18/7 | 25 |
| Córdoba | | | | 21/2 | 0/1 | 0/1 | 21/2 | 23 |
| Zaragoza | | | 0/1 | 31/2 | 1/1 | 4/2 | 36/3 | 39 |
| Tarragona | | | 0/1 | 3/1 | | | 3/1 | 4 |
| Francia | | | | | | | | |
| Rennes | 1/0 | 0/1 | 3/1 | 16/1 | 5/1 | 1/0 | 26/2 | 28 |
| Colmar | | | 1/0 | | 3/0 | 1/0 | 5/0 | 5 |
| Inglaterra | | | | | | | | |
| Bristol | | | 1/0 | | | 1/0 | 2/0 | 2 |
| U.S.A. | | | | | | | | |
| S. Francisco | | | | | | 4/0 | 4/0 | 4 |
| Stillwater | | | | 1/0 | | | 1/0 | 1 |
| Lexington | | | | 1/0 | | | 1/0 | 1 |
| Argentina | | | | | | | | |
| La Plata | | | | 0/1 | | 0/1 | 1/0 | 1 |
| Total | 1/0 | 0/1 | 5/7 | 89/14 | 9/5 | 13/5 | 117/16 | 133 |

Tabla 10.IV. Distribución de los clones de *R. padi* en clases de tamaño para el fragmento *TaqI* considerando la suma de las contribuciones a cada clase de tamaño de los clones homoplásmicos y la fracción correspondiente de los clones heteroplásmicos. Los datos se dan en porcentajes. También se indica el valor del estadístico V de heterogeneidad (DeSalle et al., 1987).

| Población | Tamaño del fragmento variable <i>TaqI</i> | | | | | | n |
|--------------------|---|--------------|--------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
| | 1.9 | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | |
| España | | | | | | | |
| Madrid | | | 0.024 | 0.848 | 0.032 | 0.096 | 25 |
| Córdoba | | | | 0.983 | 0.013 | 0.004 | 23 |
| Zaragoza | | | 0.01 | 0.820 | 0.029 | 0.140 | 39 |
| Tarragona | | | 0.062 | 0.938 | | | 4 |
| Francia | | | | | | | |
| Rennes | 0.036 | 0.018 | 0.125 | 0.589 | 0.196 | 0.036 | 28 |
| Colmar | | | 0.200 | | 0.600 | 0.200 | 5 |
| Inglaterra | | | | | | | |
| Bristol | | | 0.500 | | | 0.500 | 2 |
| U.S.A. | | | | | | | |
| S. Francisco | | | | | | 1.000 | 4 |
| Stillwater | | | | 1.000 | | | 1 |
| Lexington | | | | 1.000 | | | 1 |
| Argentina | | | | | | | |
| La Plata | | | | 0.400 | | 0.600 | 1 |
| Total | 0.007 | 0.004 | 0.051 | 0.740 | 0.081 | 0.117 | 133 |
| Valor V (1) | 2.293 | 1.561 | 9.691 | 45.263* | 13.475 | 23.978* | 16.043 |
| Valor V (2) | - | 1.574 | 1.277 | 4.810 | 2.596 | 5.344 | 3.120 |

(1) Calculado considerando todas las poblaciones con más de un clon. g.l.=7.

(2) Calculado eliminando además todos los clones holocíclicos y los 4 clones de S. Francisco. g.l.=4.

(*) Valores de V significativos ($P < 0.05$).

Tabla 9.IV. Contribución de los clones heteroplásmicos a cada clase de tamaño. Para cada clon se indica la proporción en que están presentes las clases de tamaño componentes.

| Población/clon | 1.9 | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 |
|------------------|-----|------|------|------|------|------|
| Madrid | | | | | | |
| /M5 | | | 0.10 | 0.90 | | |
| /M15 | | | 0.10 | 0.90 | | |
| /M16 | | | | 0.70 | 0.30 | |
| /M19 | | | | 0.50 | 0.50 | |
| /M21 | | | | 0.60 | | 0.40 |
| /M26 | | | 0.25 | 0.75 | | |
| /M30 | | | 0.15 | 0.85 | | |
| Córdoba | | | | | | |
| /C14 | | | | 0.90 | | 0.10 |
| /C15 | | | | 0.70 | 0.30 | |
| Zaragoza | | | | | | |
| /Z10 | | | | 0.85 | 0.15 | |
| /Z21 | | | 0.40 | | | 0.60 |
| /Z40 | | | | 0.15 | | 0.85 |
| Tarragona | | | | | | |
| /T5 | | | 0.25 | 0.75 | | |
| Rennes | | | | | | |
| /R5 | | 0.50 | | 0.50 | | |
| /R14 | | | 0.50 | | 0.50 | |
| Argentina | | | | | | |
| /LP1 | | | | 0.40 | 0.55 | 0.60 |

Tabla 11.IV. Índices de diversidad (Kb, Kc y Kt) y componentes jerárquicos de la diversidad (C_i , C_{ip} y C_{pt}) del fragmento variable *TaqI*, para los 130 clones de *R. padi* analizados pertenecientes a las localidades en que se había muestreado más de un clon.

| | Kb | kc | Kt |
|--------------|-------------------|-------------------|--------|
| Población | | | |
| Madrid | 0.0956 | 0.2701 | |
| Córdoba | 0.0261 | 0.0343 | |
| Zaragoza | 0.0254 | 0.3063 | |
| Tarragona | 0.0937 | 0.1172 | |
| Rennes | 0.0357 | 0.5957 | |
| Colmar | 0.0000 | 0.5600 | |
| Bristol | 0.0000 | 0.5000 | |
| S. Francisco | 0.0000 | 0.0000 | |
| Valor medio | 0.04119 | 0.2979 | 0.4313 |
| | $C_i = 0.0955$ | Varianza = 0.0006 | |
| | $C_{ip} = 0.5953$ | Varianza = 0,0057 | |
| | $C_{pt} = 0.3092$ | Varianza = 0.0062 | |

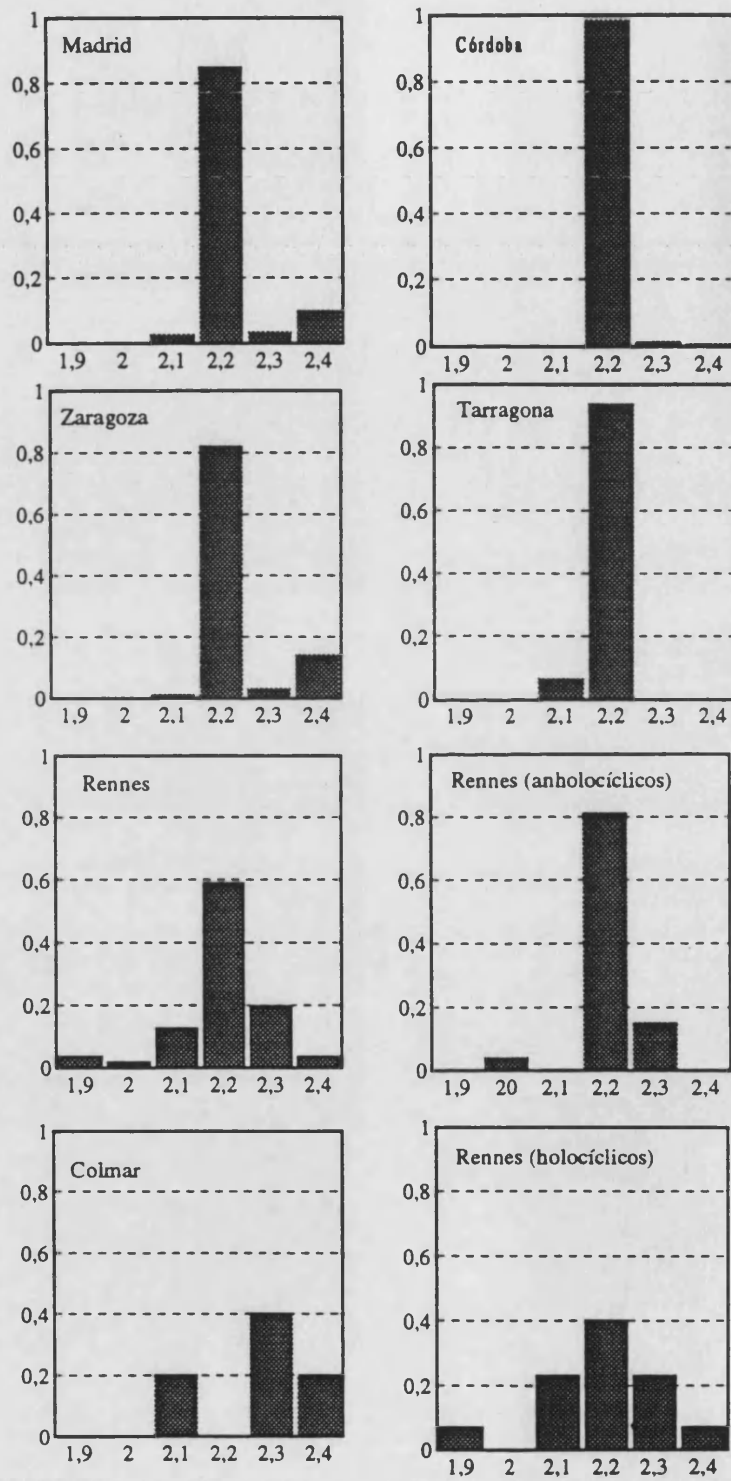


Figura16.IV. Distribución variable de los clones de *R.padi* en clases de tamaño para el fragmento variable *TaqI*. No se incluyen las poblaciones con un solo individuo

clase de tamaño de 2.2 Kb mostraba heterogeneidad entre las restantes poblaciones. Cuando además se excluyeron del análisis todos los clones holocíclicos no se encontró heterogeneidad significativa entre ninguna de las clases de tamaño, por lo que como parecía evidente a partir de la representación gráfica de las distribuciones, la distinta distribución de estos clones, sobre todo por lo que se refiere a la clase de 2.2 Kb, era la principal causa de la heterogeneidad encontrada.

En cuanto a los valores de diversidad estos fueron en general menores que los encontrados para el fragmento variable *HindIII* pero de nuevo la mayor diversidad se encontró entre los clones holocíclicos (Tabla 11.IV). Igualmente, la mayor parte de esta diversidad se pudo atribuir a diferencias entre clones dentro de las poblaciones (59.5%) y una pequeña fracción (9%) a diferencias dentro de clones. En este caso, sin embargo, una porción considerable de la diversidad se debió a diferencias entre poblaciones (31%). A este valor tan elevado parecían contribuir, como se deduce del análisis de las distribuciones, tanto la diferente distribución de los clones holocíclicos como el hecho de que los 4 clones de S. Francisco perteneciesen a una misma clase de tamaño no muy frecuente en el resto de poblaciones. De hecho, eliminando estos 4 clones del análisis el valor de C_{pt} se redujo a la mitad situándose en un valor próximo al calculado para el fragmento variable *HindIII*.

IV.3.3. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre las dos zonas variables en tamaño.

La existencia de desequilibrios de ligamiento es considerada como una evidencia de la intervención de procesos selectivos que favorecen combinaciones particulares de alelos en diferentes loci (Smit-McBride et al., 1988). Sin embargo, cuando son detectados es necesario comprobar el papel que en su generación han podido jugar la deriva genética (Hill, 1976), la migración (Ohta, 1982) y el "arrastre" genético (genetic hitchhiking) (Hedrick et al., 1978), antes de atribuirlos a la actuación de procesos de selección epistática.

Con el fin de indagar sobre la posible intervención de procesos selectivos en el fenómeno de la variación en tamaño que pudiesen estar favoreciendo ciertas combinaciones de tamaños en las dos zonas ("loci") variables, llevamos a cabo un análisis de los dos tipos de variación encaminados a la detección de posibles desequilibrios entre los tamaños encontrados para el fragmento *TaqI* y el fragmento *HindIII* respectivamente. Dado que al menos la variación en el fragmento *HindIII* está localizada en una zona no codificante (y probablemente también la observada para el fragmento *TaqI*) no podemos hablar propiamente de loci, y por lo tanto el sentido que puede tener la identificación de algún proceso selectivo habría que buscarlo probablemente en términos de tamaño global de la molécula, contenido en A+T o en la optimización de alguna función reguladora propia de la molécula.

Podría parecer heterodoxo tratar de detectar desequilibrios en una molécula en la que no se da un proceso fundamental para poder afirmar que los desequilibrios encontrados puedan

tener un papel selectivo, como es la recombinación (Clayton, 1982; Brown, 1985; Moritz et al., 1987). Sin embargo, la aparente alta frecuencia con que el mecanismo generador de variantes de tamaño está actuando, unido a los procesos de segregación de variantes podría ser un mecanismo alternativo de ruptura de desequilibrios de alguna forma equivalente a los procesos de recombinación.

El desequilibrio total entre todos los "alelos" presentes en las dos zonas variables se puede expresar como:

$$D^2 = \sum \sum D_{ij}^2$$

Donde k y l son el número de alelos (en este caso variantes de tamaño) en las dos zonas variables y D_{ij} se define como:

$$D_{ij} = x_{ij} - p_i p_j$$

siendo x_{ij} la frecuencia observada de la combinación de las variantes i y j , y $p_i p_j$ (el producto de las frecuencias observadas para las variantes i y j) la frecuencia esperada de dicha combinación bajo la hipótesis de independencia entre ellas

Otra medida de desequilibrio (Hedrick and Thomson, 1986) es la siguiente:

$$Q' = Q/2N(k-1)(l-1)$$

siendo N el tamaño de la muestra y

$$Q = 2N \sum \sum D_{ij}^2 / p_i p_j$$

Este valor Q se distribuye aproximadamente como una X^2 bajo la hipótesis nula de que $D_{ij} = 0$, con $(k-1)(l-1)$ grados de libertad.

En nuestro estudio utilizamos este estadístico para comprobar la existencia de desequilibrios de ligamiento (Tabla 12.IV y Tabla 13.IV).

Se analizaron por separado las diferentes poblaciones con suficiente número de individuos, así como los datos globales. La población de Rennes fué además analizada descomponiéndola en dos grupos: uno compuesto por los clones holocíclicos y el otro por los clones anholocíclicos.

En ningún caso se encontraron evidencias significativas de desequilibrio lo que sugiere una dinámica independiente entre ambas regiones variables.

Tabla 12.IV. Tamaño en kilobases observado para cada una de las dos regiones variables en tamaño en todos los clones de *R. padi* analizados. El tamaño observado para cada clon se da como frecuencia dado que existen clones heteroplásmicos. En el análisis de ligamiento los clones heteroplásmicos se clasificaron como pertenecientes a la clase más frecuente en dichos clones y aquellos en que las diferentes clases presentes son igualmente frecuentes se clasificaron dentro de aquella que era más frecuente en el resto de clones.

| clon | Tamaño del fragmento variable <i>Hind</i> III | | | | | | | | Tamaño del fragmento variable <i>Taq</i> I | | | | | |
|------|---|------|------|------|------|------|-----|-----|--|-----|------|------|------|------|
| | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | 2.6 | 2.8 | 1.9 | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 |
| M1 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| M2 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M3 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M4 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M5 | | | | | 1 | | | | | | 0.10 | 0.90 | | |
| M6 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M7 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| M8 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| M9 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| M10 | | | | 0.25 | 0.75 | | | | | | | 1 | | |
| M11 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M12 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M13 | | | | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| M14 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M15 | | | | | 1 | | | | | | 0.10 | 0.90 | | |
| M16 | | | | 0.50 | 0.50 | | | | | | | 0.70 | 0.30 | |
| M17 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M18 | | | 0.15 | | 0.85 | | | | | | | 1 | | |
| M19 | | | | 0.15 | 0.85 | | | | | | | 1 | | |
| M20 | | | | 0.60 | 0.40 | | | | | | | 1 | | |
| M21 | | | | 1 | | | | | | | | 0.60 | | 0.40 |
| M22 | | | | 1 | | | | | | | | | | |
| M23 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M24 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M25 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M26 | | | | | 1 | | | | | | 0.25 | 0.75 | | |
| M27 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M28 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| M29 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| M30 | | | | | 1 | | | | | | 0.15 | 0.85 | | |
| C1 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| C2 | | | | | 0.10 | 0.90 | | | | | | | | |
| C3 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| C4 | | 0.10 | | 0.45 | 0.45 | | | | | | | 1 | | |
| C5 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| C6 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| C7 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| C8 | | 0.15 | | | 0.85 | | | | | | | 1 | | |
| C9 | | | | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| C10 | 0.20 | | | | 0.80 | | | | | | | 1 | | |
| C11 | | | | | 0.45 | 0.55 | | | | | | 1 | | |
| C12 | | | | | 0.30 | 0.70 | | | | | | 1 | | |
| C13 | 0.20 | | | | 0.80 | | | | | | | 1 | | |
| C14 | | | | | 1 | | | | | | | 0.90 | | 0.10 |
| C15 | | | | | 1 | | | | | | | 0.70 | 0.30 | |
| C16 | | | | 0.90 | 0.10 | | | | | | | 1 | | |
| C17 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| C18 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| C19 | | | | 0.85 | 0.15 | | | | | | | 1 | | |
| C20 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |

| clon | Tamaño del fragmento variable <i>Hind</i> III | | | | | | | | Tamaño del fragmento variable <i>Taq</i> I | | | | | |
|------|---|-----|------|------|------|------|-----|-----|--|-----|------|------|------|------|
| | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | 2.6 | 2.8 | 1.9 | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 |
| C21 | | | | | | 1 | | | | | | 1 | | |
| C22 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| C23 | | | | | 0.25 | 0.75 | | | | | | 1 | | |
| C24 | | | | 0.90 | 0.10 | | | | | | | 1 | | |
| C25 | | | | | 0.45 | 0.55 | | | | | | 1 | | |
| Z1 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| Z2 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| Z3 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z4 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z5 | | | | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| Z6 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z7 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| Z8 | | | | | 0.45 | 0.55 | | | | | | | | 1 |
| Z9 | | | | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| Z10 | | | | | 1 | | | | | | | 0.85 | 0.15 | |
| Z11 | | | | 1 | | | | | | | | | | |
| Z12 | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | |
| Z13 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z14 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z15 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z16 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z17 | | | | | | 1 | | | | | | | | |
| Z18 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z19 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z20 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z21 | | | | 0.55 | | 0.45 | | | | | 0.40 | | | 0.60 |
| Z22 | | | 0.15 | | 0.85 | | | | | | | | | 1 |
| Z23 | | | | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| Z24 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z25 | | | 0.50 | | 0.50 | | | | | | | 1 | | |
| Z26 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z27 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z28 | | | | 0.40 | 0.60 | | | | | | | 1 | | |
| Z29 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z30 | | | | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| Z31 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| Z32 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| Z33 | | | | 0.45 | 0.55 | | | | | | | 1 | | |
| Z34 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z35 | | | 0.10 | | 0.90 | | | | | | | 1 | | |
| Z36 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z37 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z38 | | | 0.70 | | 0.30 | | | | | | | 1 | | |
| Z39 | | | | | 0.85 | 0.15 | | | | | | 1 | | |
| Z40 | | | | 0.80 | 0.10 | 0.10 | | | | | | 0.15 | | 0.85 |
| Z41 | | | | | 1 | | | | | | | | 1 | |
| Z42 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| Z43 | | | | 0.55 | 0.45 | | | | | | | 1 | | |
| Z44 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| Z45 | | | 0.85 | 0.15 | | | | | | | | 1 | | |
| T1 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| T2 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| T3 | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | |
| T4 | | | | | 0.60 | 0.40 | | | | | | 1 | | |
| T5 | | | | | 1 | | | | | | 0.25 | 0.75 | | |
| R1 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |

| clon | Tamaño del fragmento variable <i>Hind</i> III | | | | | | | Tamaño del fragmento variable <i>Taq</i> I | | | | | | |
|------|---|-----|------|------|------|------|------|--|-----|------|------|------|------|------|
| | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | 2.6 | 2.8 | 1.9 | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 |
| R2 | | | | | | 1 | | | | | | 1 | | |
| R3 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| R4 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| R5 | | | | | 1 | | | | | 0.50 | | 0.50 | | |
| R6 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| R7 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| R8 | | | | | 1 | | | | | | | | 1 | |
| R9 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| R10 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| R11 | | | | 0.60 | 0.40 | | | | | | | 1 | | |
| R12 | | | | 0.55 | 0.45 | | | | | | | | 1 | |
| R13 | | | | 1 | | | | | | | 1 | | | |
| R14 | | | | 0.45 | 0.55 | | | | | | 0.50 | | 0.50 | |
| R15 | | | | | 1 | | | | | | | | 1 | |
| R16 | | | 1 | | | | | | | | 1 | | | |
| R17 | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | |
| R18 | | | 1 | | | | | | | | | | | 1 |
| R19 | | | | 0.55 | | 0.45 | | | | | | | 1 | |
| R20 | | | 0.85 | | | 0.15 | | | | | | | 1 | |
| R21 | | | | 0.20 | | 0.10 | 0.70 | | | | | 1 | | |
| R22 | | | | | 0.20 | 0.80 | | | | | | 1 | | |
| R23 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| R24 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| R25 | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | |
| R26 | | | | | | 1 | | | 1 | | | | | |
| R27 | | | | | | 1 | | | | | | 1 | | |
| R28 | | | | | | | | 1 | | | | 1 | | |
| R29 | | | | 1 | | | | | | | 1 | | | |
| CO1 | | | | | | 1 | | | | | | | 1 | |
| CO2 | | | 1 | | | | | | | | | | 1 | |
| CO3 | | | 1 | | | | | | | | | | | 1 |
| CO4 | | | | | 1 | | | | | | 1 | | | |
| CO5 | | | | | | 1 | | | | | | 1 | | |
| B1 | | | | | | 1 | | | | | 1 | | | |
| B2 | | | | 1 | | | | | | | | | | 1 |
| SF1 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| SF2 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| SF3 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| SF4 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| LE1 | 1 | | | | | | | | | | | 1 | | |
| SW | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| LP | | | | | 1 | | | | | | | 0.40 | | 0.60 |

Tabla 13.IV. Desequilibrios de ligamiento entre las dos zonas variables en tamaño. Se indican los valores de Q' y Q así como los grados de libertad observados para cada una de las poblaciones analizadas en que se observó más de un tamaño en cada una de las zonas variables, y para los datos globales. (Anhol.), clones anholocíclicos; (Hol.), clones holocíclicos.

| Población | Q' | Q | g.l. |
|-----------------|--------|---------|------|
| Madrid | 0.0119 | 0.2964 | 1 |
| Córdoba | - | - | - |
| Zaragoza | 0.0332 | 7.7768 | 6 |
| Tarragona | - | - | - |
| Rennes | 0.0390 | 21.8647 | 20 |
| Rennes (Anhol.) | 0.0864 | 2.2455 | 2 |
| Rennes (Hol.) | 0.0683 | 20.5000 | 20 |
| Colmar | 0.3333 | 6.6667 | 4 |
| S. Francisco | - | - | - |
| Global | 0.0067 | 21.5140 | 24 |

IV.4. ANALISIS DEL POLIMORFISMO DE RESTRICCIÓN DEL MTDNA EN POBLACIONES NATURALES DE *R. PADI*.

Como ya se indicó en la introducción, las peculiares características del mtDNA lo convierten en un excelente marcador para el estudio de estructuración poblacional y de posibles patrones de variación geográfica intraespecífica (Harrison, 1989). En particular, es un marcador apropiado para el estudio de la historia evolutiva reciente (sucesos de colonización, introducciones y cuellos de botella) de poblaciones y especies (Moritz et al., 1987). La metodología basada en el uso de enzimas de restricción ha sido (y todavía lo es) una forma ampliamente utilizada de llevar a cabo los estudios de variabilidad del mtDNA tanto a nivel poblacional como en estudios filogenéticos de especies próximas. Los resultados obtenidos con esta metodología serán tanto más definitivos cuanto mejor sea el muestreo de la molécula, o lo que es lo mismo, cuanto mayor sea el número de sitios de restricción analizados y más homogénea sea su ubicación en la molécula (Lynch and Crease, 1990).

En el presente trabajo hemos analizado el polimorfismo de restricción existente en el mtDNA de 148 clones del áfido *R. padi* muestreados en diferentes poblaciones (Tabla 1.II). Ciertamente es que algunas poblaciones están escasamente representadas, pero ello tiene una justificación basada fundamentalmente en un proceso histórico. En un principio, este trabajo estaba planteado sobre un espacio geográfico limitado. Se trataba de estudiar la posible estructuración de las poblaciones españolas y su dinámica. Aunque sea adelantar resultados, ante la total ausencia de variabilidad de sitios de restricción decidimos incorporar al trabajo muestras de poblaciones claramente separadas por barreras geográficas de las poblaciones españolas. Así, en cuanto tuvimos ocasión tratamos de conseguir clones del continente americano. Más tarde se incluyeron clones de otras poblaciones europeas (francesas principalmente). Ello justifica que el muestreo de estas poblaciones no fuese todo lo sistemático que hubiese sido de desear.

En la Tabla 14.IV se indican los enzimas de restricción utilizados junto con la secuencia diana que reconocen, así como su utilidad en el descubrimiento de polimorfismos en el mtDNA de *R. padi* y el número de sitios de restricción reconocido por cada uno de ellos.

Mediante diferentes combinaciones de dobles y simples digestiones se obtuvieron los mapas de posiciones relativas de la mayoría de los sitios de restricción reconocidos por las distintas endonucleasas utilizadas (Figura 17.IV). Además, y dado que el número de especies de insectos cuyo mtDNA ha sido caracterizado es muy limitado, procedimos a la clonación de algunos de los fragmentos de restricción con el fin último de tener toda la molécula clonada para futuras caracterizaciones moleculares. Algunos de estos fragmentos fueron secuenciados completamente (ver apartado IV.3.1.2) y otros sólo muy parcialmente. Estos datos de secuencias parciales de la molécula acompañados de las oportunas hibridaciones con fragmentos clonados o amplificados por PCR conteniendo genes concretos del mtDNA de *Drosophila subobscura*, permitieron reconstruir un posible mapa génico asumiendo que el

tamaño de los genes era aproximadamente el mismo que en *Drosophila* (Figura 19.IV). En general se observó que el orden génico parecía ser el mismo que en *Drosophila*, aunque en el caso de *R. padi* existe una zona variable en tamaño, probablemente no codificante, entre los genes ND4 y ND5 no descrita en *Drosophila* ni en *Apis*. Por supuesto esta conclusión solamente es aplicable a los genes que codifican para proteínas, a los dos ribosómicos y a los 4 tRNAs cuya secuencia total o parcial fué determinada. Las posibles reordenaciones que se hubiesen podido dar entre los restantes tRNAs con respecto a la disposición descrita para *Drosophila* sólo se podrá determinar tras una secuenciación completa de la molécula.

Los patrones de restricción obtenidos con los diferentes enzimas se denominaron como A, B, etc..., reservando la denominación A para el patrón encontrado cronológicamente en primer lugar para cada enzima, B para el segundo, y así sucesivamente.

De los 16 enzimas de restricción utilizados, 7 revelaron algún tipo de polimorfismo entre los 148 clones analizados. Esto se traducía en 10 sitios de restricción polimórficos de un total de 74 analizados. De la combinación de los patrones de restricción obtenidos con los 16 enzimas se obtuvieron los patrones complejos o haplotipos (denominados con números romanos) que caracterizaban a cada clon (Tabla 14.IV). Se encontraron un total de 4 haplotipos que fueron conectados en un árbol mediante el método de máxima parsimonia, de tal modo que el número total de pasos mutacionales requeridos para conectar los 4 haplotipos fuese el menor (Figura 18.IV). Este polimorfismo se resumió en una matriz de presencia-ausencia de sitios de restricción en la que cada haplotipo se caracteriza por la presencia (1) o la ausencia (0) de un conjunto de sitios de restricción (Tabla 15.IV). Con los datos de esta matriz se estimó mediante el método de Nei (1987) la divergencia nucleotídica (d) entre los distintos haplotipos (Tabla 16.IV).

Antes de presentar de forma global los resultados obtenidos para las diferentes poblaciones, creemos conveniente describir de forma resumida los pasos que secuencialmente se siguieron en el análisis de este tipo de variabilidad y que motivaron la inclusión en el trabajo de clones procedentes de localidades geográficamente muy separadas.

Hacia finales del año 1991 habíamos analizado aproximadamente un total de 90 clones procedentes de las 4 localidades de muestreo españolas. Hasta ese momento la única variabilidad detectada afectaba al tamaño de la molécula y que ya se ha descrito anteriormente. Todos los clones analizados presentaban invariablemente los mismos patrones ("A" por tanto) con todos los enzimas de restricción utilizados constituyendo, por tanto, un único haplotipo (Haplotipo I). Ante esta uniformidad nos planteamos la necesidad de obtener muestras procedentes de zonas geográficamente muy alejadas o con algún tipo de barrera geográfica para tratar de averiguar el nivel de polimorfismo de la especie. Si clones procedentes de zonas geográficas muy alejadas poseían el mismo haplotipo, podríamos estar ante una especie que hubiese sufrido una reciente expansión a partir de una población con bajos niveles de polimorfismo, y consecuentemente no tendría sentido continuar en la búsqueda de variabilidad

en poblaciones ubicadas en una zona geográficamente tan limitada como era la inicialmente planteada (España). Conseguimos 4 clones de *R. padi* procedentes de la ciudad californiana de S. Francisco e inmediatamente fueron analizados. Los 4 clones mostraron patrones de restricción idénticos entre sí con todos los enzimas, pero por primera vez obtuvimos cierta variabilidad con respecto a los clones previamente analizados. Siete de los enzimas utilizados producían un patrón distinto en estos clones a los patrones encontrados hasta el momento en las poblaciones españolas. A estos nuevos patrones se los denominó "B" (Figura 19.IV, Tabla 14.IV) y conjuntamente constituyeron un nuevo haplotipo (Haplotipo II). Dado el número relativamente elevado de cambios mutacionales que separaban los dos haplotipos encontrados hasta el momento (Figura 20.IV) se abría la posibilidad de encontrar nuevos haplotipos intermedios entre ellos. Así decidimos proseguir nuestro estudio muestreando todavía unos pocos clones adicionales en España y tratando de conseguir nuevos clones de diferente origen geográfico.

En los dos muestreos siguientes realizados en la población de Zaragoza se consiguieron establecer un total de 12 clones, de los cuales 10 fueron caracterizados como Haplotipo I al igual que el resto de clones españoles muestreados, pero dos de ellos (los clones Z38 y Z43 de la Tabla 1.II, pertenecientes cada uno a un periodo de muestreo distinto) resultaron ser Haplotipo II. La idea de una posible contaminación de estos clones con pulgones pertenecientes a los clones de S. Francisco fue descartada ante la no coincidencia en el tiempo de ambos en el laboratorio. Además la existencia de los polimorfismos de tamaño descritos en el apartado anterior mostraban que efectivamente se trataba de clones distintos, tanto entre sí como respecto a los americanos.

En Junio de 1992 el Dr. J. C. Simon del centro de investigaciones que el INRA tiene en Rennes (Francia) nos proporcionó 5 clones muestreados en la zona de Rennes (Francia), otros 5 clones de la zona de Colmar (Francia) geográficamente separada de la anterior por unos 700 Km, y dos clones de la localidad de Bristol (Inglaterra). Once de estos clones resultaron idénticos entre sí en cuanto a sus patrones de restricción, siendo clasificados inequívocamente como Haplotipo II. Uno de los clones de Bristol mostró el mismo patrón que los restantes 11 clones con todos los enzimas excepto con uno (*DdeI*) constituyendo así un nuevo patrón para este enzima (patrón C en la Figura 19.IV) y por tanto un nuevo haplotipo (Haplotipo III, Figura 20.IV). Claramente este haplotipo está muy próximo al Haplotipo II ya que sólo los separa un único cambio en un sitio de restricción. Aunque de diferente procedencia geográfica, estos 12 clones tenían algo en común: todos ellos habían sido caracterizados por el Dr. J. C. Simon como holocíclicos mediante el oportuno test biológico (Dixon and Glenn, 1971; Simon et al., 1988).

Ante estos resultados y dado que el carácter anholocíclico de las poblaciones españolas había sido asumido desde un principio en base a los datos existentes en la literatura, nos planteamos la hipótesis de que si en las poblaciones francesas existían clones anholocíclicos, su

mtDNA debería ser más similar al de los clones analizados en las poblaciones españolas (Haplotipo I) que al de los clones holocíclicos de esas mismas poblaciones. Esta idea le fué planteada al Dr. J. C. Simon, quien amablemente nos proporcionó 10 clones adicionales de Rennes caracterizados como holocíclicos y 14 de la misma localidad caracterizados como anholocíclicos (Tabla 1.II). El análisis de estos clones reveló lo esperado bajo la hipótesis planteada: todos los clones holocíclicos demostraron ser idénticos entre sí y fueron caracterizados como Haplotipo II, mientras que todos los anholocíclicos fueron invariablemente clasificados como Haplotipo I.

También conseguimos clones aislados de La Plata (Argentina), Stillwater (Oklahoma) y Lexington (Kentucky). Tras el análisis se comprobó que los dos primeros se podían clasificar como Haplotipo I y Haplotipo II respectivamente, mientras el tercero demostró constituir un nuevo haplotipo (Haplotipo IV) al diferenciarse del Haplotipo II por la pérdida de un único sitio de restricción *HinfI* (Figuras 19.IV y 20.IV, Tablas 14.IV y 15.IV). En la Tabla 18.IV se sumarian estos resultados, y en la Figura 21.IV se ilustra la variabilidad detectada con algunos de los enzimas de restricción.

Recientemente recibimos una muestra de 20 huevos de *R. padi* recolectados en Suecia. Estos huevos eclosionaron, y de las 20 fundatrices obtenidas pudimos obtener suficiente mtDNA de tres de ellas como para ser analizadas con un único enzima de restricción. El enzima elegido fué *EcoRV* que discrimina bien entre Haplotipo I y Haplotipo II. El resultado fué que las tres hembras fueron patrón B para este enzima y por tanto las situa (Tabla 15.IV) dentro del Haplotipo II o dentro de algún otro haplotipo derivado de él. Aunque anecdótico, este resultado estaría en concordancia con el resto de datos, ya que las tres fundatrices analizadas pertenecen obviamente a clones holocíclicos.

Estos datos apuntaban a la existencia de dos tipos básicos de moléculas de mtDNA en *R. padi*. Un tipo (Haplotipo I) estaría asociado a los clones anholocíclicos y el otro (Haplotipo II y derivados) asociado a los clones holocíclicos.

Para comprobar que esto era así y dado que habíamos asumido que los clones españoles eran anholocíclicos, decidimos caracterizar el ciclo biológico de algunos clones. En el análisis se incluyó el clon Z43 que era uno de los dos clones españoles que pertenecían al Haplotipo II (el otro clon español con este haplotipo no se había conservado). También se incluyeron 3 clones de Estados Unidos (SF2, SF4, y ST) que habían sido caracterizados como Haplotipo II. Por último, en el análisis se incluyeron cuatro clones españoles con Haplotipo I (M21, M27, Z44 y Z45). Cinco de estos 8 clones fueron analizados por el Dr. J. C. Simon en su laboratorio, y los otros tres fueron analizados en nuestro laboratorio. Los resultados fueron que todos ellos resultaron tener un ciclo de vida incompleto ya que no generaron ginóparas (necesarias para la obtención de hembras sexuales), pero no podían ser considerados estrictamente anholocíclicos, ya que todos ellos generaron machos en mayor o menor proporción, y habían de ser clasificados consecuentemente como androcíclicos. Este resultado

revelaba dos aspectos importantes: por un lado era posible que la asunción de que los clones españoles eran todos anholocíclicos no era cierta, y por otro que clones con Haplotipo II no necesariamente habrían de ser holocíclicos (Tabla 18.IV).

Tabla 14.IV. Enzimas de restricción utilizados en el análisis de variabilidad de *R. Padi*. Se indican las secuencias de reconocimiento para cada endonucleasa así como el número de sitios de corte detectados para cada uno de los patrones observados (entre paréntesis). También se indican los haplotipos observados como resultado de las combinaciones de los distintos patrones. (a), datos correspondientes al mtDNA; (b), datos correspondientes a la molécula circular coextraída con el mtDNA.

| Enzima de restricción | Secuencia diana | Nº de sitios (a) (patrón) | Haplotipo (a) | | | | Nº de sitios (b) (patrón) | Haplotipo (b) | |
|-----------------------|-----------------|------------------------------|---------------|----|-----|----|------------------------------|---------------|-----|
| | | | I | II | III | IV | | pI | pII |
| <i>AccI</i> | CTGCA/G | 2 (A), 1 (B) | A | B | B | B | 3 (A) | A | A |
| <i>BclI</i> | T/GATCA | 4 (A) | A | A | A | A | 2 (A) | A | A |
| <i>ClaI</i> | AT/CGAT | - | | | | | 3 (A) | A | A |
| <i>DdeI</i> | C/TNAG | 10 (A), 9 (B), 10 (C) | A | B | C | B | 4 (A), 4(B) | A | B |
| <i>EcoRI</i> | G/AATTC | 3 (A), 2 (B) | A | B | B | B | 1 (A) | A | A |
| <i>EcoRV</i> | GAT/ATC | 3 (A), 4 (B) | A | B | B | B | 2 (A) | A | A |
| <i>HaeIII</i> | GG/CC | 1 (A) | A | A | A | A | 1 (A), 2 (B) | A | B |
| <i>HindIII</i> | A/AGCTT | 4 (A) | A | A | A | A | 5 (A) | A | A |
| <i>HinI</i> | G/ANTC | 11 (A), 10 (B), 11 (C) | A | B | B | C | 8 (A), 9 (B) | A | B |
| <i>HpaI</i> | GTT/AAC | 1 (A) | A | A | A | A | 2 (A) | A | A |
| <i>HpaII</i> | C/CGG | 2 (A) | A | A | A | A | 3 (A), 4 (B) | A | B |
| <i>PstI</i> | CTGCA/G | 2 (A) | A | A | A | A | 2 (A) | A | A |
| <i>RsaI</i> | GT/AC | 4 (A) | A | A | A | A | 3 (A) | A | A |
| <i>SauIII</i> | /GATC | 9 (A) | A | A | A | A | 6 (A), 5 (B) | A | B |
| <i>SfuI</i> | TT/CGAA | 1 (A), 0 (B) | A | B | B | B | - | | |
| <i>TaqI</i> | T/CGA | 14 (A), 13 (B) | A | B | B | B | 6 (A) | A | A |
| <i>XbaI</i> | T/CTAGA | 1 (A) | A | A | A | A | 4 (A) | A | A |

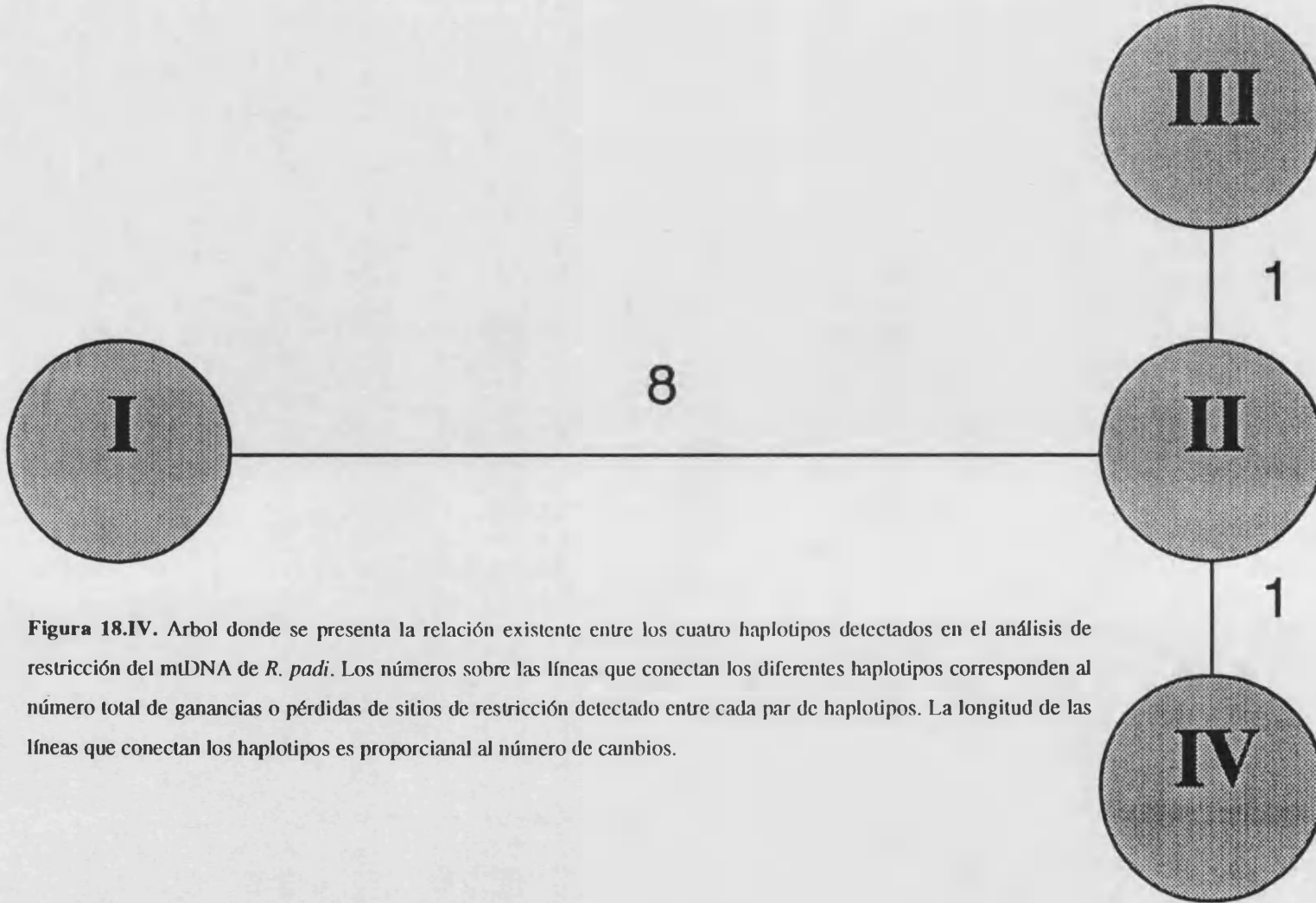


Figura 18.IV. Arbol donde se presenta la relación existente entre los cuatro haplotipos detectados en el análisis de restricción del mtDNA de *R. padi*. Los números sobre las líneas que conectan los diferentes haplotipos corresponden al número total de ganancias o pérdidas de sitios de restricción detectado entre cada par de haplotipos. La longitud de las líneas que conectan los haplotipos es proporcional al número de cambios.

Figura 17.IV. Posiciones relativas deducidas para los sitios de corte producidos por diferentes enzimas de restricción en el mtDNA de *R.padi* y tamaño en kilobases de los fragmentos generados. La localización de los sitios indicados con trazo discontinuo no se ha podido determinar de forma inequívoca. La molécula se representa linearizada en el sitio *XbaI*. En la parte inferior se observa el orden génico de ésta molécula en *R.padi* deducido mediante la combinación de datos de secuencia e hibridación. Los rectángulos blancos sobre el mapa génico indican los fragmentos que han sido clonados y las flechas sobre ellos muestran la longitud y posición de las secuencias obtenidas. La separación entre genes limitada con trazo continuo indica que han sido determinados mediante la secuencia. Los límites con trazo discontinuo se han deducido considerando que el tamaño de los genes es el mismo que en *Drosophila yakuba*. La zona variable en tamaño no caracterizada molecularmente se representa con un signo de interrogación. Los rectángulos grises de la parte inferior corresponden a los fragmentos del mtDNA de *Drosophila subobscura*, de contenido génico conocido, que se han utilizado en las hibridaciones .

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|
| <i>AccI</i> | 13.6 | | | | | | | | | | 2.8 | | A | | | | |
| | 16.4 | | | | | | | | | | | | | B | | | |
| <i>BclI</i> | 9.4 | | | | | | | | | | 1.4 | | 5.2 | | 0.4 | | A |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>DdeI</i> | 4.1 | | | | 1.0 | 1.6 | 0.6 | 1.3 | 0.7 | 1.8 | | 1.7 | | 0.8 | | A | |
| | | | | | 2.6 | | | | | | | | | | B | | |
| | 2.6 | | | | | | | | | | | | 1.5 | | C | | |
| <i>EcoRI</i> | 10.3 | | | | | | | | | | 5.0 | | 1.1 | | A | | |
| | 11.4 | | | | | | | | | | | | | | | B | |
| <i>EcoRV</i> | 12.3 | | | | 2.8 | | 1.3 | | | | | | | | A | | |
| | 6.4 | | | | | | | | 5.9 | | | | | | | B | |
| <i>HaeIII</i> | 16.4 | | | | | | | | | | | | | | A | | |
| <i>HindIII</i> | 13.4 | | | | | | | | | | | | 2.4 | | 0.4 | | A |
| <i>HinfI</i> | 3.4 | | 3.6 | | 0.4 | 0.8 | 0.6 | 0.5 | 0.7 | 0.7 | 0.5 | 3.8 | | 1.0 | | A | |
| | | | | | 1.2 | | | | | | | | | | B | | |
| | 1.3 | | 2.3 | | | | | | | | | | | | C | | |
| <i>HpaI</i> | 16.4 | | | | | | | | | | | | | | A | | |
| <i>HpaII</i> | 11.5 | | | | | | | | | | 4.9 | | | | A | | |
| <i>PstI</i> | 12.4 | | | | | | | | | | 4.0 | | | | A | | |
| <i>RsaI</i> | 11.6 | | | | | | | | | | 3.3 | | 1.3 | | A | | |
| <i>Sau3AI</i> | 5.8 | | 1.9 | | 0.9 | 0.7 | 0.4 | 3.5 | | 1.0 | 0.5 | 0.6 | 0.6 | A | | | |
| <i>SfuI</i> | 16.4 | | | | | | | | | | | | | | A | | |
| <i>TaqI</i> | 1.8 | 2.2 | 1.3 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.4 | 0.7 | 1.2 | | 4.2 | | 0.5 | 1.5 | A | | |
| | | | | | | | | | | | | | 1.3 | | | B | |
| <i>XbaI</i> | 16.4 | | | | | | | | | | | | | | A | | |

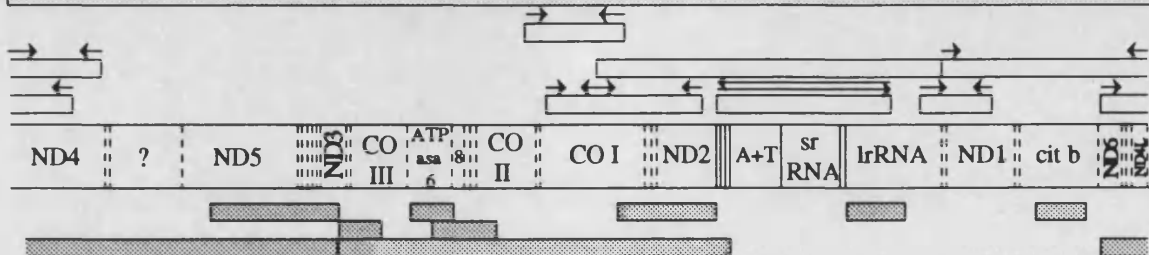


Tabla 15.IV. Matriz de presencia (1) / ausencia (0) de sitios de restricción en los cuatro haplotipos mitocondriales detectados en el presente trabajo para *R. padi*. Para cada enzima se han numerado arbitrariamente los sitios de restricción. Dado el excaso número de sitios variables, su identificación en el mapa es inmediata.

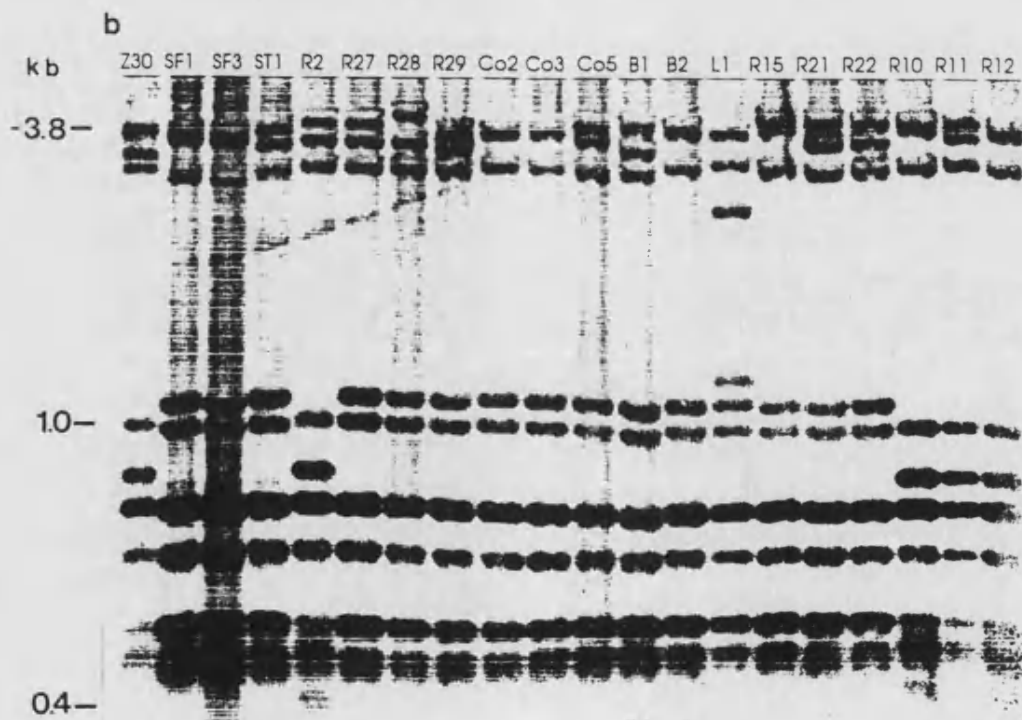
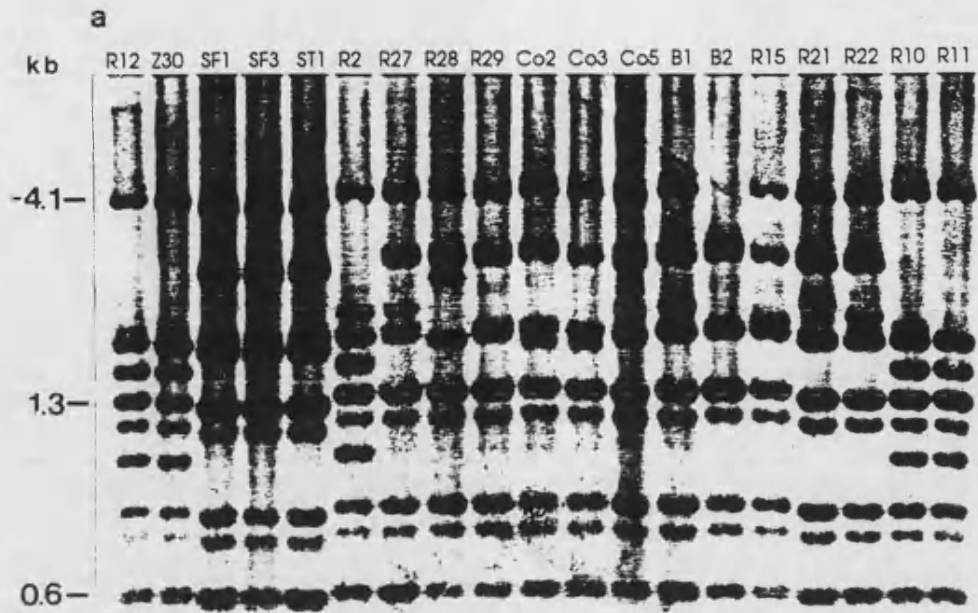
| | <i>XbaI</i> | <i>SfuI</i> | <i>HpaI</i> | <i>PstI</i> | <i>AccI</i> | <i>EcoRI</i> | <i>EcoRV</i> | <i>BclI</i> |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| n° sitios | 1 | 1 | 1 | 1 2 | 1 2 | 1 2 3 | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 |
| Haplotipo I | 1 | 1 | 1 | 1 1 | 1 1 | 1 1 1 | 1 1 1 0 | 1 1 1 1 |
| Haplotipo II | 1 | 0 | 1 | 1 1 | 1 0 | 1 1 0 | 1 1 1 1 | 1 1 1 1 |
| Haplotipo III | 1 | 0 | 1 | 1 1 | 1 0 | 1 1 0 | 1 1 1 1 | 1 1 1 1 |
| Haplotipo IV | 1 | 0 | 1 | 1 1 | 1 0 | 1 1 0 | 1 1 1 1 | 1 1 1 1 |

| | <i>HindIII</i> | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> | <i>TaqI</i> |
|---------------|----------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| n° sitios | 1 2 3 4 | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 |
| Haplotipo I | 1 1 1 1 | 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 |
| Haplotipo II | 1 1 1 1 | 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 |
| Haplotipo III | 1 1 1 1 | 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 |
| Haplotipo IV | 1 1 1 1 | 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 |

| | <i>SauIII</i> | <i>HpaII</i> | <i>HaeIII</i> | <i>RsaI</i> |
|---------------|---------------------|--------------|---------------|-------------|
| n° sitios | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 | 1 2 | 1 | 1 2 3 |
| Haplotipo I | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 | 1 | 1 1 1 |
| Haplotipo II | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 | 1 | 1 1 1 |
| Haplotipo III | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 | 1 | 1 1 1 |
| Haplotipo IV | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 | 1 | 1 1 1 |

Tabla 16. IV. Número de sustituciones nucleotídicas por sitio (δ) (sobre la diagonal) y fracción de sitios compartidos (debajo de la diagonal) entre los 4 haplotipos detectados para el mtDNA en las poblaciones de *R. padi* analizadas, de acuerdo con el método de Nei (1987).

| Haplotipo | I | II | III | IV |
|-----------|--------|--------|--------|--------|
| I | - | 0.0131 | 0.0147 | 0.0147 |
| II | 0.9420 | - | 0.0016 | 0.0016 |
| III | 0.9353 | 0.9926 | - | 0.0033 |
| IV | 0.9353 | 0.9926 | 0.9853 | - |



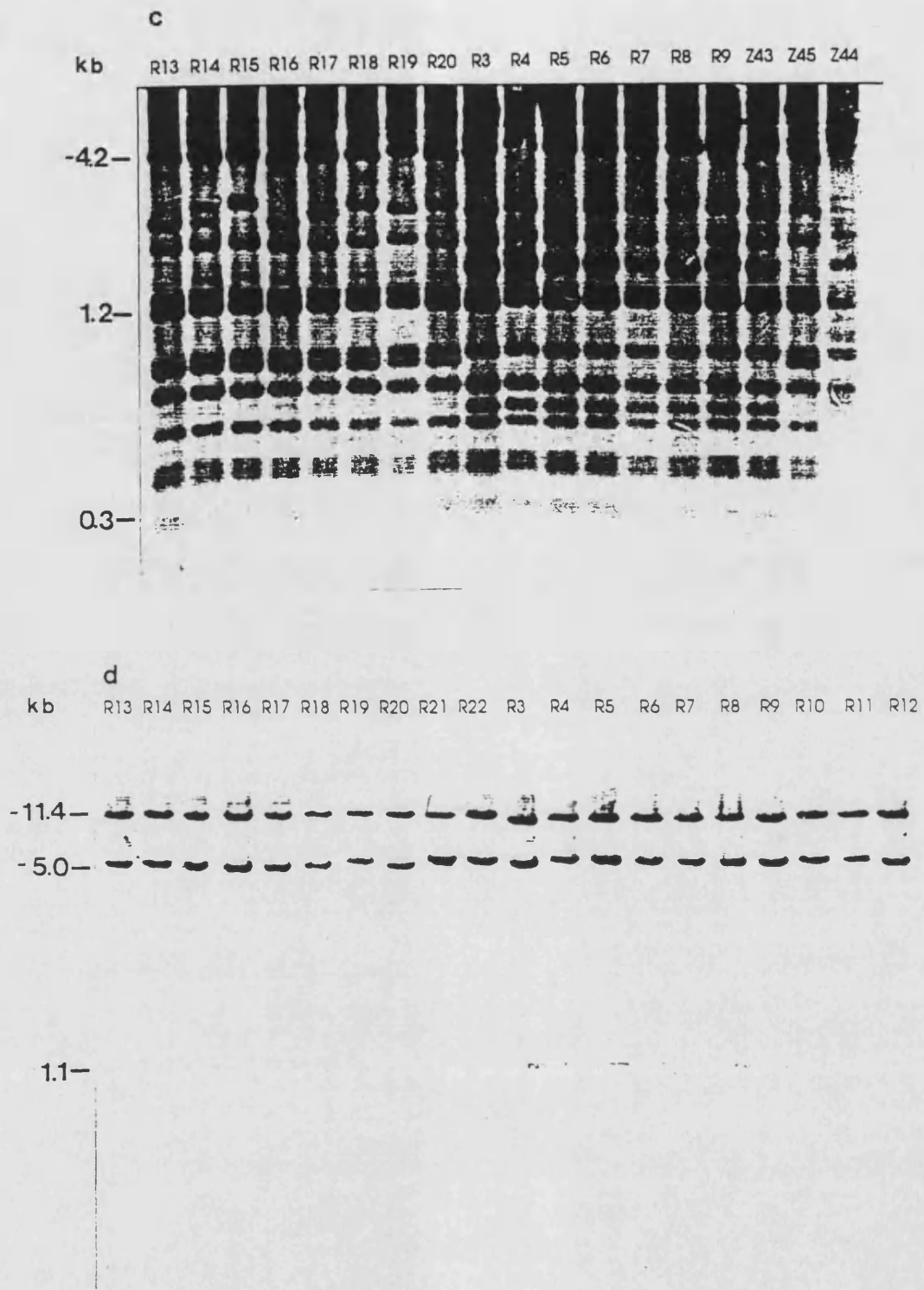
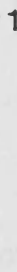


Figura 21.IV. Ejemplos del polimorfismo de restricción observado en el presente trabajo para el mtDNA de *R. padi* con los enzimas *DdeI* (a), *HinfI* (b), *TaqI* (c) y *EcoRI* (d). Cada carrera corresponde al clon de *R. padi* señalado. A la izquierda se indican como referencia los tamaños en kilobases de algunos de los fragmentos. La hibridación se efectuó con la sonda *XbaIRp*. El símbolo  indica que el fragmento en cuestión es variable en tamaño.

IV.5. ANALISIS DEL POLOMORFISMO DE RESTRICCIÓN DE UNA MOLECULA CIRCULAR QUE SE TRANSMITE VIA MATERNA.

La caracterización molecular de los fragmentos "extra" que eran coextraídos junto con el mtDNA, llevada a cabo por A. M. Bracho en nuestro laboratorio reveló que formaban parte de una molécula circular de 8kb que pertenecía a las bacterias endosimbióticas de *R. padi*. Dado que el patrón de restricción de esta molécula se obtenía simultáneamente con el correspondiente al del mtDNA realizamos el análisis de restricción correspondiente a esta molécula con los mismos enzimas de restricción utilizados en el análisis del mtDNA. Además se incluyó el enzima de restricción *ClaI* que aunque no reconocía ninguna diana en el mtDNA sí producía cortes en esta nueva molécula. Las posiciones relativas de los sitios de restricción detectados se representa en la Figura 20.IV. Para detectar el mayor número de fragmentos tras la digestión con enzimas que producían un número elevado de cortes en esta molécula, se realizaron las oportunas hibridaciones de los geles con una sonda que contenía la mayor parte de esta molécula (el fragmento *EcoRI-EcoRI* de 7.4 kb). Los patrones de restricción obtenidos se denominaron siguiendo la metodología ya descrita para el mtDNA y del mismo modo se elaboraron los patrones compuestos o haplotipos. Se encontraron dos únicos haplotipos que se denominaron pI y pII. La distribución de estos dos haplotipos fué muy similar a la de los haplotipos mitocondriales. Todos los clones de *R. padi* con Haplotipo I para el mtDNA resultaron tener un Haplotipo pI para esta nueva molécula, mientras que el resto de clones (con Haplotipos II, III y IV para el mtDNA) fueron caracterizados como Haplotipo pII (Tabla 18.IV). A partir de la matriz de presencia- ausencia de sitios de restricción (Tabla 17.IV) se estimó el número de sustituciones nucleotídicas por sitio (Nei and Jin, 1989) entre los Haplotipos pI y pII. El valor estimado fué de 0.0114 que como se puede comprobar en la Tabla 16.IV es plenamente coincidente con el estimado para el mtDNA entre los Haplotipos I y II. En este caso no se observó ningún haplotipo adicional. En la Figura 21.IV se ilustra la variación encontrada con algunos enzimas de restricción para esta molécula.

Tabla 17.IV. Matriz de presencia (1) / ausencia (0) de sitios de restricción en los dos haplotipos detectados para la molécula circular de origen endosimbiónico de *R. padi*. Para cada enzima de restricción se han numerado los sitios de corte de forma arbitraria. Para los enzimas indicados (*) sólo se consideran los sitios de restricción que limitan los fragmentos de mayor tamaño en la Figura 20.IV ya que no se realizaron de forma sistemática las hibridaciones necesarias para la detección de todos los fragmentos.

| | <i>Xba</i> I | <i>Hpa</i> I | <i>Pst</i> I (*) | <i>Acc</i> I | <i>Eco</i> RI (*) | <i>Eco</i> RV | <i>Hind</i> III | <i>Cla</i> I | <i>Bcl</i> II |
|---------------|--------------|--------------|------------------|--------------|-------------------|---------------|-----------------|--------------|---------------|
| n° sitios | 1 2 3 4 | 1 2 | 1 2 | 1 2 3 4 | 1 | 1 2 | 1 2 3 4 5 | 1 2 3 | 1 2 |
| Haplotipo pI | 1 1 1 1 | 1 1 | 1 1 | 1 1 1 1 | 1 | 1 1 | 1 1 1 1 1 | 1 1 1 | 1 1 |
| Haplotipo pII | 1 1 1 1 | 1 1 | 1 1 | 1 1 1 1 | 1 | 1 1 | 1 1 1 1 1 | 1 1 1 | 1 1 |

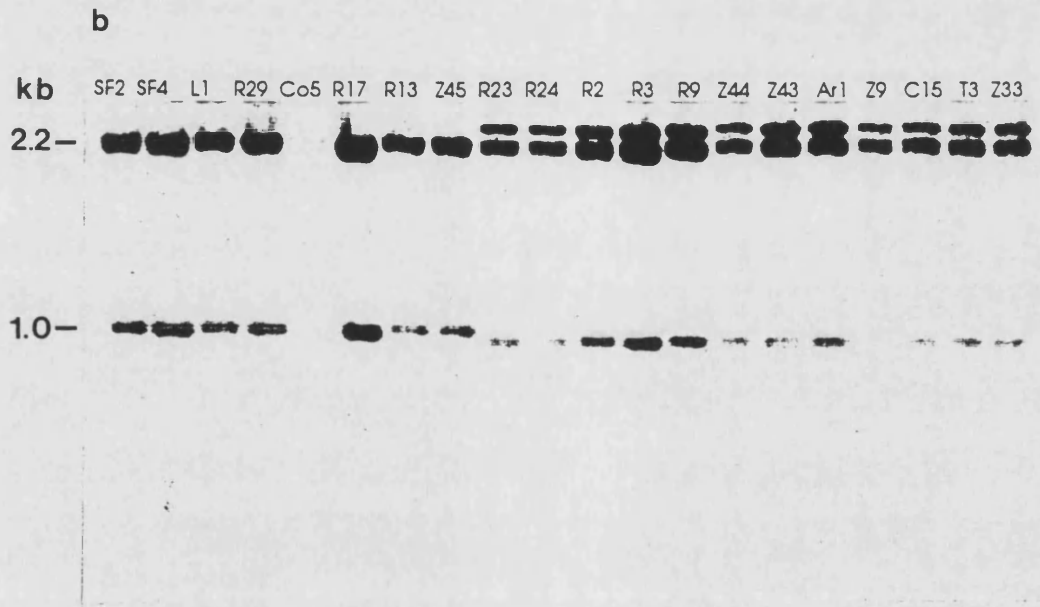
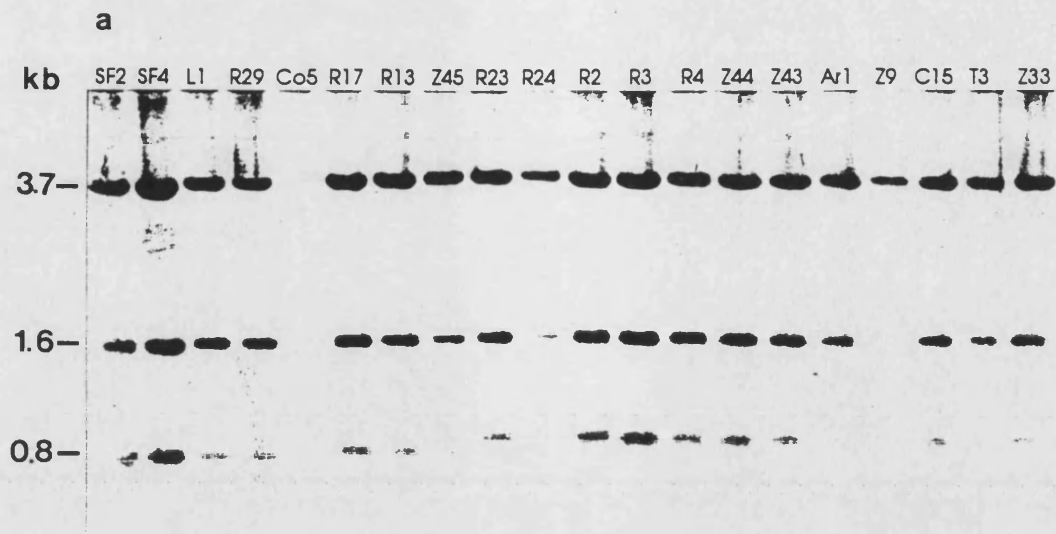
| | <i>Hae</i> III | <i>Dde</i> I | <i>Hpa</i> II | <i>Rsa</i> I (*) | <i>Sau</i> III A | <i>Hin</i> FI |
|---------------|----------------|--------------|---------------|------------------|------------------|-------------------|
| n° sitios | 1 2 | 1 2 3 4 5 | 1 2 3 4 5 | 1 2 3 | 1 2 3 4 5 6 7 8 | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 |
| Haplotipo pI | 1 0 | 0 1 1 1 1 | 1 1 1 0 1 | 1 1 1 | 1 1 1 1 1 1 1 1 | 1 1 1 1 1 1 1 1 0 |
| Haplotipo pII | 1 1 | 1 1 1 1 0 | 1 1 1 1 1 | 1 1 1 | 1 1 1 1 1 0 1 1 | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 |

Tabla 18.IV. Haplotipos observados para el mtDNA (a) y para la molécula circular de origen endosimbiónico (b) en los diferentes clones de *R. Padi* en relación al tipo de ciclo de vida caracterizado o supuesto (?).

| Localidad | Clones | Ciclo biológico | Haplotipo (a) | Haplotipo (b) |
|--------------|------------------|-------------------|---------------|---------------|
| Zaragoza | Z1-Z37, Z39-Z42 | Anholocéflico (?) | I | pI |
| | Z38 | Androcéflico (?) | II | pII |
| | Z43, Z44 | Androcéflico | I | pI |
| | Z45 | Androcéflico | II | pII |
| Córdoba | C1-C25 | Anholocéflico (?) | I | pI |
| Madrid | M1-M30 | Anholocéflico (?) | I | pI |
| Tarragona | T1-T5 | Anholocéflico (?) | I | pI |
| Colmar | Co1-Co5 | Holocéflico | II | pII |
| Rennes | R1-R12, R23-R24 | Anholocéflico | I | pI |
| | R13-R22, R26-R30 | Holocéflico | II | pII |
| Bristol | B1 | Holocéflico | II | pII |
| | B2 | Holocéflico | III | pII |
| S. Francisco | SF1, SF3 | Androcéflico | II | pII |
| | SF2, SF4 | Androcéflico (?) | II | pII |
| Stillwater | ST1 | Androcéflico | II | pII |
| Lexington | L1 | (?) | IV | pII |
| La Plata | Ar1 | (?) | I | pI |

| | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|
| <i>AccI</i> | | 1.4 | | 2.0 | | 2.2 | | 2.2 | | A | |
| <i>BclI</i> | 4.2 | | | 4.2 | | | | | | A | |
| <i>DdeI</i> | | 2.2 | | 2.3 | | 0.8 | | 2.5 | | A | |
| | | | | | | 1.0 | | 2.3 | | B | |
| <i>EcoRI</i> | | | 0.3 | 7.5 | | | | | | | A |
| <i>EcoRV</i> | 3.6 | | | 4.2 | | | | | | | A |
| <i>HaeIII</i> | 7.8 | | | | | | | | | | A |
| | 3.9 | | | | | | 3.9 | | | | B |
| <i>HindIII</i> | 0.7 | 3.5 | | | 1.5 | | 1.6 | | 0.5 | A | |
| <i>HinPI</i> | 2.4 | 0.4 | 0.9 | 0.8 | 1.1 | 0.4 | 1.2 | 0.6 | | A | |
| | 2.2 | | | | | | | | 0.4 | B | |
| <i>HpaI</i> | 4.8 | | | | | | 3.0 | | | A | |
| <i>HpaII</i> | 1.7 | 0.8 | 1.6 | | 3.7 | | | | | A | |
| | | 0.7 | | | | | | | | | |
| <i>PstI</i> | 3.5 | | | 3.5 | | | | 0.3 | 0.5 | A | |
| <i>RsaI</i> | 1.9 | 0.3 | 0.6 | 1.7 | | 2.2 | | 0.5 | 0.6 | A | |
| <i>Sau3AI</i> | 2.3 | | 0.7 | 0.4 | 0.6 | 1.0 | 0.4 | 1.1 | 1.2 | A | |
| | 3.4 | | | | | | | | | | B |
| <i>XbaI</i> | 0.9 | 3.6 | | | 1.1 | | 2.2 | | | A | |

Figura 22.IV. Posiciones relativas de los sitios de corte producidos por los diferentes enzimas de restricción en la molécula circular de origen endosimbótico de *R. padi*. Los sitios de restricción indicados con trazo discontinuo no han podido ser localizados de forma inequívoca.



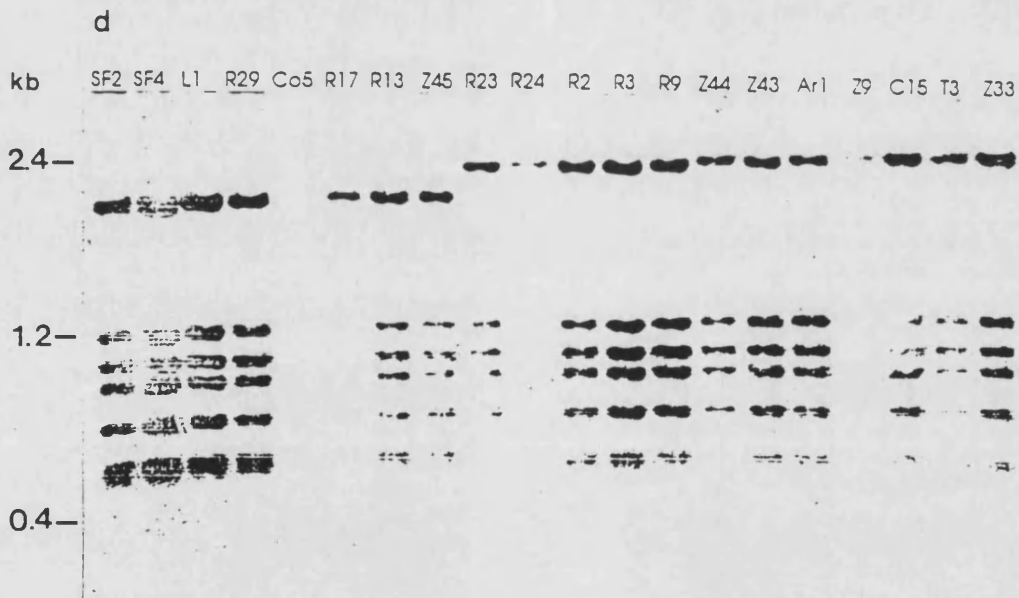
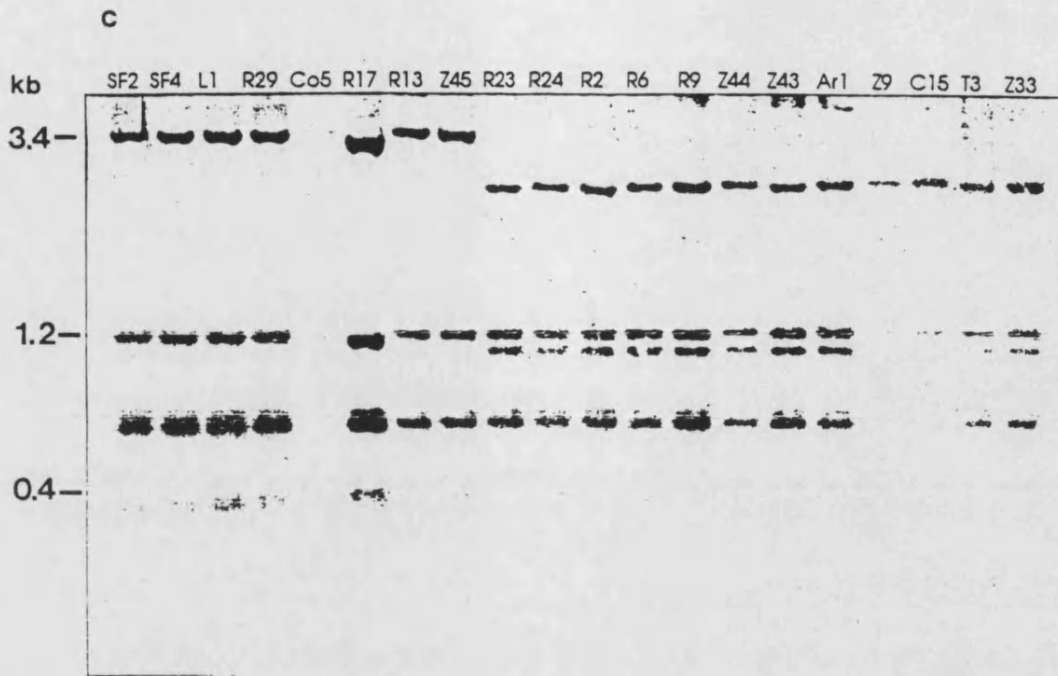


Figura 23.IV. Ejemplos de polimorfismos de restricción detectados para la molécula circular de origen endosimbótico de *R. padi* con los enzimas de restricción *Hpa*II (a), *Dde*I (b), *Sau*3AI (c) y *Hinf*I (d). A la izquierda se indica como referencia el tamaño en kilobases de algunos de los fragmentos observados. Cada carrera corresponde al clon de *R. padi* que se señala. La hibridación se efectuó con el fragmento clonado en el plásmido recombinante p7.4E (Bracho *et al.*, enviado) que contiene la práctica totalidad de la molécula.

V DISCUSION

Dada la relativa heterogeneidad de los estudios realizados en el presente trabajo, con análisis básicamente moleculares de una región concreta del mtDNA de *R. padi* por un lado, y por otro lado con un estudio poblacional de la variabilidad, que se ha basado en la utilización de diferentes técnicas y de diferentes marcadores genéticos, realizaremos una discusión de los resultados obtenidos en diferentes bloques, aunque trataremos de dejar clara en la medida de lo posible la íntima relación existente entre diferentes tipos de resultados.

V.1. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA REGION CONTROL. BASES MOLECULARES DE LA VARIACION EN TAMAÑO.

En la última década se ha producido un considerable aumento en el conocimiento de los mecanismos implicados en la replicación y en la transcripción del mtDNA de vertebrados (Clayton, 1991). Se han identificado las secuencias del mtDNA implicadas en estos procesos (Walberg and Clayton, 1981; Chang and Clayton, 1985; Chang et al., 1985; Clayton, 1991), así como los factores codificados en el núcleo e importados a la matriz mitocondrial que interactúan con dichas secuencias (Fisher and Clayton, 1985; Fisher et al., 1987; Schinkel and Tabak, 1989). Contrariamente, los genomas mitocondriales de invertebrados permanecen por el momento poco estudiados en relación a los de vertebrados. En el caso particular de insectos, el estudio de las secuencias de las regiones control del mtDNA de unas pocas especies de *Drosophila* (Clary and Wolstenholme, 1985; 1987; Monnerot et al., 1990; Monforte et al., 1993) ha sido el único intento de caracterización de estos procesos en estos organismos, y las conclusiones derivadas de dichos estudios se han utilizado siempre como única referencia en las sucesivas revisiones que sobre el tema han aparecido en la literatura (Clayton, 1991; Wolstenholme, 1992). Sólo muy recientemente se ha publicado la secuencia completa del mtDNA de *Apis mellifera* (Crozier and Crozier, 1993) pero los autores no hacen especial énfasis en las características de la región control de esta especie. En otro reciente trabajo sobre la región control de varias especies de lepidópteros (Taylor et al., 1993) si que se discute o al menos se comparan las secuencias y posibles estructuras secundarias que esta región puede adoptar con las publicadas para *Drosophila*, realizando un intento serio de búsqueda de pautas que se puedan considerar generales de esta región en insectos. Así mismo estos autores, conscientes de la utilidad que en el establecimiento de estas pautas puede tener la caracterización de la región control de diferentes taxones de insectos con diferente separación filogenética, realizan un llamamiento en este sentido.

En este trabajo se presenta por primera vez la secuencia completa de la región control del mtDNA de un áfido (Homoptera) así como algunas características y elementos que pueden ser de interés para ulteriores estudios comparativos de diferentes insectos y para el diseño de otro tipo de experiencias encaminadas a la elucidación de los mecanismos que operan en los procesos de replicación y transcripción mitocondriales en insectos.

En primer lugar es destacable el hecho de que la ubicación de la región control en el áfido *R. padi* sea la misma que en *Drosophila* estando limitada por un lado por el mismo cluster de tRNAs y por el otro por el srRNA. La presencia del gen del srRNA limitando uno de los extremos de la región control es un hecho general para las regiones control de insectos cuya secuencia total o parcial es conocida (Clary and Wolstenholme, 1987; Rand and Harrison, 1989; Crozier and Crozier, 1993; Taylor et al., 1993). Sin embargo el cluster de tRNAs que limita el otro extremo de la región es diferente en los tres órdenes de insectos en los que esta zona ha sido secuenciada en algún representante. Así mientras en *Drosophila* (Díptera) existe un cluster formado por tRNA^{met}, tRNA^{gln} y tRNA^{ile} en este orden, en *A. mellifera* el cluster es tRNA^{ile}, tRNA^{ala}, tRNA^{gln}, tRNA^{met}, tRNA^{ser} y tRNA^{glu}, y en las especies secuenciadas de lepidópteros solo se sabe que el tRNA que limita la región control es el de la metionina. Esta diferente disposición de estos tRNAs en diferentes organismos está de acuerdo con las observación (Wolstenholme, 1992) de que los reordenamientos en los que están implicados genes para diferentes tRNAs son más frecuentes que los que implican a genes que codifican proteínas o a genes de los rRNAs. De hecho, cada filum parece poseer una diferente disposición de los tRNAs en la molécula, e incluso dentro de cada filum se dan pequeñas reordenaciones (Desjardins and Morais, 1990; 1991; Jacobs et al., 1988; Cantatore et al., 1989; Asakawa et al., 1991; Dubin et al., 1986). La disposición de los tRNAs que se sitúan en un extremo de la región control de *R. padi* es la misma que la descrita para *Drosophila* y en este sentido su mtDNA estaría más próximo al de este díptero que a los de los otros dos grupos en que se conoce la disposición de estos genes (Himenópteros y Lepidópteros).

El tamaño determinado para la región A+T en *R. padi* oscilaría desde las 634 pb para una región control con una única copia de la unidad de repetición de 113 pb (aunque no se ha encontrado *in vivo*) hasta 1425 pb para aquellas regiones de las que se ha estimado en 8 el número de copias en tandem del elemento de 113 pb. El tamaño de las regiones control de varias especies de *Drosophila* es variable oscilando entre 1 kb en *D. virilis* y *D. yakuba*, hasta 5.1 kb en *D. melanogaster* (Clary and Wolstenholme, 1987; Solignac et al., 1986; Hale and Singh, 1986). En *A. mellifera*, el tamaño de esta región es de 827 pb (Crozier and Crozier, 1993), y en las especies de lepidópteros descritas por Taylor et al. (1993) presenta un tamaño aproximado de 350 pb. Así pues, el tamaño de la región A+T de *R. padi* estaría más próximo a los descritos para *A. mellifera* y para las especies de *Drosophila* con regiones A+T pequeñas que a los descritos para lepidópteros.

El contenido global en adenina-timina de la región A+T de *R. padi* es variable según el número de copias de la unidad de 113 pb que esté presente. *In vivo* la región control más pequeña contiene dos de estas unidades y un contenido global en A+T del 87.8%. Regiones control con más unidades repetidas serían más ricas en A+T dada la mayor riqueza en A+T de la unidad de repetición (93%). El tamaño más frecuentemente encontrado para la región control corresponde a una región control con cinco de estas unidades repetidas, que por tanto tendría un contenido global en A+T del 89.4%. Estos valores son ligeramente inferiores a los de las correspondientes regiones control de *D. yakuba* (92.8%) y *A. mellifera* (96%) (Clary and Wolstenholme, 1985; Crozier and Crozier, 1993).

Por lo que respecta a los intentos de encontrar zonas de secuencia primaria conservadas en las distintas regiones control, cabe hacer notar en primer lugar, que cuando se alinean secuencias pertenecientes a zonas ricas en A+T es de esperar que los porcentajes de identidad observados sean altos aún cuando no sean significativos (Taylor et al., 1993). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de realizar tests estadísticos para comprobar la significación de los alineamientos obtenidos y resta valor a los niveles de identidad observados si no se han realizado los convenientes análisis estadísticos. En los alineamientos efectuados en la presente tesis entre diferentes regiones control o subfragmentos de estas, este condicionante ha sido tenido en cuenta y únicamente se ha considerado que un alineamiento era verosímil si su calidad estaba por encima de la del 99.5% de las calidades de 1000 alineamientos realizados entre las mismas secuencias pero aleatorizando cada vez la secuencia de una de ellas (Manly, 19xx).

Aunque varios de los alineamientos que implicaban a regiones control completas resultaron significativos, solo después de dividir de una forma un tanto arbitraria la región control de *R. padi* en tres zonas, se pudieron interpretar estos alineamientos. Únicamente la zona central produjo alineamientos significativos con prácticamente todas las secuencias comparadas. Por tanto, si realmente existe alguna zona o motivo primario conservado que pueda servir de base para la elaboración de un hipotético modelo general aplicable al mtDNA de insectos, este debe de estar presente en la zona central de la región control de *R. padi* (posiciones 333-564 de la secuencia correspondiente al fragmento *HindIII*). Analizados todos los alineamientos que implicaban a esta zona no se encontraron sin embargo motivos complejos conservados entre las diferentes secuencias. Solo la presencia de varios bloques más o menos largos de series de dímeros de TA parecen justificar la significación de estos alineamientos.

Entre diferentes especies de *Drosophila* pertenecientes a los grupos *obscura* y *melanogaster*, existen en la región control dos zonas conservadas de 49 y =275 pb en las 470 primeras pb contiguas al gen del tRNA^{ile} (Clary and Wolstenholme, 1987; Monnerot et al., 1990; Monforte et al., 1993). La presencia de una a seis unidades de esta secuencia de 470 pb es responsable de la variación en tamaño en cuatro especies del grupo *melanogaster* (Solignac

et al., 1986). También se ha producido una duplicación de esta secuencia en *D. tristis*, perteneciente al grupo *obscura* (Monforte et al., 1993). El resto de la región control es muy variable y es responsable de la mayor parte de la variación en tamaño de la molécula detectada en estas especies.

Los alineamientos entre las zonas conservadas de 275 pb de *D. yakuba* y *D. virilis* y la zona central de la región de *R. padi*, aunque significativos tampoco desvelaron la presencia de motivos complejos conservados. De nuevo fueron las series de TAs las que parecían dar cuenta de la significación de los alineamientos. Estas series son abundantes y bastante largas (hasta 14 dímeros consecutivos) en *R. padi* y en *A. mellifera* así como en los lepidópteros estudiados (hasta 9 dímeros). Aunque menos largas y menos numerosas que en *R. padi* o que en *A. mellifera*, estas series de TAs también están presentes en la zona conservada de *Drosophila*, en las zonas anterior y posterior a una secuencia capaz de formar una estructura del tipo "stem-loop" que se localiza en esta región (Clary and Wolstenholme, 1987; Monforte et al., 1993). Esta estructura secundaria ha sido propuesta por estos autores como un elemento implicado en el proceso de replicación del mtDNA, dado que es en esta zona donde se ha localizado por microscopía electrónica el origen de replicación de la molécula (Goddard and Wolstenholme, 1980) y dada la similitud encontrada con la estructura secundaria donde se localiza el origen de replicación de la cadena L (O_L) del mtDNA de vertebrados (Clayton, 1991). Sin embargo, en las estructuras secundarias descritas por estos autores no se propone la participación de ninguna de estas series de TAs.

Kowalski et al. (1988), proponen la utilización de nucleasas específicas de DNA de hebra sencilla en estudios encaminados a la caracterización de potenciales sitios de inicio de la replicación o la transcripción en moléculas circulares de DNA. Estos autores basan su propuesta en la importancia biológica de la energética del desenrollamiento del DNA ya que el desenrollamiento es un paso previo al inicio de la replicación y la transcripción. Aquellos sitios hipersensibles a la acción de este tipo de endonucleasas identifican las secuencias de la molécula de DNA con la menor energía libre de desenrollamiento. Sitios hipersensibles de este tipo se han detectado en los orígenes de replicación y en las regiones reguladoras de la transcripción tanto en procariontes como en eucariotes (Sheflin and Kowalski, 1984; 1985; Umek and Kowalski, 1987; 1988; Umek et al., 1988). La imposibilidad de identificar de forma precisa estos sitios hipersensibles basándose simplemente en el contenido en A+T (Umer and Kowalski, 1987) o en la temperatura de fusión (Kowalski and Sadford, 1982) hace necesario el uso de este tipo de nucleasas para demostrar la presencia de zonas de desenrollamiento estable en el DNA en contraposición a otros tipos de desenrollamiento transitorios ("DNA breathing") que pudieran existir (Kowalski et al., 1988).

Mediante las experiencias de digestión con la nucleasa S1 de la región control de *R. padi*, se confirmó la existencia en esta región de uno a tres puntos hipersensibles a la acción de esta nucleasa. El mapeo y secuenciación de los sitios hipersensibles demostró una

correspondencia entre la posición de estos sitios y tres de los "loops" predichos como parte de estructuras secundarias potencialmente estables en la región control de *R. padi*. La participación de distintas series de TAs en los "stems" de estas estructuras de desenrollamiento estable sugiere que este tipo de secuencias puedan tener un papel importante en su formación y mantenimiento y justificaría así mismo su participación en los alineamientos significativos encontrados entre regiones control de diferentes especies de insectos. En este mismo sentido, Taylor et al. (1993) proponen para las regiones control de lepidópteros la existencia de varias estructuras secundarias del tipo "stem-loop" con valores de energía significativos, en las que también estarían implicados bloques de series de TAs. Sin embargo, estos autores no demuestran experimentalmente la existencia de estas estructuras. La participación de las series de TAs en el establecimiento de estructuras de desenrollamiento estable en la región control del mtDNA (demostrada experimentalmente en este trabajo y propuesta para lepidópteros por Taylor et al.) no es invocada en ninguno de los trabajos realizados en *Drosophila* (Clary and Wolstenholme, 1987; Monforte et al., 1993). Sin embargo es llamativo que varias de estas series se encuentren casi exclusivamente en las proximidades (=50 pb) de la zona que estos autores proponen como implicada en una estructura estable del mismo tipo que la demostrada para *R. padi* y la propuesta para lepidópteros. Dos explicaciones pueden dar cuenta de la falta de concordancia entre estos estudios. La primera sería una leve imprecisión en el mapeo (serían solo 50 pb las causantes de la diferencia entre sus resultados y un resultado acorde con el nuestro) cometida por estos autores. Una segunda explicación sería la no necesaria intervención de las series de TAs como parte de las estructuras secundarias estables aquí discutidas, sino que su participación pudiese actuar también a distancia, al propiciar ciertas conformaciones en el DNA que favoreciesen la formación de este tipo de estructuras en sus proximidades. En este sentido es de reseñar la propuesta de Hamada et al. (1982) de que series de Purina-Pirimidina del tipo (dC-dG)_n, (dT-dG)_n, (dC-dA)_n o (dT-dA)_n son buenas candidatas para adoptar una conformación Z. No sabemos si este tipo de conformación puede tener un papel en el origen de las estructuras secundarias aquí discutidas (bién directamente bién a corta distancia), pero en todo caso si así fuese, y si fuese la sucesión de dímeros Purina-Pirimidina la causante, en un DNA como el mitocondrial de insectos en que parece existir una presión favorable al enriquecimiento en A+T, las series de dímeros TA (o AT) estarían altamente favorecidos. Con esto queremos decir que la significación de los alineamientos entre diferentes regiones control en los que intervienen series de TAs no han de ser considerados necesariamente como verdaderas homologías, sino que pueden responder a constricciones estructurales que han desembocado en soluciones similares.

Sea cual sea el papel (si es que tienen alguno) de estas series de TAs en otros insectos, al menos en *R. padi* su participación en estructuras cruciformes estables parece altamente probable. La función precisa de estas estructuras no se puede deducir de forma inmediata, pero dada su semejanza a las estructuras implicadas en el origen de replicación propuestas tanto en

vertebrados como en *Drosophila* no descartamos que sea esta su función. Así mismo, tampoco descartamos una implicación alternativa o simultánea en la iniciación de la transcripción, dada la correspondencia de parte de estas secuencias con la caja canónica TATA propuesta como señal de iniciación de la transcripción tanto en eucariotas como en procariotas (Lewin, 1985).

La existencia de una secuencia palindrómica casi perfecta formada básicamente por Gs y Cs (posiciones 280-298) en el interior de una región tan rica en A+T es cuando menos interesante y la hace buena candidata para ser la responsable de alguna función reguladora. Este tipo de secuencias ricas en G+C han sido propuestas como zonas de alta estabilidad en el interior de regiones ricas en A+T caracterizadas por la relativa baja estabilidad de los duplex de DNA (Cornuet et al., 1991). Estos cambios abruptos de estabilidad pueden tener (como se ha encontrado en *E. coli*) una función en la replicación (Mignotte et al., 1987) como puede ser la transición de la síntesis de RNA a DNA. Su capacidad de autoapareamiento para formar una estructura cruciforme de 8 pb ha sido predicha pero no confirmada mediante digestión con la nucleasa S1. Sin embargo esta falta de evidencias de su intervención en un plegamiento estable en el DNA circular superenrollado no elimina la posibilidad de que pueda formar una estructura estable en el DNA de cadena sencilla cuando este queda expuesto en el proceso de replicación. Conviene recordar aquí que, al menos en *Drosophila*, la replicación del mtDNA es unidireccional y altamente asimétrica, no iniciándose la síntesis de la segunda cadena hasta que la práctica totalidad de la primera ha sido sintetizada (Goddard and Wolstenholme, 1978; 1980; Wolstenholme et al., 1979). Una secuencia muy similar a esta ha sido descrita en el interior de una región de 220 pb repetida en tandem un número variable de veces en *Grillus* en una secuencia que se correspondería con la región control de este ortóptero (Rand and Harrison, 1989). En este caso se propone la participación de esta secuencia en una estructura cruciforme de 7 pb a la que se asigna un posible papel en la estabilización de otras posibles estructuras secundarias en las que intervendría el resto de la secuencia en la que está incluida, contribuyendo al mecanismo generador de variación en tamaño. El hecho de que una secuencia de este tipo no esté presente en la región control de los otros insectos estudiados sugiere que la función que esta pudiera desarrollar ha sido transferida a otro tipo de secuencia. En el caso de *R. padi* sin embargo, esta hipotética función (por ahora desconocida) podría ser la misma que en *Grillus*, aunque descartamos su participación en la variación en tamaño dada la distancia que separa a esta secuencia de la zona de las repeticiones.

Por lo que respecta a la variación en tamaño de la región control de *R. padi*, su secuenciación completa confirmó los datos previos obtenidos mediante análisis de restricción que apuntaban a que este tipo de variación era debida a diferencias en el número de copias de una unidad repetida en tandem de alrededor de 100 pb (concretamente 113 pb).

Las secuencias obtenidas a partir de tres clones de *R. padi* procedentes de distintos orígenes geográficos revelaron una identidad total entre las distintas unidades de repetición, así como entre las unidades de los tres clones de *R. padi*. La identidad entre las repeticiones

dentro de un mismo clon ha de ser entendida en términos de una evolución concertada de las mismas como consecuencia del mecanismo que genera las mutaciones de tamaño. Por su parte, la identidad entre las unidades de repetición pertenecientes a tres regiones control diferentes, así como la casi total identidad entre las tres regiones completas, puede ser explicada invocando unas tasas extremadamente bajas de sustitución nucleotídica, lo cual contrasta con las altas tasas de evolución esperadas para esta región (Cann and Wilson, 1983; Brown, 1985, pp. 95-130). Otra explicación posible sería una rápida homogeneización de las poblaciones provocada por niveles altos de migración acompañados de selección y/o deriva.

Aunque algunos autores han propuesto distintos mecanismos para explicar las variaciones de tamaño del mtDNA en diferentes especies animales (Rand and Harrison, 1989; Buroker et al., 1990; Moritz and Brown, 1987) ninguno de ellos ha sido completamente demostrado. En la mayoría de los casos descritos (Moritz and Brown, 1986; Solignac et al., 1986; Rand and Harrison, 1989; Boyce et al., 1989; Mignotte et al., 1990; Buroker et al., 1990; Wilkinson and Chapman, 1991; Arnason and Rand, 1992) la variación en tamaño se localiza en la región control, o implica a secuencias presuntamente relacionadas (Cornuet et al., 1991), por lo que la mayoría de los mecanismos propuestos implican de una u otra forma al proceso de replicación de la molécula.

Los distintos mecanismos propuestos se pueden agrupar en dos tipos: aquellos que necesitan de la introducción de cortes y ulterior reparación de la molécula de mtDNA y aquellos que no necesitan de estos procesos. Entre los máximos representantes del primer tipo están los mecanismos que implican algún tipo de recombinación intra o intermolecular como los propuestos por Rand y Harrison (1989), así como aquellos mecanismos basados en apareamientos erróneos que no impliquen al proceso de replicación. Sin embargo estos mecanismos no se ven apoyados por las evidencias, al no haberse demostrado la existencia en las mitocondrias de la necesaria capacidad de corte y reparación (Clayton et al., 1974; Lansman and Clayton, 1975). El otro tipo de mecanismos que no necesita de estas capacidades estaría más de acuerdo con el conocimiento actual. Entre estos, tanto el modelo de desplazamiento competitivo propuesto para un esturión (Buroker et al., 1990), como el más genérico de deslizamiento de cadena y apareamiento erróneo entre repeticiones [slipped strand and mispairing, o abreviadamente SSM (Streisinger et al., 1966; Levinson and Gutman, 1987)] en el DNA que se está replicando, explican la variación en tamaño como consecuencia de errores en el apareamiento de las hebras complementarias previos o durante el proceso de replicación. Dado que el primero hace participar al D-loop típico del mtDNA de vertebrados y este tipo de estructura no existe en insectos únicamente el segundo puede ser considerado aquí como pausable. Este mecanismo explica fácilmente pequeñas variaciones de tamaño en tramos de homopolímeros (Hauswirth et al., 1984) o de motivos cortos repetidos en tandem. Así se explicarían las adiciones o deleciones de dímeros en las largas series de TAs descritas en el presente trabajo. Sin embargo, para poder explicar mediante este mecanismo inserciones o

deleciones de más de unos pocos nucleótidos, sería necesaria una suficiente exposición de las hebras sencillas en el proceso de replicación y su estabilización mediante apareamientos internos. Este proceso se vería facilitado si la replicación de una cadena estuviese suficientemente retrasada en el tiempo con respecto a la replicación de su complementaria. Esta asimetría en el proceso de replicación ha sido demostrada en vertebrados (Clayton, 1991) y en *Drosophila* (Goddard and Wolstenholme, 1978). En el caso de *Drosophila* la asimetría del proceso es extrema, no iniciándose la replicación de la segunda cadena hasta que la primera ha sido casi completamente replicada, posibilitando así la formación de estructuras secundarias dentro de las repeticiones en la hebra que queda expuesta (Boyce et al., 1989; Rand and Harrison, 1989).

En varias especies de *Drosophila* se ha encontrado un tipo de variación en tamaño de la región control en el que está implicada una zona conservada de 470 pb que parece contener una secuencia capaz de formar una estructura secundaria estable que además podría contener el origen de replicación de la molécula (Solignac et al., 1986; Monnerot et al., 1990; Monforte et al., 1993).

En el caso de *R. padi* las digestiones efectuadas con la nucleasa S1 sugieren que este tipo de estructuras no se forman en la zona de las repeticiones en el DNA superenrollado de doble cadena. Sin embargo, ello no implica que en otros estados de la molécula no se pudieran formar. De hecho, en los plegamientos predichos por el programa MFOLD, en tres casos se obtuvieron valores de energía libres, para plegamientos de esta zona, fuera del rango obtenido en los plegamientos de secuencias aleatorizadas. Así, si estas estructuras se producen realmente sobre la hebra que ha quedado expuesta tras el "paso" de la maquinaria de replicación, o sobre la hebra que está siendo sintetizada dada la relativa baja estabilidad de los duplex de DNA en esta zona (Cornuet et al., 1991), su formación favorecería los deslizamientos y apareamientos incorrectos entre repeticiones completas típicos del mecanismo SSM (Levinson and Gutman, 1987). El que el motivo de 11 pb con que comienza cada repetición esté presente también al final del tandem de repeticiones, y el hecho de que este motivo sea la única parte de toda la secuencia que permanece en un plásmido recombinante que parece haber perdido todos los elementos repetidos, sugieren su participación en el mecanismo. La generación de plásmidos recombinantes en *E. coli* con diferente número de repeticiones apuntaría así mismo a que es la propia secuencia de esta zona la que favorecería este tipo de sucesos.

Así, un mecanismo simple del tipo SSM propuesto por Levinson y Gutman (1987) podría explicar este tipo de variaciones en insectos. Estos autores sugieren que la probabilidad de que se den apareamientos erróneos que conduzcan, por medio de este mecanismo, a duplicaciones, deleciones u otro tipo de reordenamientos, aumenta a medida que una secuencia se hace más simple y repetitiva. En el caso de *R. padi* las repeticiones y la región en la cual quedan incluidas son extremadamente ricas en A+T lo que hace que estas secuencias sean

realmente simples y repetitivas y se favorezca así la formación de apareamientos erróneos entre secuencias no necesariamente contiguas. En una secuencia de este tipo, la aparición por mutación de un motivo de 11 pb idéntico a otro ya presente en la secuencia pero con 102 pb de separación habría hecho aumentar la probabilidad de un primer deslizamiento y apareamiento incorrecto que condujese a una primera duplicación en tandem de un elemento de 113 pb. A partir de un suceso inicial de este tipo el mecanismo se habría disparado aumentando las posibilidades de apareamientos incorrectos entre diferentes elementos y por tanto facilitando la adición o deleción de unidades de 113 pb. En la Figura 1.V se modeliza un posible mecanismo de este tipo que explicaría la adición o deleción de unidades de 113 pb. Este mecanismo explicaría así mismo la identidad entre las diferentes unidades del tandem, y sería por tanto el responsable último de la posible evolución concertada de las mismas. Alternativamente, la identidad entre repeticiones también podría ser explicada por tasas de sustitución nucleotídica para esta región muy inferiores a las tasas de mutación generadoras de variación de tamaño. Como se discutirá más adelante, nuestros datos basados en el análisis de restricción de varias poblaciones apuntan en este sentido. Este mecanismo también explicaría la existencia de más de un tipo de variante de tamaño para la región en un mismo individuo (fenómeno conocido como heteroplasmia) si se comprobase que las tasas de segregación de variantes de tamaño o de extinción aleatoria de variantes fuese relativamente baja comparada con la tasa de mutación provocada por el mecanismo. La detección de una gran proporción de clones heteroplásmicos en las poblaciones analizadas apoyaría esta idea.

Aunque no tenemos evidencias del mecanismo real que opera en la adición o deleción de unidades de repetición, nuestros datos reúnen todos los elementos para poder inferir un mecanismo del tipo propuesto en tanto en cuanto no existan evidencias de una capacidad de corte y reparación en las mitocondrias que puedan justificar mecanismos alternativos.

V.2. VARIACION EN TAMAÑO DEL MTDNA EN POBLACIONES DE *R. PADI*.

El análisis de restricción del mtDNA de *R. padi* ha revelado la existencia de un considerable polimorfismo para la longitud total de la molécula como consecuencia de la variación en el tamaño de dos regiones diferentes de la molécula. Se han podido identificar las bases moleculares de esta variación en una de estas regiones (región control) resultando plenamente coincidentes con la mayoría de casos descritos de variación en tamaño del mtDNA. La caracterización molecular de la segunda región variable en tamaño queda pendiente para ulteriores investigaciones aunque su probable ubicación entre los genes ND4 y ND5 indican que se trata de un tipo de variación no descrito hasta el momento en otros animales, siendo probablemente característico de áfidos ya que ha sido también encontrado en el áfido *Acirtosiphum pisum* (comunicación personal de J. C. Simon) y probablemente exista igualmente en el áfido *Schizafis graminum* (Martínez-Torres et al., enviado). Otro caso en que se ha detectado variación en tamaño fuera de la región control es *Apis mellifera*, en la que se ha descrito una región variable en tamaño localizada entre los genes COI y COII (Cornuet et al., 1991). Parece pues que a medida que se profundiza en el estudio de esta molécula en diferentes especies animales se va volviendo más laxa la idea inicial de una molécula extremadamente compacta "ejemplo extremo de economía genética" (Attardi, 1985).

El análisis de este tipo de variación en diferentes poblaciones de *R. padi* ha revelado que ambos tipos de polimorfismo de longitud muestran un patrón de variación bastante coincidente lo que sugiere que ambos sean consecuencia de mecanismos moleculares similares y que a nivel poblacional ambos reflejen los mismos procesos constituyendo por tanto una buena herramienta para su estudio.

Aunque la variación encontrada para el fragmento *TaqI* proporciona unos valores de diversidad algo menores que los calculados para la variación en tamaño de la región control, esto quizás sea debido a la peor calidad del análisis para ese fragmento (no se realizaron densitometrados, y la estimación de los tamaños de los fragmentos fué algo menos precisa al utilizar geles con mayor concentración de agarosa que permitieran la detección de fragmentos pequeños). En cualquier caso, en el análisis jerárquico se puede comprobar que la mayor parte de la diversidad es debida a las diferencias existentes entre individuos dentro de las poblaciones (69% en el caso del fragmento *HindIII* correspondiente al polimorfismo de la región control, y 59% en el caso del fragmento *TaqI*). En este último caso parece que la inclusión de los 4 clones de S. Francisco (idénticos para una clase de tamaño poco frecuente) introduce un efecto distorsionador en el análisis. De hecho, si eran excluidos del análisis, se obtenía un valor de C_{ip} más próximo al observado para el fragmento *HindIII* (74%). Una fracción relativamente importante de la variación (entre el 10% y el 17%) se justificaba como debida a diferencias

intraclonales, reflejando el fenómeno de la heteroplasma, ampliamente detectado para el fragmento *Hind*III (25% de clones heteroplásmicos). Junto a esta alta diversidad existente en el seno de las poblaciones los valores de C_{pt} reflejaron una heterogeneidad relativamente baja entre poblaciones que, excluyendo los 4 clones de S. Francisco en el análisis del fragmento *Taq*I, se situaba alrededor del 15%. Este mismo patrón de alta diversidad intrapoblacional se ha encontrado también en el análisis del polimorfismo de longitud del mtDNA de otras especies. Rand y Harrison (1989) encontraron que el 50 % y el 35% de la diversidad total en grillos se debía a diferencias entre individuos y dentro de individuos respectivamente (globalmente el 85% de la diversidad se localizaba en el interior de las poblaciones). Por su parte Arnason y Rand (1992) encontraron un patrón distinto en bacalao siendo en este caso las diferencias intraindividuales las más importantes (80%), aunque conjuntamente con las diferencias entre individuos, el 88% de la variación total residía dentro de las poblaciones y solo un 12% se debía a diferencias entre poblaciones.

La detección de heteroplasma de variantes de mtDNA es un fenómeno casi exclusivamente restringido a la variación en tamaño de la molécula y solamente en unos pocos casos se ha detectado heteroplasma para sitios de restricción (Hale and Singh, 1986). Así mismo, aunque se han descrito numerosos casos de polimorfismo de restricción generadores de diversidad intrapoblacional para el mtDNA, gran parte de esta variación es debida a diferencias entre poblaciones (Awise et al., 1979; Lansman et al., 1983; Awise and Lansman, 1983; Ferris et al., 1983; DeSalle et al., 1986a, 1986b; Solignac et al., 1986; Hale and Singh, 1991; Tamura et al., 1991; Smith et al., 1991; Thorpe et al., 1993).

Los niveles de heteroplasma de tamaño detectados pueden ser explicados (como sugieren Birky et al., 1983) por una alta tasa de mutación generadora de este tipo de polimorfismo relativa al tiempo requerido para eliminar este tipo de diversidad mediante segregación en la línea germinal. Un mecanismo generador de este tipo de mutaciones del tipo propuesto en este trabajo podría justificar tasas mutacionales elevadas. En este sentido, conviene resaltar que a medida que se incrementa el número de repeticiones en tandem mediante mecanismos de "slippage and strand mispairing" (SSM), aumenta la probabilidad de apareamientos incorrectos entre repeticiones y por tanto de sucesivos SSMs. Si los fenómenos de deriva afectan a las variantes para sitios de restricción en el mtDNA en el mismo grado afectarán a las variantes de tamaño, por lo que el hecho de que en general (y como se discutirá más adelante en *R. padi* en particular) el fenómeno de la heteroplasma sea casi privativo de estas últimas sólo puede ser explicado por tasas de mutación superiores para la variación en tamaño relativas a las que existan para sitios de restricción. En el caso extremo se encontraría que la mayor parte de la diversidad se localizaría en el nivel intraindividual (como se observa en el caso del bacalao). La segregación en la línea germinal de las variantes en tamaño generadas en *R. padi* da lugar a individuos con diferentes genotipos (diferentes clones homoplásmicos con diferentes tamaños para los fragmentos variables, o clones heteroplásmicos

con diferentes grados o estados de heteroplasma). A pesar de ello, el balance entre la deriva genética (segregación de variantes) y la teóricamente alta tasa de mutación no resulta en una diferenciación significativa entre las poblaciones estudiadas a juzgar por los valores de C_{pt} encontrados.

En este contexto conviene destacar una importante diferencia existente entre los polimorfismos de sitios de restricción y el tipo de variación en tamaño descrito en este trabajo. La diferencia estriba en que los polimorfismos de sitios de restricción se pueden asimilar a un modelo de infinitos "alelos" (Whittam et al., 1986) en que la probabilidad de que cada nueva mutación genere un nuevo alelo es muy elevada, mientras que en el caso de la variación en tamaño aquí estudiada el número de alelos posibles es ciertamente finito, de tal forma que aun con tasas mutacionales elevadas, las variantes generadas no serán nuevas en el sentido de que ya existirán previamente en la población, o sustituirán a las variantes perdidas por deriva. Si tenemos en cuenta que con una gran probabilidad el mecanismo que está actuando en las distintas poblaciones es el mismo, quedaría explicado, al menos en parte, el hecho de no haber encontrado grandes diferencias entre las poblaciones estudiadas. En un modelo de infinitos alelos con las altas tasas de mutación que parecen deducirse de los numerosos casos de heteroplasma existentes, las poblaciones probablemente tenderían a disponer de diferentes series de alelos, y los valores de C_{pt} serían probablemente más altos a falta de considerar los efectos de la migración.

Birky et al. (1983) proporcionan una ecuación para el valor de equilibrio de K_c en función de la tasa de mutación (m) y el número efectivo de orgánulos (N_{eO}). Esta ecuación es reordenada por Rand y Harrison (1989) (ecuación 6) y bajo la asunción de transmisión materna estricta expresan m en función de K_c y de N_f (número efectivo de hembras en la población). Utilizando el valor medio de K_c estimado para el fragmento *HindIII* en este trabajo y para tamaños poblacionales efectivos de 100, 1000, 10.000 y 100.000, se obtuvieron unos valores de m del orden de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} respectivamente. No conocemos el tamaño efectivo de las poblaciones de *R.padi* pero este no es probablemente muy alto debido a los cuellos de botella a los que anualmente se ven sometidas las poblaciones de esta especie (Loxdale and Brookes, 1988). Si los tamaños poblacionales efectivos estuviesen entre 1000 y 10.000, las tasas de mutación estimadas se situarían entre 10^{-4} y 10^{-5} , valores que según Rand y Harrison (1989) serían lo suficientemente altos como para permitir niveles considerables de heteroplasma y de variación intrapoblacional aunque como consecuencia de actuar sobre un modelo de finitos alelos todavía serían insuficientes para permitir diferenciación poblacional. En cualquier caso, que la frecuencia de este tipo de mutación es superior a la correspondiente para sitios de restricción parece claro en el caso de *R. padi*, si nos atenemos a los reducidos niveles de polimorfismo de sitios de restricción (y ausencia total de heteroplasma) encontrados y que se discutirán más adelante.

Otra forma de interpretar estos resultados no incompatible con lo ya expuesto, sería la invocación de transmisión biparental para explicar los niveles de heteroplasmia (C_j) y la existencia de altas tasas de migración que explicarían la excasa diferenciación interpoblacional. Con respecto a la herencia biparental cabe decir que aunque se ha comprobado su existencia en algunas especies (Kondo et al., 1990; Satta and Chigusa, 1991) no se considera un fenómeno general. Además en el caso de *R. padi* esta hipotética contribución paterna puede descartarse dado que la mayoría de clones estudiados pertenecen probablemente a la categoría de anholocíclicos o androcíclicos y en este tipo de clones todas las hembras son partenogénicas, y aún en el caso de los clones holocíclicos sólo una generación al año se reproduce sexualmente, siendo las restantes generaciones partenogénicas.

Junto a una tasa mutacional relativamente elevada generando un conjunto finito de variantes de tamaño, no descartamos la existencia de altas tasas de migración con un efecto homogeneizador de las poblaciones para explicar los bajos niveles de diferenciación interpoblacional encontrados. En este sentido, Loxdale (1990) propone unos altos niveles de flujo genético en *R. padi* a partir de estudios basados en polimorfismo enzimático (Loxdale and Brookes, 1988). Otro tipo de estudios basados en la detección y la medición de la densidad aérea de *R. padi* a diferentes alturas también sugieren que esto es así. Esta especie es especialmente abundante en Gran Bretaña en trampas situadas a 12.2 metros de altura sobre el suelo en otoño (periodo de migración del huésped primario al secundario) (Worwod et al., 1986). Así mismo también se ha encontrado un número importante de individuos en trampas situadas en barcos que navegaban en el Mar del Norte como mínimo a 160 Km de distancia de la costa (Hardy and Cheng, 1986). La relativa excasez del huésped primario sobre amplias zonas del área de distribución de la especie se apunta como posible causa de esta necesidad de migración de *R. padi* que en el periodo otoñal emprendería el vuelo en su busca. En este sentido, se ha descrito (Tatchell et al., 1988) una densidad aérea en otoño de ginóparas y machos más de 10 veces superior en las trampas colocadas a 12.2 metros de altura que en las situadas a 1.5 metros, sugiriéndose la mayor probabilidad de encontrar el huésped adecuado volando a gran altura (*Prunus padus* puede alcanzar un tamaño de hasta 15 metros) como causa principal de este comportamiento.

Aunque, como ya se ha comentado, el grado de diferenciación entre poblaciones fué excaso (el valor del 30% encontrado para el fragmento *TaqI* se redujo al 15% al eliminar los 4 clones de S. Francisco) el hecho de haber encontrado diferencias significativas entre las distribuciones de algunas poblaciones merece ser discutido. En concreto, en la Figura X se pueden observar dos diferentes tipos de distribución que a grandes rasgos son coincidentes con las que se pueden observar en la Figura X. En el primer tipo, existe una clase de tamaño central altamente frecuente mientras que el resto de clases están en baja frecuencia. Este tipo de distribución se encuentra en todas las poblaciones españolas y en los cuatro clones de S. Francisco, aunque es posible que estos no representen una buena muestra de esta población. El

segundo tipo se caracteriza por una distribución más amplia no existiendo ninguna clase de tamaño excesivamente frecuente. En este tipo se incluirían las poblaciones francesas. La descomposición de la población francesa de Rennes en dos grupos atendiendo a su ciclo biológico acentuó más las diferencias entre ambos tipos de distribución y sugería algún tipo de relación entre el ciclo biológico y el patrón de distribución observado. En este contexto cabe recordar que *R. padi* parece tener un comportamiento exclusivamente anholocíclico en España (Pons et al.,), donde prácticamente no existe el huésped primario. En realidad puede que los clones españoles no sean estrictamente anholocíclicos sino que al menos una parte de ellos podrían ser androciclicos como se demostró al caracterizar el ciclo biológico de cinco de ellos (Dixon et al., 19xx; Simon et al., 1988). En cualquier caso, ambos tipos de clones tienen en común la incapacidad de generar hembras sexuadas, y por tanto las formas reproductivas son siempre partenogénicas. Así, los clones anholocíclicos de Rennes tendrían la misma distribución que las poblaciones españolas (también anholocíclicas), mientras los clones holocíclicos tendrían una distribución diferente similar a la encontrada en Colmar donde los cinco clones muestreados también eran holocíclicos (aunque sería importante analizar una muestra más amplia y representativa de los dos ciclos biológicos en esta población). Queremos hacer constar que esta división en clones holocíclicos y anholocíclicos (que aparentemente a la luz de los resultados pudiera tener algún sentido) se llevó a cabo al considerar que el mtDNA de uno y otro tipo de ciclo biológico en ningún momento podían entrar en contacto y que por tanto podrían reflejar diferentes dinámicas. Esta idea será retomada en el siguiente apartado cuando analicemos el polimorfismo de sitios de restricción. Por el momento trataremos de explicar cómo la diferente distribución de la variación en tamaño puede estar relacionada con diferentes dinámicas poblacionales en ambos tipos de ciclos biológicos.

En primer lugar cabría preguntarse si el hecho de que las distribuciones aparezcan centradas sobre un elevado número de copias puede ser el resultado de alguna ventaja selectiva de aquellos individuos con un alto número de repeticiones en estas zonas variables o por el contrario es una consecuencia del mecanismo que genera esta variabilidad unido a procesos estocásticos que eliminan las variantes extremas. Cabe aquí comprobar que, aunque con muy baja frecuencia tanto para el fragmento *HindIII* como para el fragmento *TaqI*, se han podido detectar clones con tamaños extremos lo cual demuestra que pueden ser generados por el mecanismo generador de esta variación. Es difícil pensar en alguna ventaja selectiva para alguna de las clases de tamaño en particular que no sea, al menos en la zona de la región control, que la ganancia de unidades (dada su mayor riqueza en A+T) contribuya a una desestabilización de esta zona necesaria para el inicio de los procesos de replicación y transcripción. La existencia de desequilibrios de ligamiento entre las dos zonas variables podría haber apoyado, de haber sido detectados, un posible papel selectivo en el mantenimiento de estas distribuciones. El no haber encontrado evidencias de desequilibrios, sin embargo, no excluye la intervención de procesos selectivos pero nos lleva a descartar su actuación conjunta

sobre ambas zonas variables en favor de un tamaño global óptimo o de cualquier otra ventaja selectiva que se pudiera derivar de interacciones epistáticas entre ambas zonas.

Pensamos que de la diferente distribución observada para los clones holocíclicos y anholocíclicos se pueden derivar algunas hipótesis que pueden contribuir a la clarificación de estos aspectos. En este sentido, el hecho de que en las poblaciones o linajes holocíclicos se observe una distribución en clases de tamaño más amplia en la que sólo ligeramente parece despuntar alguna de las clases sugiere un carácter neutral para las variantes. Por el contrario, la existencia de una clase de tamaño altamente frecuente en los linajes anholocíclicos (comparar las distribuciones de los clones anholocíclicos y holocíclicos de Rennes) sugiere la intervención de un cuello de botella reciente con la consiguiente extinción estocástica de linajes o clones anholocíclicos. Si el cuello de botella hubiese sido muy pequeño, deberíamos haber detectado desequilibrios de ligamiento entre las dos zonas variables. El hecho de no haberlos detectado puede indicar que, o bien el cuello de botella no fué tan pequeño, o bien que ha transcurrido suficiente tiempo como para que la actuación conjunta del mecanismo mutacional y la segregación de variantes los haya destruido. Centrándonos en la población de Rennes en la que ambos tipos de clones coexisten aunque no se conocen las proporciones relativas: los clones holocíclicos, aún estando posiblemente sometidos al cuello de botella que supone ir en busca del huésped primario y a los predadores que allí pueda encontrar (Leather et al., 1989) pueden ser considerados como perdurables en tanto en cuanto escapan a las duras condiciones invernales mediante la inclusión en su ciclo biológico de una fase de huevo resistente. Además, aún cuando los cuellos de botella derivados del proceso migratorio a *Prunus padus* fuesen muy severos, es probable que una cierta diversidad fuese restituida anualmente mediante migraciones procedentes del Norte de Europa donde esta especie es exclusivamente holocíclica y el huésped primario muy abundante. Por el contrario, los clones anholocíclicos se ven sometidos con una alta probabilidad a cuellos de botella severos periódicamente cada vez que las condiciones invernales se hacen extremas, siendo posible su práctica eliminación. En este sentido la similar distribución de estos clones a la de las poblaciones españolas muestreadas podría estar indicando un flujo migratorio de los clones anholocíclicos del Norte hacia el Sur, donde las condiciones invernales serían más fáciles de superar, aunque esporádicamente se puedan dar inviernos extremos que de nuevo reduzcan drásticamente los tamaños poblacionales. De esta forma se podría explicar que las clases de tamaño correspondientes a 5 repeticiones para el fragmento *HindIII* y a 2.2 Kb para el fragmento *TaqI*, sean ambas tan frecuentes tanto en las poblaciones españolas como en la única población francesa en que este tipo de clones ha sido analizado. Estaríamos así ante una colonización reciente de las poblaciones españolas por parte de pulgones anholocíclicos procedentes de zonas situadas más al Norte y que a su vez habrían sufrido un reciente cuello de botella. El hecho de que también se detecten otras clases de tamaño en torno a esta clase central podría ser explicado igualmente por procesos migratorios como por el propio mecanismo generador de variación en tamaño

que no dejaría de operar en ningún momento. Aunque efectivamente la argumentación expuesta no deja de ser hipotética no parece descabellado un proceso como el aquí propuesto a la luz de nuestros resultados, y su comprobación no resultaría demasiado difícil (aunque probablemente sí alargada en el tiempo). En este sentido sería muy interesante iniciar un exhaustivo análisis de las poblaciones europeas en que ambos tipos de clones estén presentes (como es el caso de Gran Bretaña, Francia y Alemania), así como de las poblaciones escandinavas, en las que únicamente existen clones holocíclicos. Aunque obviamente los datos son muy insuficientes, es llamativo el hecho de que los dos únicos clones analizados de Bristol (ambos holocíclicos) no posean ninguna de las dos clases mayoritarias en los clones anholocíclicos para los dos fragmentos variables. Igualmente insuficientes son los datos de los muestreos en Estados Unidos, pero podemos destacar que de los seis clones allí capturados sólo uno (el clon de Stillwater) posee simultáneamente las clases de tamaño de 5 repeticiones y 2.4 Kb respectivamente para los dos fragmentos variables. Claramente se necesitan más datos para poder interpretar lo acontecido en el continente americano.

V.3. POLIMORFISMO DE RESTRICCIÓN EN DOS MOLECULAS CIRCULARES QUE SE TRANSMITEN POR VIA MATERNA.

Los resultados del análisis de restricción del mtDNA de *R. padi* revelan unos niveles de polimorfismo claramente inferiores a los encontrados en estudios similares realizados en otros organismos. En particular, en estudios realizados con un número similar de líneas analizadas de *Drosophila subobscura* se encontraron hasta 13 y 24 haplotipos mitocondriales distintos (Latorre et al., 1991 y Afonso et al., 1990, respectivamente). Estos limitados niveles de variabilidad encontrados contrastan con la relativa alta diversidad descrita para la variación en tamaño de la misma molécula, lo cual corrobora la idea ya planteada de que la tasa de mutación generadora de variabilidad de tamaño es comparativamente mucho mayor que la correspondiente tasa de mutación para sitios de restricción. En concreto, ciñéndonos a las poblaciones españolas, básicamente se detecta un único haplotipo de restricción (Haplotipo I) mientras que el análisis de esos mismos clones reveló la existencia de cierta variabilidad en el tamaño de la molécula causada por la variación en longitud de dos regiones diferentes.

Podemos considerar que estos datos son plenamente concordantes con otro tipo de datos basados en polimorfismo enzimático realizados con la misma especie (Loxdale and Brookes, 1988) y que igualmente revelaron niveles de variabilidad muy bajos (2 loci resultaron polimórficos de un total de 14 analizados).

Estudios así mismo basados en polimorfismo enzimático realizados con otras especies de áfidos han revelado, en general, niveles de variabilidad muy bajos (Tomiuk and Wöhrmann,

1983; Brookes and Loxdale, 1987). Ello contrasta con lo encontrado para unas pocas especies como *Sitobion avenae* (Loxdale et al., 1985), en que se han llegado a detectar hasta un 60% de loci polimórficos. Se ha sugerido (Loxdale et al., 1985; Brookes and Loxdale, 1987) que la aparente falta de variabilidad encontrada en muchas especies de áfidos sea debida a sucesivos cuellos de botella poblacionales que han eliminado de forma sistemática los alelos raros surgidos por mutación provocando la fijación de los alelos más comunes. Otra alternativa también contemplada invoca un papel preponderante de los procesos selectivos, sobre todo si existen genotipos altamente "favorables" como pueden ser aquellos que manifiestan resistencia a los insecticidas.

Nuestros resultados sugieren, sin embargo, un análisis más detallado en el que se ha de tener necesariamente en cuenta un rasgo biológico importante como es el ciclo de vida desarrollado por las diferentes poblaciones.

De los cuatro haplotipos detectados en el presente trabajo, tres son prácticamente idénticos (Haplotipos II, III y IV), lo que refleja su divergencia reciente (Tablas IV.2 y IV.3), y probablemente representan un mismo linaje mitocondrial relativamente diversificado. Un total de 30 clones de los 148 analizados pertenecerían a este linaje y su distribución geográfica sería bastante amplia: 20 pertenecen a dos poblaciones francesas geográficamente bastante alejadas entre sí (700 km aproximadamente), 2 son ingleses, 2 pertenecen a una misma localidad española y los restantes 6 clones pertenecen a tres poblaciones norteamericanas con un rango máximo de separación entre ellas de unos 3000 km.

Por otra parte, el Haplotipo I constituiría un linaje distinto menos diversificado, ya que no se ha encontrado ningún otro haplotipo con el que pudiera establecer la misma relación de proximidad evolutiva que la descrita para los Haplotipos II, III y IV, y ello a pesar de que el número de clones analizados que pertenecerían a este linaje es muy elevado (118). A pesar de ello, no parece que el rango de distribución del Haplotipo I sea más limitado que el descrito para los Haplotipos II, III y IV. Clones con Haplotipo I se han encontrado en las cuatro poblaciones españolas (103 clones), están presentes en al menos la localidad francesa de Rennes, y el único clon analizado de la población de La Plata (Argentina) es también Haplotipo I.

El número de sustituciones nucleotídicas por nucleótido estimado entre el Haplotipo I y el II ($d=0.0116$) indica que estos dos haplotipos han divergido desde hace relativamente mucho tiempo. Claramente el tiempo de divergencia entre los Haplotipos II, III y IV es un orden de magnitud inferior. Aunque el tiempo absoluto de separación entre ellos no se puede estimar con nuestros datos dado que desconocemos las tasas absolutas de sustitución nucleotídica en el mtDNA de áfidos podemos hacer una inferencia teniendo en cuenta considerando que estas tasas se sitúen dentro del rango estimado para *Drosophila* (Satta and Chigusa, 1991) entre $1-3 \times 10^{-8}$. Así los Haplotipos I y II habrían divergido desde hace un mínimo de 380.000 años, hasta un

máximo de 1.160.000 años. Los haplotipos del grupo del Haplotipo II habrían estado divergiendo entre sí desde hace unos 56.000 a 170.000 años.

El hecho de que 103 clones españoles, en principio anholocíclicos, posean un mismo haplotipo (Haplotipo I), idéntico a su vez al haplotipo caracterizado para los 14 clones anholocíclicos franceses de Rennes, y que 22 clones holocíclicos pertenecientes a diferentes poblaciones (Rennes, Colmar y Bristol) posean un segundo haplotipo (Haplotipo II) claramente divergente con respecto a aquel, sugiere que efectivamente existan dos linajes mitocondriales que se corresponderían con los dos diferentes ciclos de vida. Los clones anholocíclicos serían portadores del Haplotipo I mientras que los clones holocíclicos serían portadores del Haplotipo II (o haplotipos con el relacionados).

Esta asociación entre haplotipos mitocondriales con los ciclos de vida desarrollados por *R. padi* ha de ser considerada como una consecuencia lógica de las propias características del mtDNA que hacen que sea una molécula especialmente apropiada para el estudio de acontecimientos evolutivos recientes (Moritz et al., 1987; Harrison, 1989) y ha de considerarse que es debida esencialmente a factores históricos (Birky, 1991?? libro).

La holocíclicia puede considerarse como una característica ancestral en áfidos (Moran, 1992), a partir de la cual y mediante procesos diferentes han evolucionado diferentes ciclos de vida en los que de una forma u otra ha desaparecido la capacidad de reproducción sexual. Se han generado así especies, razas, linajes o clones que se reproducen exclusivamente de forma partenogenética. En el caso particular de *R. padi*, una vez acaecida la pérdida irreversible de la capacidad de reproducción sexual en un linaje o clon, que a partir de ese momento pasaría a ser anholocíclico, se produciría su aislamiento reproductivo (Ward, 1991) con respecto al resto de la población que seguiría siendo holocíclica. Se produciría así una dramática interrupción del flujo genético entre el clon anholocíclico iniciado y el resto de la población que evolucionarían independientemente a partir de ese momento. En realidad puede que por lo que se refiere a los genes nucleares la interrupción del flujo genético no sea todo lo definitiva que se pudiera pensar. Ello es debido a que en muchos casos no se pierden totalmente las formas sexuales sino que el clon conserva la capacidad de producir machos (Androcíclicia) que con alguna probabilidad se pueden aparear con las hembras sexuadas del resto de la población que conserva la holocíclicia (Blackman, 1972). Este tipo de clones conservarían por tanto cierto contacto con la parte de la población que conserva la capacidad de reproducción sexual lo que les reportaría las ventajas a corto plazo de la partenogénesis sin las desventajas que a largo

plazo pudieran derivarse de una reproducción exclusivamente partenogenética (Maynard Smith, 198xx). Sin embargo, la interrupción del flujo genético sí que sería particularmente definitiva por lo que respecta al mtDNA en cualquier caso dada su transmisión por vía materna. Los clones anholocíclicos (o androcíclicos) y los clones holocíclicos constituirían realmente dos compartimentos estancos cuyos mtDNAs nunca entrarían en contacto. Por ello ambos tipos de moléculas de mtDNA acumularían cambios de forma totalmente independiente de modo que transcurrido el tiempo suficiente habrían divergido lo bastante como para identificarlas como pertenecientes a uno u otro linaje tal y como parece haber ocurrido en *R. padi*. Esta idea parece bastante plausible a la luz de nuestros resultados, aunque puede ser interesante discutir algunos aspectos en torno a los diferentes ciclos biológicos que *R. padi* puede experimentar para tratar de explicar los casos en que parece existir alguna contradicción con la hipótesis (aquellos casos en que clones con un mtDNA del grupo del Haplotipo II no son Holocíclicos).

En primer lugar, la idea de que las poblaciones españolas de esta especie son anholocíclicas considerada en diferentes estudios (Ferreter et al., 1989;...) estaría bastante relacionada con la casi total ausencia del huésped primario (*P. padus*) en la península Ibérica. Aunque *R. padi* ha sido descrito en España sobre otras especies de *Prunus* como huéspedes alternativos (Nieto et al., ...) no parece que la utilización de este tipo de huéspedes se pueda generalizar. El hecho de que los cinco clones españoles para los que determinamos su ciclo biológico resultasen no ser estrictamente anholocíclicos sino androcíclicos no contradice seriamente esta idea, ya que ambos tipos de clones (androcíclicos y anholocíclicos) comparten la imposibilidad de generar hembras sexuales y por lo tanto se pueden perpetuar indefinidamente de forma partenogenética. En este sentido, no descartamos que la anholociclia estricta sea un estado final derivado, y probablemente minoritario, a partir de una situación de androciclia. Esta idea estaría apoyada por estudios realizados sobre *R. padi* (Simon et al., 1991) en los que la respuesta de los mismos clones sometidos a fotoperiodos cortos (10h) fue distinta según la temperatura fuese de 15°C o de 10°C. De los 55 clones analizados correspondientes a un muestreo realizado sobre gramíneas en la zona de Rennes en 1990, 43 (el 78%) no respondieron a las condiciones de inducción realizadas a 15°C y fueron clasificados consecuentemente como anholocíclicos, mientras que 12 clones (el 22%) se clasificaron como androcíclicos. En la réplica del experimento realizada a 10°C, todos los clones que a 15°C habían sido clasificados como anholocíclicos generaron machos además de

hembras partenogénicas siendo por lo tanto androcíclicos, mientras que de los 12 clasificados como androcíclicos en el experimento anterior 10 siguieron siéndolo pero dos de ellos produjeron además de machos y hembras partenogénicas un cierto número de individuos clasificados como intermorfos (capaces de dar lugar tanto a hembras partenogénicas sobre trigo como a hembras sexuadas sobre *P. padus*), por lo que estos dos clones se clasificaron como de respuesta intermedia. Lo que estos resultados sugieren es que una gran proporción de los clones androcíclicos podrían manifestar en la naturaleza un comportamiento anholocíclico siempre que no se superasen de forma mantenida en el tiempo unos valores umbral en las condiciones ambientales (de temperatura y fotoperiodo fundamentalmente).

Los cuatro tipos de ciclo biológico desarrollados por *R. padi* se han observado también en otros áfidos como *Myzus persicae* (Blackman, 1971; 1972) y *Aphis gossypii* (Takada, 1988).

Blackman (1972) realiza un estudio sobre el modo de herencia de los ciclos de vida desarrollados por *M. persicae* tratando de encontrar un sistema simple de uno o dos genes que explique la variación observada. Así, partiendo de un cruce inicial entre machos pertenecientes a un clon androcíclico y hembras sexuadas de un clon holocíclico, obtiene una generación de clones F_1 que tras la oportuna fase de inducción se clasifican bien en tres categorías o fenotipos distintos: 4 de ellos fueron holocíclicos, 8 androcíclicos y 2 se clasificaron como intermedios. De los diferentes cruces posibles entre individuos de la generación F_1 obtiene distintas segregaciones en la generación F_2 a partir de las cuales trata de inferir el tipo de herencia del carácter "ciclo de vida". Cuando agrupa a los clones de respuesta intermedia, como una modificación de la holocéclia, junto a los clones holocíclicos, las proporciones obtenidas de los diferentes fenotipos se ajustan bastante bien a las esperadas bajo un modelo de un único gen con dos alelos, H determinante de la holocéclia, y h determinante de la androcéclia, en el que H dominaría sobre h. Sin embargo, cuando considera los clones intermedios como una clase distinta, expresa la necesidad de considerar un segundo gen con dos alelos (M, m) que establecería una relación de epistasia con el anterior, proponiendo un modelo que no llega a justificar plenamente sus resultados experimentales.

Con los datos obtenidos por Blackman nosotros hemos logrado establecer un modelo de herencia, que aplicado a todos los cruces realizados por este autor no produce ninguna discrepancia significativa entre los datos observados y los esperados bajo el modelo en ninguno de los casos. Según este modelo, y a falta obviamente de las necesarias comprobaciones mediante la realización de todas las combinaciones de cruces posibles, habría dos genes (cada

uno de ellos con dos alelos) implicados en la determinación del ciclo biológico. A continuación se detallan los genotipos posibles y su correspondencia con los fenotipos encontrados.

| GENOTIPO | CICLO DE VIDA DESARROLLADO |
|----------|----------------------------------|
| HHMM | Holocíclico |
| HhMM | Holocíclico |
| HHmm | Intermedio |
| Hhmm | Intermedio |
| HHMm | Intermedio |
| HhMm | Intermedio |
| hhMM | Androcíclico |
| hhMm | Androcíclico |
| hhmm | Androcíclico, ¿Anholocíclico? |

Dado que en los tres fenotipos encontrados por Blackman como resultado de los cruces siempre se forman machos (aunque en número variable) lo que estos genes parecen controlar es el tipo de hembras (sexuadas o partenogénicas) que se generan como respuesta a cambios en el fotoperiodo y la temperatura.

El alelo H sería dominante sobre el h, y sería responsable de la respuesta a las condiciones de fotoperiodo y temperatura mediante la modificación de ciertas pautas de desarrollo que conducirían en última instancia al desarrollo de los embriones como hembras sexuadas. En homocigosis el alelo h interrumpiría la modificación de dichas pautas, por lo que los embriones se continuarían desarrollando siempre como hembras partenogénicas en cualquier condición de fotoperiodo y temperatura (el clon se haría insensible a este tipo de cambios ambientales por lo que a la formación de hembras se refiere). Sin embargo la actividad de este gen estaría modulada por un segundo gen, cuyo alelo mutante m sería dominante sobre el alelo M. De esta forma la presencia del alelo m daría lugar a una respuesta parcial (probablemente variable dependiendo de si está en homocigosis o heterocigosis) haciendo que tan solo una parte de los embriones se desarrollen como hembras sexuadas y el resto seguirían la pauta de desarrollo propia de la no inducción. También podrían darse embriones cuyo desarrollo como hembras sexuadas no fuese total, lo cual explicaría los intermorfos de este tipo encontrados en *M. persicae* por Blackman. Es posible que la formación de machos no se viese afectada por estos genes y por ello se seguirían produciendo en mayor o menor grado en los tres fenotipos

observados. Sin embargo en nuestro modelo no se descarta la posibilidad de una interrupción total en la producción de machos como consecuencia de una interacción epistática entre los alelos m y h en homocigosis que condujese a la anholocécia estricta. Este último punto no puede ser contrastado con los datos de Blackman ya que él no obtiene clones anholocécicos como resultado de sus cruces. Sin embargo, si consideramos nuestro modelo como próximo al que está operando realmente, este autor sólo podría haber obtenido clones con genotipo hmmm en el cruce entre clones intermedios cuyo genotipo sería HhMm. De este cruce se obtendría una segregación 3:9:4 (holocécicos : intermedios : androcécicos) si no consideramos la epistasia mencionada, y una segregación 3:9:3:1 en la que el doble recesivo sería anholocécico. Como la descendencia obtenida fué muy reducida (22 clones) no podemos aclarar este aspecto, ya que los datos observados (5 clones holocécicos, 11 clones intermedios y 6 clones androcécicos) son compatibles con los dos tipos de segregación.

Si este modelo es válido y si un modelo similar controla el tipo de ciclo biológico en *R. padi*, la nueva aparición de clones androcécicos (y probablemente anholocécicos) sería posible sin necesidad de invocar mutación recurrente en las poblaciones holocécicas, mediante cruces oportunos. La probabilidad con que se puedan producir este tipo de cruces conducentes a la obtención de nuevas líneas androcécicas o anholocécicas dependerá de la frecuencia del alelo h en las poblaciones holocécicas y de la frecuencia del alelo m en las androcécicas o intermedias, así como de la diferente eficacia relativa de unos u otros genotipos. Aquellos genotipos que realicen una inversión en formas reproductivas cuyo éxito no esté medianamente asegurado se verán fuertemente desfavorecidos frente a aquellos cuya estrategia esté a priori mejor garantizada. Así, por ejemplo, no es esperable que los clones androcécicos sean altamente frecuentes en regiones de inviernos suaves en que no exista el huésped primario y por tanto no existan hembras sexuadas con las que aparearse. La formación de machos en este caso se puede considerar una inversión inútil, y probablemente este tipo de clones se viese desplazado por los clones estrictamente anholocécicos que tendrían garantizado todo su esfuerzo reproductivo. Por el contrario, en zonas en que los inviernos pueden ser, con cierta frecuencia, extremos y el huésped primario esté presente, los clones holocécicos se verían claramente favorecidos al realizar toda su inversión en formas reproductivas destinadas a la producción de huevos resistentes a las condiciones invernales. Otro tipo de clones se verán en esta situación claramente desfavorecidos. Los anholocécicos claramente por su incapacidad para superar con éxito inviernos muy duros, y los androcécicos e intermedios porque una considerable parte de



su esfuerzo reproductivo será baldía (hembras partenogénicas que difícilmente superarán esas condiciones extremas). Sin embargo estos dos últimos tipos de clones tendrían cierta oportunidad de perdurar bien per se (clones intermedios), bien participando en la reproducción sexual con individuos pertenecientes a clones con diferente ciclo biológico (varias combinaciones posibles).

Así, estaríamos ante un sistema muy flexible en el que según las condiciones ambientales predominantes en una determinada época encontraremos diferencias en las proporciones relativas de un tipo u otro de clones.

Esta idea es plenamente compatible con la observación en estudios previos (Simon et al., 1991) de que en ciertos periodos del año las poblaciones de *R. padi* pueden consistir en una mezcla de diferentes tipos de clones sobre los que anualmente actuaría, bien un proceso selectivo basado en la abundancia del huésped primario y en el clima invernal, o/y un proceso de extinción estocástica basado en los mismos elementos. Así, en la zona de Rennes donde *P. padus* es escaso, en los otoños de 1988 y 1989 se muestrearon 1500 y 1000 áfidos respectivamente (Simon, datos no publicados) de los que sólo 2 resultaron ser ginóparas. Un resultado similar se observó en 1977-1980 en el sur de Gran Bretaña (Hand, 1989). Sin embargo se producen grandes variaciones interanuales en la proporción de clones holocíclicos. Dedryver (1983) encontró que un 25% de los individuos muestreados en otoño de 1979 en maíz en la zona de Bretaña eran ginóparas, mientras que en el año siguiente en la misma área no pudo encontrar este morfo. Los autores explican esta variación como consecuencia del duro invierno de 1978-1979 que pudo eliminar la práctica totalidad de clones no holocíclicos, de forma que en la primavera de 1979 la mayor parte de la población sería de origen holocíclico y este efecto todavía sería perceptible en el otoño siguiente. Sin embargo, tras el suave invierno de 1979-1980 la población de clones holocíclicos habría sido desplazada como consecuencia del mayor éxito reproductivo de los clones anholocíclicos que en las poblaciones de primavera ya serían mayoritarios. Aunque este tipo de clones desaparezca cada cuatro o cinco años como consecuencia de inviernos extremos (Dedryver, 1987), mediante procesos migratorios a partir de poblaciones que podrían constituir reservorios naturales de este tipo de clones podrían establecerse de nuevo en esas zonas. Así mismo podrían generarse de novo haciendo uso de la estrategia mixta característica de los clones androcíclicos que contribuirían a la fase sexual aportando machos. Los clones holocíclicos por su parte llegado el caso de una completa extinción podrían ser reemplazados por clones holocíclicos procedentes de zonas en las que

son muy abundantes como consecuencia de la amplia presencia del huésped primario (Este de Francia o Norte de Europa).

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la existencia de dos haplotipos básicos bastante divergentes entre sí, demuestra la existencia de dos linajes mitocondriales que han evolucionado independientemente durante bastante tiempo. Ello sugiere una separación ancestral seguida de una ausencia total de flujo genético mitocondrial, que cabe ser entendida como consecuencia de la transmisión materna del mtDNA y por tanto relacionada con el ciclo biológico. El hecho de no haber encontrado haplotipos mitocondriales recientemente derivados del Haplotipo I indica que las poblaciones con este haplotipo han sufrido recientemente un cuello de botella importante. La posibilidad de que un cuello de botella de este tipo haya ocurrido realmente está también apoyada por los datos de variación en tamaño en dos regiones diferentes del genoma mitocondrial de esta especie, en que se observó una distribución mucho más amplia en los clones holocíclicos que en los anholocíclicos, siendo estos últimos portadores exclusivos del Haplotipo I. Según esta idea, la actual distribución del Haplotipo I (casi exclusivamente el único presente en las poblaciones españolas y característico así mismo de las poblaciones anholocíclicas analizadas del Noroeste de Francia) sería el resultado de movimientos migratorios acaecidos tras el último cuello de botella. Las poblaciones con Haplotipo II que son básicamente holocíclicas serían más diversas a juzgar por su distribución en clases de tamaño para los fragmentos variables ya discutida. Otro argumento en favor de esta mayor diversidad sería el hecho de haber encontrado hasta tres haplotipos distintos estrechamente relacionados, lo que indica su reciente origen. Esta aparente mayor diversidad de las poblaciones holocíclicas se puede explicar de formas distintas no incompatibles entre sí. Por un lado, es posible que se vean sometidas a cuellos de botella menos drásticos que los sufridos por las poblaciones anholocíclicas al tener una mayor capacidad para superar los inviernos extremos. Tampoco se puede descartar que exista un flujo migratorio importante procedente de aquellas regiones que pueden ser consideradas como el reservorio natural de la especie (Norte de Europa sobre todo). La alta capacidad migratoria de este tipo de clones (principalmente mediada por los morfos de otoño) ha sido demostrada en varios estudios (Tatchell et al., 1988; Nottingham et al., 1991) y ha sido invocada para explicar su limitada variabilidad en estudios de polimorfismo enzimático (Loxdale and Brooks, 1988).

Dos elementos perturban aparentemente estos planteamientos, aunque creemos que hemos presentado los suficientes elementos como para que puedan ser explicados sin alterar el cuadro

general. Por un lado el hecho de que los cuatro clones españoles con Haplotipo I cuyo ciclo de vida ha sido caracterizado y que resultaron ser androcíclicos cuando lo esperado por los datos existentes es que fuesen anholocíclicos. Este punto no representa ningún problema si tenemos en cuenta que por lo que al mtDNA se refiere ambos tipos de clones pertenecerían a una misma categoría. Es más, los resultados de otros investigadores sobre el tema, ya discutidos, apuntan a que una mayoría de clones androcíclicos pueden desarrollar un comportamiento anholocíclico sino se alcanzan determinadas condiciones de inducción ambientales. El segundo aspecto conflictivo sería la detección en una población española de dos clones con Haplotipo II y que tras la caracterización del ciclo biológico de uno de ellos se pudo determinar su carácter androcíclico. Este hecho se podría explicar como una pérdida secundaria por parte de un clon inicialmente holocíclico de la capacidad de formar hembras sexuadas o, lo que consideramos más sencillo, serían el resultado de algún tipo de cruce entre machos portadores del factor de la androclicia (podría ser el alelo h del modelo explicado anteriormente) con hembras sexuadas necesariamente portadoras de un mtDNA de Haplotipo II. Este tipo de cruces puede que se puedan dar en aquellos lugares donde coexistan diferentes tipos de clones pero su frecuencia y la probabilidad de que originen este tipo de descendientes es probable que no sea muy alta tal y como se discutió anteriormente, aunque es posible que determinadas condiciones ambientales pudieran favorecer este tipo de sucesos. En cualquier caso el origen de estos dos clones (o al menos de su mtDNA) estaría en una población en la que existan clones holocíclicos y su aparición en una población española sólo se explicaría como consecuencia de un proceso migratorio. Estos procesos migratorios es probable que se den con una cierta frecuencia (como ya se ha discutido) y que en ellos esten implicados todo tipo de clones. Sin embargo si el huésped primario no existe o es prácticamente inexistente (como sucede en España) solamente perdurarán aquellos clones que no precisen de él para superar el invierno (básicamente clones anholocíclicos o androcíclicos). Esta dependencia de los clones heteroicos del huésped primario incluso en condiciones ambientales de inviernos no muy extremos sólo puede ser explicada en el marco de la hipótesis de la "especialización de la fudatriz" (Moran, 1990; 1992) que hace que estos clones se vean irremediamente anclados a su huésped primario.

En cuanto a los clones de Estados Unidos que siendo Haplotipo II, en al menos tres casos, resultaron ser androcíclicos, la explicación sería similar. Podría tratarse de una colonización a partir de poblaciones europeas con Haplotipo II, aunque el hecho de haber encontrado un haplotipo diferente muy proximo al II (Haplotipo IV) podría indicar que los individuos

colonizadores no eran homogéneos en cuanto a su mtDNA o bien que la colonización se produjo hace el suficiente tiempo como para que se haya producido cierta diversificación. Tampoco se pueden descartar colonizaciones sucesivas.

Existen ejemplos de colonizaciones recientes del continente americano por parte de especies del viejo mundo. Un caso bien estudiado es el de *Drosophila subobscura* (Latorre et al., 1986). En esta especie se ha encontrado que los dos Haplotipos mitocondriales mayoritarios y más ampliamente distribuidos en Europa están ambos presentes en el continente americano.

En cuanto al tipo de ciclo vital de los colonizadores es posible que se tratase de una mezcla (cuando menos genotípica) ya que aunque en el presente estudio los únicos clones caracterizados fueron androcíclicos, los estudios realizados sobre *R. padi* en Estados Unidos demuestran la amplia distribución de clones holocíclicos (Araya et al., 1987; Halbert et al., 1992). Parece que estos clones se habrían adaptado bien a la utilización de especies de *Prunus* autóctonas, como *P. virginiana* (Halbert et al., 1992), como huéspedes primarios. Ello querría decir que si la población colonizadora era una mezcla de genotipos o bien poseían un ciclo vital intermedio con un genotipo heterocíclico, la generación de la misma variedad de clones ya existente en Europa habría sido posible. Así pues y a falta de un necesario análisis de aquellas poblaciones (consta que se está llevando a cabo por el Dr. J. C. Simon) estaríamos en disposición de predecir que los clones holocíclicos Norteamericanos serán portadores de un mtDNA del grupo del Haplotipo II. Otra cuestión a resolver sería la presencia o no en esa región del Haplotipo I.

Otro argumento en favor de la idea hasta aquí expuesta según la cual existirían en la actualidad dos linajes maternos en *R. padi* como resultado de la pérdida de la capacidad de formación de hembras sexuadas en uno de ellos acaecida en un tiempo relativamente alejado, proviene del resultado obtenido cuando se analizó una segunda molécula que (como el mtDNA) se hereda de forma materna. Parece demostrado que esta molécula es realmente un plásmido perteneciente a los endosimbiontes bacterianos del áfido (Bracho et al., enviado). Estos endosimbiontes han sido ubicados, mediante un análisis filogenético basado en datos moleculares, dentro del subgrupo g^{-3} de la clase *Proteobacteria* a la que pertenecen enterobacterias como *Escherichia coli* y han sido designadas globalmente como *Buchnera aphidicola* (Munson et al., 1991). La filogenia de *Buchnera* deducida a partir de datos de secuencia del gen del RNA ribosómico 16S es completamente concordante con la filogenia de

las distintas especies de áfidos que las contienen (Munson et al., 1991; Moran et al., 1993). Este hecho está totalmente de acuerdo con una transmisión vertical de estas bacterias que en última instancia ha conducido a una cladogénesis paralela para los hospedadores y para las bacterias endosimbióticas (Moran and Baumann, 1994). Así mismo estos autores concluyen que ha existido una única infección bacteriana ocurrida en el ancestro común de todos los áfidos modernos. Se ha demostrado por otra parte que estas bacterias infectan los embriones (o los huevos de las hembras sexuales) en una fase muy temprana de su desarrollo a partir de las bacterias existentes en abdomen materno (albergadas en unas células especializadas denominadas micetocitos). Se trata por tanto de una transmisión transovárica perfectamente regulada (Buchner, 1965; Douglas, 1989; Fukatsu and Ishikawa, 1992).

Las implicaciones que se derivan de la ancestralidad de esta asociación simbiótica y de su modo de transmisión por vía materna son en principio las mismas que las discutidas para el mtDNA. Lo más llamativo es que las tasas de sustitución nucleotídica de una molécula que se alberga en una bacteria y la molécula de mtDNA del huésped sean las mismas cuando en principio no han de estar necesariamente sujetas a las mismas presiones selectivas. Lo que podemos deducir de este hecho es que o bien los condicionantes selectivos han sido los mismos para ambas moléculas (lo cual no parece lógico teniendo en cuenta la diferente función que desarrollan y los más que probable diferentes mecanismos de regulación a los que se ven sometidos) o bien (y lo que parece más lógico) ambas moléculas representan dos marcadores neutrales que constituyen un auténtico reloj molecular perfectamente calibrado (incluso podríamos decir que constituyen dos relojes perfectamente sincronizados) para la escala de tiempo en la que se han producido los acontecimientos aquí analizados.

No incidiremos más en el significado que la diferente distribución de los Haplotipos pI y pII pueda tener en relación a los ciclos biológicos desarrollados por *R. padi* ya que las implicaciones y las argumentaciones que se puedan desarrollar serán idénticas a las ya discutidas para el mtDNA. Quepa solamente hacer constar lo que de refuerzo de la hipótesis que en este trabajo se plantea puede tener la total coincidencia entre dos tipos de observaciones que a priori no tendrían porque haber coincidido.

V.4. POSIBLES IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO EN LOS ESTUDIOS SOBRE LA EPIDEMIOLOGIA DEL VIRUS DEL ENANISMO AMARILLO DE LA CEBADA (BYDV).

Como ya se indicó en la introducción de este trabajo, *R. padi* es considerado como una especie plaga de cereales (Vickerman y Wratten, 1979; Carter et al., 1980) principalmente por ser un vector importante del virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV) (Plumb, 1983). Varios autores han destacado como un factor importante en la epidemiología del virus el tipo de ciclo vital desarrollado por el vector (Simon et al., 1991; Blackmer and Bishop, 1991; Leather, 1989) ya que no todos los morfos que aparecen a lo largo de los diferentes ciclos biológicos pueden ser considerados como igualmente infectivos. Como apuntan Simon et al. (1991) es altamente improbable que aquellos individuos que en otoño emprenden el vuelo en busca del huésped primario constituyan una amenaza de infección para los cultivos de cereal sembrados en otoño. Por otra parte, los individuos surgidos del huevo de invierno que abandonan el huésped primario en primavera están libres de virus y por tanto no han de ser considerados, en principio, en los modelos epidemiológicos (Simon et al., 1991). Sin embargo aquellos clones destinados a pasar el invierno como individuos partenogénicos, colonizarán los cereales de invierno, y serán por tanto potenciales transmisores del virus. De esta forma, los clones con comportamiento anholocíclico (y aquí incluiríamos también los clones androcíclicos y la fracción correspondiente de los clones intermedios) pueden ser considerados como vectores víricos continuos claramente favorecidos por los inviernos suaves que aseguran su mayor supervivencia (Blackmer and Bishop, 1991). Un método que permita una estimación de las proporciones relativas existentes a nivel local de clones de *R. padi* con uno u otro de los dos tipos básicos de ciclo vital contribuiría a una mejor evaluación de los riesgos de infección (Simon et al., 1991; Pierre et al., 1987). Del mismo modo, Tatchell et al. (1988) sugieren que para poder interpretar la importancia epidemiológica del número total de individuos emigrantes en otoño, es necesario conocer las proporciones relativas de los tres morfos alados presentes en ese momento: machos y ginóparas por un lado, y exiladas aladas por otro, lo cual puede ser a grandes rasgos equivalente a determinar las proporciones de clones holocíclicos y anholocíclicos. Sin embargo, mientras que los machos se pueden ser distinguidos fácilmente a nivel morfológico, no hay modo de diferenciar morfológicamente entre hembras ginóparas,

emigrantes y exiladas aladas. Únicamente por la diferente preferencia por el huésped se puede distinguir entre ginóparas y exiladas aladas: las ginóparas se alimentan preferentemente de *Prunus padus*, mientras que las exiladas aladas lo hacen sobre gramíneas. Algunos métodos morfométricos y otros basados en la estimación de parámetros de fecundidad potencial han revelado cierta utilidad a este respecto (Simon et al., 1991; Wellings et al., 1980; Leather et al., 1988).

En este contexto los resultados de nuestro trabajo pueden ser importantes por cuanto la existencia de un marcador molecular que parece diferenciar bien al menos un tipo de clones anholocíclicos del resto de clones puede resultar de especial utilidad en la estimación de sus proporciones relativas en poblaciones locales y en el seguimiento de las fluctuaciones temporales que se puedan producir como consecuencia de los cambios ambientales.

VI. CONCLUSIONES.

De los resultados presentados en este trabajo se pueden extraer las conclusiones que a continuación se detallan y que se pueden agrupar en dos tipos bien diferentes: por un lado aquellas que se derivan del análisis molecular del DNA mitocondrial de *R. padi*, centradas básicamente en torno a la región control de esta molécula y que pueden ser relevantes para los estudios de organización y función del mtDNA en insectos, y por otro aquellas derivadas de los análisis de variabilidad en diferentes poblaciones de esta especie de pulgón.

1. El orden de los genes mitocondriales que codifican para subunidades proteicas, para los dos RNAs ribosómicos, para al menos cuatro RNAs de transferencia y la región control, parece ser el mismo que el descrito para *Drosophila*. Existe sin embargo una diferencia clara con respecto a *Drosophila* como es la existencia en *R. padi* de una segunda región variable en tamaño de función todavía desconocida.

2. La caracterización molecular de la región control del mtDNA de *R. padi* y la comparación con otros insectos nos ha permitido identificar en todos ellos la existencia de series más o menos largas de dímeros consecutivos de TA que al menos en *R. padi* son adyacentes a las zonas de desapareamiento estable encontradas en esta región y que probablemente las provocan. Además la identificación y caracterización en esta región de una secuencia que presenta un número variable de repeticiones en tandem nos permite proponer la intervención en el proceso de variación de un mecanismo del tipo "slippage and strand mispairing".

3. El análisis del polimorfismo detectado para el mtDNA (tanto de tamaño como de sitios de restricción) avala la existencia de los linajes maternos relativamente divergentes en *R. padi* que se ven sometidos a diferentes dinámicas poblacionales. Uno de estos linajes estaría constituido exclusivamente por clones o poblaciones anholocíclicas o como mucho androcíclicas que recientemente han sufrido un reducido cuello de botella seguido de una rápida expansión. El otro linaje estaría compuesto por clones básicamente holocíclicos aunque es posible que puedan generar localmente clones que han perdido la capacidad de reproducción sexual. Este segundo linaje no refleja haber sufrido el mismo cuello de botella que el anterior o bien sus poblaciones han sido reinvadidas masivamente por clones procedentes de zonas donde exista una alta diversidad. La existencia de estos dos diferentes linajes es corroborada así

mismo por los datos de variabilidad obtenidos para la molécula circular de origen endosimbiótico.

4. Desde el punto de vista aplicado consideramos que el análisis de restricción del mtDNA puede ser una herramienta muy útil en la determinación del balance entre clones holocíclicos y al menos un tipo de clones anholocíclicos existente en un área determinada en un momento dado, lo cual tiene importantes implicaciones en los estudios sobre la epidemiología del BYDV.

5. Por último, quepa considerar como conclusión lo que en realidad es un llamamiento a ampliar y profundizar en los resultados obtenidos en el presente trabajo y que pueden contribuir a confirmar las ideas aquí expuestas. Consideramos que puede ser interesante analizar de forma más exhaustiva tanto áreas en las que coexistan diferentes tipos de clones en cuanto a su ciclo vital, como aquellas otras en las que *R. padi* se comporta de forma exclusivamente holocíclica y que pueden constituir un reservorio natural de la especie. Así mismo sería importante realizar un estudio exhaustivo de variabilidad temporal en alguna zona concreta como es el caso de Zaragoza en que en las últimas dos capturas se detectaron dos clones androcíclicos pertenecientes al linaje mitocondrial característico de los clones holocíclicos.

VII. LITERATURA CITADA.

- AFONSO, J. M., A. VOLZ, M. HERNANDEZ, H. RUTTKAY, A. M. GONZALEZ, J. M. LARRUGA, V. M. CABRERA and D. SPERLICH. 1990. Mitochondrial DNA

- variation and genetic structure in Old-World populations of *Drosophila subobscura*.
Mol. Biol. Evol. 7: 123-142.
- AFONSO, J. M., J. PESTANO and M. HERNANDEZ. 1988. Rapid isolation of mitochondrial DNA from *Drosophila* adults. Biochem. Genet. 26: 381-386.
- ANDERSON, S., A. T. BANKIER, G. T. BARRELL, M. H. L. deBRUIJN, A. R. COULSON, J. DROUIN, I. C. EPERON, D. P. NIERLICH, B. A. ROE, F. SANGER, P. H. SCHREIER, A. J. H. SMITH, R. STADEN and I. G. YOUNG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome.
- ANDERSON, S., M. H. L. deBRUIJN, A. R. COULSON, I. C. EPERON, F. SANGER and I. G. YOUNG. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. J. Mol. Biol. 156:683-717.
- ARAYA, J. E., J. E. FOSTER, and S. E. CAMBRON. 1987. A study of the biology of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) in winter wheat in Northwestern Indiana. The Great Lakes Entomologist. 20: 47-50.
- ARNASON, E. and D. M. RAND. 1992. Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*. Genetics 132:211-220.
- ARNASON, U., A. GULLBERG and B. WIDEGREN. 1991. J. Mol. Evol. 33: 556-568.
- ATTARDI, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. En "Genome evolution in procaryotes and eucaryotes", Ed. D. C. Reamey. Int. Rev. Cytol. 93.
- AVISE, J. C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 312:325-342.
- AVISE, J. C., and R. A. LANSMAN. 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. En "Evolution of genes and proteins". Pag. 147-164. Editado por M. Nei, R. K. Koehn. Sunderland: Sinauer.
- AVISE, J. C., G. S. HELFMAN, N. C. SAUNDERS, and L. STANTON HALES. 1986. Mitochondrial differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:4350-4354.

- AVISE, J. C., J. E. NEIGEL, and J. ARNOLD. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J. Mol. Evol.* **20**:99-105.
- BARRELL, B. G., S. ANDERSON, A. T. BANKIER, M. H. L. de BRUIJN, E. CHEN, A. R. COULSON, J. DROUIN, I. C. EPERON, D. P. NIERLICH, B. A. ROE, F. SANGER, P. H. SCHREIER, A. J. H. SMITH, R. STADEN, and I. G. YOUNG. 1980. Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:3164-3166.
- BATTEY, J., and D. A. CLAYTON. 1980. The transcription map of human mitochondrial DNA implicates transfer RNA excision as a major processing event. *J. Biol. Chem.* **255**:11599-11606.
- BEAGLEY, C. T., G. A. PONT, N. A. OKADA, and D. R. WOLSTENHOLME. (en preparación).
- BEAGLEY, C. T., N. A. OKADA, and D. R. WOLSTENHOLME. (en preparación).
- BIBB, M. J., R. A. VAN ETEN, C. T. WRIGHT, M. W. WALBERG and D. A. CLAYTON. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* **26**:167-180.
- BIRKY, C. W., T. MARUYAMA and P. FUERST. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts and some results. *Genetics* **103**: 513-527.
- BIRLEY, A. J. and J. H. CROFT. 1986. Mitochondrial DNAs and phylogenetics relationships. En "DNA systematics". **1**:107-137. Editado por S. K. Dutta. Boca Raton: CRC.
- BLACKMAN, R. L. (1974). Life-cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hom., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bull. ent. Res.* **63**:595-607.
- BLACKMAN, R. L. 1971. Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* Sulz. *Bull. ent. Res.* **60**: 533-546.
- BLACKMAN, R. L. 1972. The inheritance of life-cycle differences in *Myzus persicae* (Sulz.) (Hem., Aphididae). *Bull. ent. Res.* **62**:281-294.

- BLACKMER, J. L. and G. W. BISHOP. 1991. Population dynamics of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) in corn in relation to barley yellow dwarf epidemiology in Southwestern Idaho. *Environ. Entomol.* **20**: 166-173.
- BOURSOT, P., H. YONEKAWA, and F. BONHOMME. 1987. Heteroplasmy in mice with deletion of a large coding region of mitochondrial DNA.
- BROWN, J. R., A. T. BECKENBACH and M. J. SMITH. 1992. Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in populations of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics* **132**: 221-228.
- BROWN, W. M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:3246-3250.
- BROWN, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals, in *Molecular Evolutionary Genetics*, edited by R. J. MACINTYRE. Plenum, New York.
- BROWN, W. M., and J. WRIGHT. 1979. Mitochondrial DNA analysis and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). *Science.* **203**:1247-1249.
- BROWN, W. M., E. M. PRAGER, A. WANG and A. C. WILSON. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* **18**:225-239.
- BUROKER, N. E., J. R. BROWN, T. A. GILBERT, P. J. O'HARA, A. T. BECKENBACH, W. K. THOMAS and M. J. SMITH. 1990. Length heteroplasmy of the sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics* **124**: 157-163.
- CANN, R. L. and A. C. WILSON. 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics* **104**: 699-711.
- CANN, R. L., M. STONEKING, and A. C. WILSON. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* **325**:31-36.
- CANTATORE, P, and C. SACCONI. 1987. Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. *Int. Rev. Cytol.* **108**:149-208.
- CANTATORE, P., M. ROBERTI, G. RAINALDI, M. N. GADALETA and C. SACCONI. 1989. The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus*. *J. Biol. Chem.* **264**:10965-10975.

- CLARY, D. O. and D. R. WOLSTENHOLME. 1985. The mitochondrial DNA molecule of Drosophila yakuba: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *J. Mol. Evol.* **22**: 252-271.
- CLAYTON, D. A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**: 693-705.
- CLAYTON, D. A. 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**:453-478.
- CORNUET, J. M., L. GARNERY and M. SOLIGNAC. 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of Apis mellifera L. mitochondrial DNA. *Genetics* **128**: 393-403.
- CROZIER, R. H. and Y. C. CROZIER. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee Apis mellifera: complete sequence and genome organization. *Genetics*. **133**:97-117.
- DEAJARDINS, P., and R. MORAIS. 1991. *J. Mol. Evol.* **32**:153-161.
- DeSALLE, R. A., T. FREEDMAN, E. M. PRAGER, and A. C. WILSON. 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian Drosophila. *J. Mol. Evol.* **26**:157-164.
- DeSALLE, R., A. TEMPLETON, I. MORI, S. PLETSCHER and J. S. JOHNSTON. 1987. Temporal and spatial heterogeneity of mtDNA polymorphisms in natural populations of Drosophila mercatorum. *Genetics* **116**: 215-223.
- DeSALLE, R., and A. R. TEMPLETON. 1988. Founder effects accelerate the rate of mitochondrial DNA evolution in Hawaiian Drosophila. *Evolution*. **42**:1076-1084.
- DESJARDINS, P. and R. MORAIS. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* **212**:599-634.
- EDWARDS, S. V. and A. C. WILLSON. 1990. Phylogenetically informative length polymorphism and sequence variability in mitochondrial DNA of Australian songbirds (Pomatostomus). *Genetics* **126**: 695-711.
- FERERES, A., P. DEL ESTAL, F. ORTEGO, and P. CASTAÑERA. 1990. Dinámica de las poblaciones invernantes de pulgones de cereales de la zona centro de la Península Ibérica. *Invest. Agrar. Sec. Prod. Prot. Veg.* **5**:447-462.

- FERERES, A., R. M. LISTER, P. CASTAÑERA, and J. E. FOSTER. 1989. Identification, distribution and vector population dynamics of barley yellow dwarf virus in three cereal-producing areas of Spain. *J. Phytopathol.* **126**:79-91.
- GADALETA, G., G. PEPE, G. DeCANDIA, C. QUAGLIARIELLO, E. SBISA and C. SACCONI. 1989. The complete nucleotide sequence of the *Rattus norvegicus* mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J. Mol. Evol.* **28**:497-516.
- GJETVAJ, B., D. I. COOK AND E. ZOUROS. 1992. Repeated sequences and large-scale variation of mitochondrial DNA: a common feature among scallops (Bivalvia: Pectinidae). *Mol. Biol. Evol.* **9**: 106-124.
- GODDARD, J. M., and D. R. WOLSTENHOLME. 1978. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:3886-3890.
- GODDARD, J. M., and D. R. WOLSTENHOLME. 1980. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from de genus *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **8**:741-757.
- GRAVES, J. E., S. D. FERRIS, and A. E. DIZON. 1984. Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna (*Katsuwonis pelamis*) demonstrated with restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* **79**:315-319.
- HALBERT, S. E., B. J. CONNELLY, G. W. BISHOP, and J. L. BLACKMER. 1992. Transmission of barley yellow dwarf virus by field collected aphids (Homoptera: Aphididae) and their relative importance in barley yellow dwarf virus epidemiology in southwestern Idaho. *Ann. appl. Biol.* **121**: 105-121.
- HALE L. R. and R. S. SINGH. 1986. Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8813-8817.
- HARRISON, R. G., D. M. RAND and W. C. WHEELER. 1985. Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science* **228**: 1446-1447.

- HENIKOFF, S. 1982. Unidirectional deletion of recombinant DNA clones with exonuclease III. *Gene* 28: 351-352.
- HILLE RIS LAMBERS, D. (1966). Polymorphism in Aphididae. *Ann. Rev. Entomol.* 11:47-78.
- HOEH, W. R., K. H. BLAKLEY and W. M. BROWN. 1991. Heteroplasmy suggests paternal leakage of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science.* 251:1488-1490.
- HOELZEL, A. R., J. M. HANCOCK and G. A. DOVER. 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Mol. Biol. Evol.* 8: 475-493.
- JACOBS, H. T., D. J. ELLIOT, V. B. MATH and A. FARQUHARSON. 1988. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 202:185-217.
- JUKES, T. H., and V. BHUSHNAN. 1986. Silent nucleotide substitutions and G+C content of some mitochondrial and bacterial genes. *J. Mol. Evol.* 24:39-44.
- KIMURA, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge, New York: Cambridge Univ. Press.
- KONDO, R., Y. SATTA, E. T. MATSUURA, H. ISHIWA, N. TAKAHATA and S. I. CHIGUSA. 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics.* 126:657-663.
- KOWALSKI, D., D. A. NATALE and M. J. EDDY. 1988. Stable DNA unwinding, not "breathing" accounts for single-strand-specific nuclease hypersensitivity of specific A+T rich sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9464-9468.
- KRUSE, B., N. NARASINHAM, and G. ATTARDI. 1989. Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell.* 52:811-819.
- LA ROCHE, J., M. SNYDER, D. I. COOK, K. FULLER and E. ZOUROS. 1990. Molecular characterization of a repeat element causing large-scale size variation in the mitochondrial DNA of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Mol. Biol. Evol.* 7:45-64.

- LEATHER, S. R., K. F. A. WALTERS, and A. F. G. DIXON. 1989. Factors determining the pest status of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae), in Europe: a study and review. Bull. Entomol. Res. 79: 345-360.
- LEVINSON, G. and G. A. GUTMAN. 1987. Slipped-strand and mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Mol. Biol. Evol. 4: 203-221.
- LEWONTIN, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. Evol. Biol. 6: 381-398.
- LI, W.-H., C.-C. LUO, and C.-I. WU. 1985. Evolution of DNA sequences. En "Molecular Evolutionary Genetics", pag. 1-130. Editado por R. J. MacIntyre, New York, London: Plenum.
- LOXDALE, H. D. 1990. Estimating levels of gene flow between natural populations of cereal aphids (Homoptera: aphididae). Bull. Entomol. Res. 80: 331-338.
- LOXDALE, H. D. 1990. Estimating levels of gene flow between natural populations of cereal aphids (Homoptera: Aphididae). Bull. Entomol. Res. 80:331-338.
- LOXDALE, H. D. and C. P. BROOKES. 1988. Electrophoretic study of enzymes from cereal aphid populations. V. Spatial and temporal genetic similarity of holocyclic populations of the bird-cherry oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae), in Britain. Bull. ent. Res. 78: 241-249.
- LYNCH, M. and T. J. CREASE. 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. Mol. Biol. Eol. 7:377-394.
- MARTINEZ, D., MOYA, A., A. LATORRE and A. FERERES. 1992. Mitochondrial DNA variation in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) populations from four Spanish localities. Ann. Entomol. Soc. Am. 85: 241-246.
- MATSUURA, E. T., H. FUKUDA and S. I. CHIGUSA. 1991. Mitochondrial DNA heteroplasmy maintained in natural populations of *Drosophila simulans* in Réunion. Genet. Res., Camb. 57: 123-126.
- MAYNARD-SMITH, J. 1989. Finite and structured populations. En "Evolutionary genetics". Pag 138-163. Oxford Univ. Press.

- MIGNOTTE, F., M. GUERIDE, A. M. CHAMPAGNE and J. C. MOUNOLOU. 1990. Direct repeats in the non-coding region of rabbit mitochondrial DNA. Involvement in the generation of intra- and inter-individual heterogeneity. *Eur. J. Biochem.* **194**: 561-571.
- MONFORTE, A., E. BARRIO and A. LATORRE. 1993. Characterization of the length polymorphism in the A+T rich region of the *Drosophila obscura* group species. *J. Mol. Evol.* **36**: 214-223.
- MORAN, N. A. 1988. The evolution of host-plant alternation in aphids: evidence for specialization as a dead end. *Am. Nat.* **132**:681-706.
- MORAN, N. A. 1990. Aphid life cycles: two evolutionary steps. *Am. Nat.* **136**:135-138.
- MORAN, N. A. 1992. The evolution of aphid life cycles. *Annu. Rev. Entomol.* **37**:321-348.
- MORITZ, C. and W. M. BROWN. 1987. Tandem duplication of D-loop and ribosomal RNA sequences in lizard mitochondrial DNA. *Science* **233**: 1425-1427.
- MORITZ, C., T. E. DOWLING and W. M. BROWN. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 269-292.
- OJALA, D., C. MERKEL, R. GELFAND, and G. ATTARDI. 1980. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell.* **22**:393-403.
- OKIMOTO, R., H. M. CHAMBERLIN, J. L. MACFARLANE, N. A. OKADA, and D. R. WOLSTENHOLME. (en preparación).
- OKIMOTO, R., J. L. MACFARLANE, D. O. CLARY and D. R. WOLSTENHOLME. 1992. *Genetics.* **130**:471-498.
- PEPE, G., M. HOLTROP, G. GADALETA, A. M. KROON, P. CANTATORE, ET AL. 1983. Nonrandom patterns of nucleotide substitutions and codon strategy in the mammalian mitochondrial genes coding for identified and unidentified reading frames. *Biochem. Int.* **6**:553-563.
- PONT, G. A., C. T. BEAGLEY, R. OKIMOTO, and D. R. WOLSTENHOLME. (en preparación).

- POWELL, J. R., A. CACCONE, G. D. AMATO, and C. YOON. 1986. Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial and nuclear DNA are similar. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**:9090-9093.
- POWERS, T. O. S. G. JENSEN, S. D. KINDLER, C. J. STRYKER, and L. J. SANDALL. 1989. Mitochondrial DNA divergence among greenbug (*Homoptera:Aphididae*) biotypes. Ann. Entomol. Soc. Am. **82**:298-302.
- RAND, D. and R. HARRISON. 1989. Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. Genetics **121**: 551-569.
- ROE, B. A., D. P. MA, R. K. WILSON and J. F. H. WONG. 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. J. Biol. Chem. **260**:9759-9774.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y.
- SANGER, F., S. NICKLEN and A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.
- SIMON, J. C., C. A. DEDRYVER, and J. S. PIERRE. 1991. Identifying bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* emigrants, alatae exules and gynoparae: application of multivariate methods to morphometric and anatomical features.
- SIMON, J. C., R. L. BLACKMAN, and J. F. Le GALLIC. 1991. Local variability in the life cycle of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) in western France. Bull. ent. Res. **81**: 315-322.
- SOLIGNAC, M., J. GENERMONT, M. MONNEROT and J. C. MOUNOLOU. 1984. Genetics of mitochondria in *Drosophila*: inheritance in heteroplasmic strains of *D. mauritiana*. Mol. Gen. Genet. **197**: 183-188.
- SOLIGNAC, M., M. MONNEROT and J. C. MOUNOLOU. 1986. Concerted evolution of sequence repeats in *Drosophila* mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. **23**: 53-60.
- SOLIGNAC, M., M. MONNEROT, and J.-C. MOUNOLOU. 1986. Mitochondrial DNA evolution in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. J. Mol. Evol. **23**:31-40.
- SOUTHERN, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**: 503-517.

- STEINER, W. W. M., D. J. VOEGTLIN, M. E. IRWIN, and G. KAMPMEIER. 1985. Electrophoretic comparison of aphid species: detecting differences based on taxonomic status and host plant. *Comp. Biochem. Physiol.* **81B**:295-299.
- TAKADA, H. 1988. Interclonal variation in the photoperiodic response for sexual morph production of Japanese *Aphis gossypii* Glover (Hom., Aphididae). *J. appl. Entomol.* **106**:188-197.
- TAKAHATA, N., and S. PALUMBI. 1985. Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics.* **109**:441-457
- TATCHELL, G. M., R. T. PLUMB and N. CARTER. 1988. Migration of alate morphs of the bird cherry aphid (*Rhopalosiphum padi*) and implications for the epidemiology of barley yellow dwarf virus. *Ann. Appl. Biol.* **112**:1-11.
- VALVERDE, J. R. 1992. Caracterización del genoma mitocondrial de *Artemia franciscana*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- VAWTER, L., and W. M. BROWN. 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science.* **234**:194-196.
- WARRIOR, R. and J. GALL. 1985. The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. *Arch. Sc. Geneve.* **3**:439-445.
- WILSON, A. C., R. L. CANN, S. M. CARR, M. GEORGE, U. B. GYLLENSTEN, K. M. HELM-BYCHOWSKY, R. G. HIGUCHI, S. R. PALUMBI, E. M. PRAGER, R. D. SAGE, and M. STONEKING. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* **26**:375-400.
- WÖHRMANN, K., and D. HALES. 1989. Life cycle components and genetic variability in aphids. *J. Appl. Ent.* **107**:71-77.
- WOLSTENHOLME, D. R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* **141**:173-216.
- WOLSTENHOLME, D. R., and D. O. CLARY. 1985. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics.* **109**:725-744.
- WOLSTENHOLME, D. R., J. L. MACFARLANE, R. OKIMOTO, D. O. CLARY, and J. A. WAHLEITHNER. 1987. Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of

mitochondrial genomes of nematode worms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**: 1324-1328.

WOLSTENHOLME, D. R., K. KOIKE, P. COCHRAN-FOUTS. 1974. Replication of mitochondrial DNA: replicative forms of molecules from rat tissues and evidence for discontinuous replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **38**:267-280.

ZAPPAROLI, M. 1993. Data on life cycle of *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hom., Aphididae) on cereal crops in central Italy. J. Appl. Ent. **116**:101-104.

DIXON, A. F. G. 1977. Aphid ecology: life cycles, polymorphism, and population regulation. Ann. Rev. Ecol. Syst. **8**:329-353.

DIXON, A. F. G. 1985. Structure of aphid populations. Ann. Rev. Entomol. **30**:155-174.

BROOKES, C. P. and H. D. LOXDALE. 1987. Survey of enzyme variation in British populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) on crops and weed hosts.



Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. David Martínez Torres
la calificación de Apto "cum laude" por unanimidad
Valencia, a 1 de Junio de 1994

El Secretario,

El Presidente

Roce de Truto

